

**MARIANA VIANA CASTRO**

**ATIVIDADE NEMATICIDA E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE  
ISOLADOS DE *Bacillus* spp. CONTRA *Meloidogyne incognita***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, Campus Rio Paranaíba, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Liliane Evangelista Visôto

Coorientadores: Carlos Marcelo Soares  
Luanda Medeiros Santana

**RIO PARANAÍBA - MINAS GERAIS  
2021**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da Universidade Federal  
de Viçosa - Campus Rio Paranaíba**

T

C749a  
2021

Castro, Mariana Viana, 1996-

Atividade nematicida e promoção de crescimento de  
isolados de *Bacillus* spp. contra *Meloidogyne incognita* /  
Mariana Viana Castro. – Rio Paranaíba, MG, 2021.  
31 f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Liliâne Evangelista Visotto.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Controle biológico. 2. Nematóide de galhas.  
3. Fitossanidade. I. Universidade Federal de Viçosa. Agronomia.  
Mestrado em Agronomia (Produção Vegetal). II. Título.

632.65182

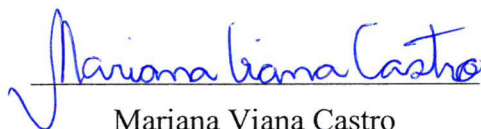
MARIANA VIANA CASTRO

**ATIVIDADE NEMATICIDA E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE  
ISOLADOS DE *Bacillus* spp. CONTRA *Meloidogyne incognita***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, Campus Rio Paranaíba, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 26 de março de 2021

Assentimento:



Mariana Viana Castro  
Autora



Liliane Evangelista Visotto  
Orientadora

**A Deus, que me direcionou até aqui.**  
**Aos meus pais, que sempre me apoiaram.**

## **AGRADECIMENTOS**

A Universidade Federal de Viçosa – Campus Rio Paranaíba, ao programa de Pós-Graduação em Agronomia (Produção Vegetal) pela oportunidade de desenvolver esta dissertação e aos conhecimentos gerados.

A minha orientadora professora Liliane, que sempre transmitiu seus ensinamentos de maneira fraterna.

Aos meus coorientadores, Carlos Marcelo e professora Luanda por ter agregado conhecimento ao trabalho.

Ao professor Everaldo pela disponibilidade de estar sempre nos auxiliando.

A UNIPAM pela disponibilização das bactérias e materiais, representada pelo professor Walter que me orientou desde o início da minha caminhada acadêmica.

A toda equipe NOOA pela disponibilização dos seus produtos testes, materiais, estrutura e pessoas. Em especial, ao Marcelo e Cícero, que não mediram esforços para o sucesso da presente dissertação.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Agradeço imensamente a todas as instituições e pessoas que me auxiliaram.

## RESUMO

CASTRO, Mariana Viana, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa - Campus Rio Paranaíba, março de 2021. **Atividade nematicida e promoção de crescimento de isolados de *Bacillus* spp. contra *Meloidogyne incognita*.** Orientadora: Liliane Evangelista Visôto. Coorientadores: Carlos Marcelo Soares e Luanda Medeiros Santana.

O nematoide das galhas, *Meloidogyne incognita*, é responsável por perdas consideráveis na agricultura, podendo acometer culturas de grande importância econômica. O controle desse fitopatógeno é complexo e baseia-se principalmente no uso de nematicidas químicos, que podem causar sérios problemas ao ambiente e à saúde. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar a capacidade de isolados de *Bacillus* spp. para atuar no controle do *M. incognita* e na promoção do crescimento vegetal. Foi avaliado inicialmente o efeito de 15 cepas de *Bacillus* spp. na eclosão dos ovos e na mortalidade de juvenis (J2) *in vitro*. Os isolados bacterianos mais promissores foram selecionados e testados em tomateiros infectados com *M. incognita* e cultivados em casa de vegetação. Nesse experimento, o efeito dos *Bacillus* spp. foi avaliado em variáveis fotossintéticas, na promoção do crescimento das plantas e no controle da reprodução do nematoide. Os isolados 307, GB16, GB24 e GB29 causaram maior mortalidade e inibiram a eclosão de juvenis de *M. incognita*. Em casa de vegetação, plantas submetidas ao isolado GB16 exibiram maior assimilação de carbono e transpiração, enquanto as plantas do tratamento com GB24 apresentaram maior razão entre a concentração interna e externa de CO<sub>2</sub>. Por outro lado, nenhum isolado alterou o crescimento dos tomateiros. As maiores reduções na reprodução de *M. incognita* foram obtidas com os isolados 307 (59,08 %) e GB24 (58,91 %), em comparação ao controle negativo, seguida pelos isolados GB16 e GB29, que exibiram redução média de 44,79 e 39,56 % dos nematoides, respectivamente. Conclui-se que os isolados 307 e GB24 apresentam potencial para uso no biocontrole de *M. incognita*.

Palavras-chave: Controle biológico. Nematoide de galhas. Fitossanidade.

## ABSTRACT

CASTRO, Mariana Viana, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa - Viçosa - Campus Rio Paranaíba, March, 2021. **Nematicidal activity and growth promotion of *Bacillus* spp. against *Meloidogyne incognita*.** Adviser: Liliane Evangelista Visôto. Co-advisers: Carlos Marcelo Soares and Luanda Medeiros Santana.

The root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*, is responsible for considerable losses in agriculture and can affect crops of great economic importance. The control of this phytopathogen is complex and is mainly based on the use of chemical nematicides, which can cause serious problems for the environment and health. Thus, the aim of this study was to evaluate the capacity of *Bacillus* spp. to act in the control of *M. incognita* and in the promotion of plant growth. The effect of 15 strains of *Bacillus* spp. was evaluated on egg hatching and juvenile mortality (J2) in vitro. The most promising bacterial isolates were selected and tested on tomato plants infected with *M. incognita* and grown in a greenhouse. In this experiment, the effect of *Bacillus* spp. was evaluated in photosynthetic variables, in promoting plant growth and in controlling nematode reproduction. Isolates 307, GB16, GB24 and GB29 caused higher mortality and inhibited the hatching of *M. incognita* juveniles. In the greenhouse, plants subjected to isolate GB16 exhibited greater carbon assimilation and transpiration, while plants treated with GB24 presented a greater ratio between internal and external CO<sub>2</sub> concentration. On the other hand, none of the isolates altered tomato growth. The greatest reductions in *M. incognita* reproduction were obtained with isolates 307 (59.08%) and GB24 (58.91%), compared to the negative control, followed by isolates GB16 and GB29, which showed an average reduction of 44.79 and 39.56% of the nematodes, respectively. It is concluded that isolates 307 and GB24 have potential for use in the biocontrol of *M. incognita*.

Keywords: Biological control. Root-knot nematode. Plant health.

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                                    |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1- INTRODUÇÃO .....</b>                                                                                                                         | <b>8</b>  |
| <b>2- MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>                                                                                                                | <b>10</b> |
| 2.1- Manutenção de <i>M. incognita</i> .....                                                                                                       | 10        |
| 2.2- Isolados bacterianos .....                                                                                                                    | 10        |
| 2.3- Quantificação dos inóculos .....                                                                                                              | 11        |
| 2.4- Atividade antagonista dos isolados bacterianos sobre <i>M. incognita in vitro</i> .....                                                       | 11        |
| 2.4.1- Tratamentos .....                                                                                                                           | 11        |
| 2.4.2- Obtenção de ovos e juvenis de segundo estágio de <i>M. incognita</i> .....                                                                  | 12        |
| 2.4.3- Avaliação dos isolados bacterianos quanto à capacidade de inibir a eclosão de ovos de <i>M. incognita in vitro</i> .....                    | 13        |
| 2.4.4- Avaliação nematicida <i>in vitro</i> dos isolados bacterianos sobre J2 de <i>M. incognita</i> .....                                         | 13        |
| 2.5- Efeito dos isolados bacterianos sobre <i>M. incognita</i> e promoção de crescimento e atividade fotossintética em plantas de tomate .....     | 14        |
| 2.5.1- Preparo do solo e infestação de <i>M. incognita</i> .....                                                                                   | 14        |
| 2.5.2- Inoculação das bactérias e manutenção das plantas .....                                                                                     | 14        |
| 2.5.3- Análise de variáveis fotossintéticas .....                                                                                                  | 15        |
| 2.5.4- Análise da promoção do crescimento .....                                                                                                    | 15        |
| 2.5.5- Quantificação de <i>M. incognita</i> nas plantas de tomate .....                                                                            | 15        |
| 2.6- Análises estatísticas .....                                                                                                                   | 15        |
| <b>3- RESULTADOS .....</b>                                                                                                                         | <b>15</b> |
| 3.1- Inibição da eclosão dos ovos de <i>Meloidogyne incognita</i> .....                                                                            | 15        |
| 3.2- Mortalidade de J2 de <i>Meloidogyne incognita</i> .....                                                                                       | 18        |
| 3.3- Avaliação do efeito dos isolados de <i>Bacillus</i> spp. nos parâmetros fotossintéticos em tomateiros submetidos ao <i>M. incognita</i> ..... | 19        |
| 3.4- Avaliação do efeito dos isolados de <i>Bacillus</i> spp. na promoção de crescimento em tomateiros submetidos ao <i>M. incognita</i> .....     | 20        |
| 3.5- Avaliação do efeito dos isolados de <i>Bacillus</i> spp. no controle de <i>M. incognita</i> em tomateiros .....                               | 23        |
| <b>4- DISCUSSÃO .....</b>                                                                                                                          | <b>25</b> |
| <b>5- CONCLUSÃO .....</b>                                                                                                                          | <b>26</b> |
| <b>6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>                                                                                                         | <b>26</b> |

## 1- INTRODUÇÃO

O nematoide de galhas, *Meloidogyne incognita*, é responsável por perdas consideráveis na agricultura (Murungi et al., 2018). *M. incognita* pode infectar mais de 1.700 espécies de plantas, dentre elas culturas economicamente importantes, incluindo tomate, cenoura, batata, pepino e soja. Devido à sua ampla gama de hospedeiros, as perdas globais são estimadas em US\$ 100 bilhões por ano (Ma et al., 2017).

O principal dano provocado por *M. incognita* ocorre no sistema radicular, o que afeta a capacidade de absorção de água e nutrientes pelas plantas e, consequentemente, reduz sua produtividade (Kepenekci et al., 2016). Para reduzir a população desse organismo tem sido adotadas medidas como o cultivo de plantas resistentes (Silva et al., 2019), rotação de culturas com espécies não hospedeiras (Expósito et al., 2019), pousio e uso de químicos fumigantes ou nematicidas (Hajihassani et al., 2019). No entanto, essas práticas muitas vezes não apresentam efeito imediato ou não dão retorno econômico equivalente, o que aumenta o interesse por pesquisas envolvendo métodos alternativos de controle de *M. incognita*.

Nematicidas biológicos são opções cada vez mais comuns para os produtores e vários organismos podem ser utilizados para o desenvolvimento de produtos (Kepenekci et al., 2018). Bactérias do gênero *Bacillus* por meio de vários mecanismos, podem reduzir o ataque dos nematoides através da alteração do seu comportamento, competição por nutrientes, interferência na interação planta-nematoide, inibição da eclosão de juvenis e redução da sobrevivência juvenil (Cao et al., 2019; Chihneya et al., 2017). Além da ação direta sobre o nematoide, as bactérias podem ainda promover a nutrição e crescimento da planta e induzir resistência sistêmica contra o patógeno (Choudhary e Jori, 2009; Xiang et al., 2017).

Algumas espécies de *Bacillus* são toxigênicas, como o *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), que sintetiza proteína cristal (Proteína Cry ou  $\delta$ -endotoxina) durante sua fase estacionária. A toxicidade da proteína Cry varia entre os isolados, já que *Bt* pode produzir toxinas com estrutura e mecanismo de ação diferentes. Mohammed et al. (2008) relataram que esporos ou proteínas Cry isoladas de *Bt*7N, *Bt*Den, *Bt*18, *Bt*K73, *Bt*Soto e *Bt*7 apresentaram elevada atividade nematicida sobre *M. incognita* (86 a 100 %). Além disso, a suspensão de células e o sobrenadante livre de células do isolado *Bt*7N reduziram o número da massa de ovos (78 e 77 %, respectivamente) e o número de ovos (84 e 76 %, respectivamente). Proteases, quitinases e glucanases secretadas por *Bacillus* também foram reportadas como tendo papel importante na supressão de

nematoídes do solo (Siddiqui et al., 2005). O extrato bruto extracelular de *Bacillus* sp. cepa B16 apresentou alta atividade nematocida (80 %) sobre *Panagrellus redivivus*, sugerindo o envolvimento de proteases extracelulares. Nesse estudo, a protease foi purificada e sua ação confirmada através de experimentos de mortalidade e degradação de cutícula do nematoíde (Niu et al., 2005). A protease Apr219 de *Bacillus* sp. cepa RH219 também degradou a cutícula extracelular do nematoíde e foi considerada importante fator de patogenicidade. Genes codificadores de proteases que degradam a cutícula também foram amplificados de quatro cepas de *Bacillus* spp. isolados da rizosfera. A ampla variedade de proteases com atividade nematocida, produzida por cepas diferentes de *Bacillus*, sugere que essas enzimas têm papel relevante na interação bactéria-nematoíde-planta-ambiente, podendo ser consideradas fatores de promoção do balanço da população de nematoíde no solo (Lian et al., 2007).

Compostos nematocidas produzidos durante o metabolismo secundário de *Bacillus* sp. também são muito explorados. Em um estudo realizado por Luo et al. (2018) foi observado que *Bacillus mycoides* cepa R2 libera um composto com ação nematocida sobre *M. incognita*. A substância em questão foi isolada e identificada como estireno, um volátil que causa evasão e morte dos nematoídes, pela sua ação no neurônio olfativo e na via de sinalização mediada pela proteína G. *Bacillus subtilis* cepa Bs-1, obtido de solo rizosférico, promoveu forte efeito nematocida, inibição da eclosão de ovos e repelência de *M. incognita*, devido aos compostos voláteis sintetizados pela bactéria, como ácido acético, 2-heptanona, pirazina 2,5-dimetil- e dissulfeto, dimetil, relacionados à quimiotaxia de *M. incognita* e *Caenorhabditis elegans* (Cao et al., 2019; Huang et al., 2010).

Além de espécies de *Bacillus* atuarem na defesa direta da planta, há relatos de que algumas espécies promovem o crescimento e ativam a defesa sistêmica vegetal. Em casa de vegetação, *Bacillus firmus* (formulação comercial BioNem) reduziu em 91 % a formação de galhas, em 76 % a população de *M. incognita* e 45 % a eclosão de juvenis. Além disso, promoveu o aumento do peso e da biomassa das plantas em 71 e 50 %, respectivamente, comparado as plantas controle. Em condições de campo, a aplicação de 400 kg ha<sup>-1</sup> foi efetiva, diminuindo o número de galhas em 84 % e aumentando em 31 % o peso de raízes e em 24 % o peso total das plantas, 45 dias após o tratamento (Terefe et al., 2009). *Bacillus subtilis*, *B. pumilus* e *Pseudomonas fluorescens* também foram analisados como agentes de biocontrole de *M. incognita* em feijão caupi cultivado em casa de vegetação. *Bacillus subtilis* registrou a maior redução percentual total média (82 %) de *M. incognita*, seguido por *B. pumilus*. O conteúdo de compostos

fenólicos e dos pigmentos cloroplastídicos foi aumentado por *B. pumilus*. Além disso, foi observado aumento no crescimento e nos parâmetros de produção do feijão caupi tratado com os biocontroladores (Abd-El-Khair et al., 2019). Linhagens de *B. subtilis* induziram resistência sistêmica contra *M. incognita* em plantas de tomate, como revelado em sistema de raízes divididas, onde bactérias e nematoides foram inoculados em raízes espacialmente separadas da mesma planta. Isso reduziu a produção de massas de ovos em até 51 %, enquanto a inoculação de bactérias e nematoide no mesmo vaso teve efeito menor na supressão de *M. incognita* em comparação à resistência sistêmica induzida isoladamente. Portanto, o efeito mediado pela planta foi o principal motivo de antagonismo, e não de mecanismos diretos (Adam et al., 2014). *Bacillus halotolerans* LYSX1 mostrou elevada atividade nematicida contra juvenis de segundo estágio de *M. javanica* em plantas de tomate. Para elucidar se metabólitos de *B. halotolerans* LYSX1 induziam a resistência sistêmica a *M. javanica*, suspensão bacteriana e J2 foram aplicadas as raízes de tomate espacialmente separadas. *Bacillus halotolerans* LYSX1 reduziu a taxa de penetração de *M. javanica*, indicando que metabólitos secundários sintetizados pela bactéria possivelmente atuaram como sinais na indução da resistência sistêmica contra o nematoide (Xia et al., 2019).

Mediante ao exposto, acredita-se que esforços para desenvolver novos produtos que contribuam no manejo de *M. incognita* são válidos, visto a importância deste patógeno para a agricultura. Dessa forma, o presente trabalho visou avaliar o efeito de isolados de *Bacillus* spp. sobre *M. incognita* *in vitro* e *in vivo* e sobre a promoção do crescimento em plantas de tomate.

## **2- MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1- Manutenção de *M. incognita***

A população de *M. incognita* foi multiplicada e mantida em casa de vegetação, em vasos de 5 L, contendo solo esterilizado e pimentão (*Capsicum annuum*).

### **2.2- Isolados bacterianos**

Quinze isolados foram fornecidos pelo professor Dr. Walter Vieira da Cunha (Laboratório de Genética e Biotecnologia – UNIPAM) e pela empresa NOAA BRASIL, ambas localizadas em Patos de Minas – MG. As bactérias foram extraídas do solo de propriedades localizadas na região do Alto Paranaíba-MG, utilizando a metodologia de Melo e Azevedo (2000), isoladas e armazenadas em glicerol.

Para verificação da pureza, as bactérias selecionadas (307, GB01, GB05, GB08, GB10, GB11, GB13, GB16, GB20, GB24, GB25, GB26, GB27, GB28 e GB29) foram mantidas em banho maria a 80 °C, por 12 min e, em seguida, as amostras foram submetidas ao estriamento em meio ágar nutriente (AN) e mantidas a 30 °C por 72 h.

Após verificação da pureza, uma unidade formadora de colônia (UFC) de cada isolado foi transferida para meio de cultura líquido padrão NOOA, incubado a 30 °C com agitação de 200 rpm por 48 h. Os inóculos foram monitorados a cada 24 h por meio de microscopia até a formação de esporos. Para isso, 20 µL das suspensões bacterianas foram transferidos para lâminas e uma análise microscópica foi realizada para verificação da esporulação.

### **2.3- Quantificação dos inóculos**

A quantificação dos inóculos foram realizados baseados na Instrução Normativa N° 30, 12 de novembro de 2010 (MAPA), por meio de diluição seriada seguida de plaqueamento em meio AN. As placas foram incubadas a 30 °C, por 48 h, sendo consideradas para contagem apenas as diluições contendo 30 a 300 UFC.

### **2.4- Atividade antagonista dos isolados bacterianos sobre *M. incognita in vitro***

#### **2.4.1- Tratamentos**

Para a avaliação da atividade antagonista *in vitro* foram realizados 17 tratamentos, sendo dois controles, controle negativo (NaCl a 0,85%, v:v) e controle positivo (produto comercial biológico QUARTZO® formulado a partir de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*) e quinze isolados bacterianos (Tabela 1). Os resultados obtidos nos testes de mortalidade de J2 e inibição da eclosão de ovos foram utilizados para selecionar os isolados mais promissores, empregados nos testes *in vivo*.

**Tabela 1.** Tratamentos utilizados nos testes de antagonismo *in vitro* sobre *Meloidogyne incognita*

| Tratamento | Descrição                              | Origem |
|------------|----------------------------------------|--------|
| T1         | Controle negativo- NaCl a 0,85%        | -      |
| T2         | Controle positivo- Quartz <sup>®</sup> | FMC    |
| T3         | Isolado bacteriano 307                 | Nooa   |
| T4         | Isolado bacteriano GB01                | Unipam |
| T5         | Isolado bacteriano GB05                | Unipam |
| T6         | Isolado bacteriano GB08                | Unipam |
| T7         | Isolado bacteriano GB10                | Unipam |
| T8         | Isolado bacteriano GB11                | Unipam |
| T9         | Isolado bacteriano GB13                | Unipam |
| T10        | Isolado bacteriano GB16                | Unipam |
| T11        | Isolado bacteriano GB20                | Unipam |
| T12        | Isolado bacteriano GB24                | Unipam |
| T13        | Isolado bacteriano GB25                | Unipam |
| T14        | Isolado bacteriano GB26                | Unipam |
| T15        | Isolado bacteriano GB27                | Unipam |
| T16        | Isolado bacteriano GB28                | Unipam |
| T17        | Isolado bacteriano GB29                | Unipam |

#### 2.4.2- Obtenção de ovos e juvenis de segundo estágio de *M. incognita*

As massas de ovos de *M. incognita* foram obtidas a partir de raízes de pimentão. Para tal, as plantas foram extraídas dos vasos e as raízes seccionadas da parte aérea e lavadas em água corrente. Em seguida, as raízes foram transferidas para frascos contendo 500 mL de solução de NaClO a 0,5% (v:v) e agitadas manualmente por 30 s. Posteriormente, o conteúdo dos frascos foram vertidos em peneiras sobrepostas de 100 e 500 mesh, onde os ovos retidos foram lavados com água corrente e depositados em um béquer (Hussey e Barker, 1973).

Para obtenção dos juvenis de segundo estágio (J2) de *M. incognita*, raízes de pimentão infectadas com o nematoide foram trituradas em liquidificador com 500 mL de água e vertidas em peneiras sobrepostas de 100 e 500 mesh. Posteriormente, o conteúdo retido na peneira de 500 mesh foi lavado em água corrente e transferido para funil de Baermann (Christie e Perry, 1951). Após 24h de incubação no escuro a 25 °C,

os J2 foram recolhidos do funil para um béquer, com auxílio de peneira de 500 mesh. As suspensões de ovos e juvenis foram quantificadas em lâmina de Peters sob objetiva de 4x no microscópio e diluídas em água para ajuste da concentração.

#### **2.4.3- Avaliação dos isolados bacterianos quanto à capacidade de inibir a eclosão de ovos de *M. incognita* in vitro**

O ensaio de eclosão foi conduzido em placas de Petri tipo rodac esterilizadas, onde foram adicionadas 3,5 mL da suspensão bacteriana e 3,5 mL de suspensão com 170 e 200 ovos de *M. incognita* no primeiro e segundo ensaio, respectivamente. Os tratamentos controles foram compostos de ovos imersos em 3,5 mL de solução salina (NaCl a 0,85 %, v:v) – controle negativo e em 3,5 mL de solução do produto comercial Quartzo<sup> </sup> (200 gramas/ha) – controle positivo. Logo após, as placas foram vedadas com filme plástico, envoltas em papel alumínio e mantidas em BOD a 25  C na ausência de luz. A percentagem de J2 eclodidos foi avaliada após 24 h, 6 dias e 12 dias de incubac o, com auxílio de microscópio em objetiva de 4x de aumento (Wille, 2013).

O experimento foi conduzido duas vezes e o delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com cinco repetições para cada tratamento. Cada placa foi considerada uma repetição.

#### **2.4.4- Avaliação nematicida in vitro dos isolados bacterianos sobre J2 de *M. incognita***

Foram adicionados em placas de Petri tipo rodac esterilizadas, 3,5 mL da suspensão bacteriana e 3,5 mL de suspensão com 50 juvenis de segundo est dio (J2) de *M. incognita* no primeiro ensaio e 80 J2 no segundo ensaio. As testemunhas foram compostas de J2 imersos em 3,5 mL solução salina (NaCl a 0,85 %, v:v) – controle negativo e 3,5 mL de solução com produto comercial Quartzo (200 gramas/ha) – controle positivo. A seguir, as placas foram vedadas com filme plástico, envoltas em papel alumínio e mantidas em BOD a 25  C na ausência de luz (Wille, 2013). A percentagem de J2 mortos foi avaliada após 24 e 48 h pela adição de 800  L de NaOH (1N) em cada placa, onde foram considerados mortos, os J2 que permaneceram com o corpo completamente distendido durante três minutos após a adição de NaOH (Chen e Dickson, 2004).

O ensaio foi realizado duas vezes, sendo o delineamento inteiramente casualizado (DIC), utilizando-se cinco repetições para cada tratamento.

## **2.5- Efeito dos isolados bacterianos sobre *M. incognita* e promoção de crescimento e atividade fotossintética em plantas de tomate**

Os isolados bacterianos que apresentaram melhor atividade antagônica nas avaliações de inibição da eclosão de ovos e mortalidade de J2 de *M. incognita*, foram selecionados para os testes *in vivo*.

### **2.5.1- Preparo do solo e infestação de *M. incognita***

O experimento foi conduzido na casa de vegetação da empresa NOAA BRASIL, localizada na rodovia BR 365 - Km 428 (latitude: 18°44'10,17"S e longitude: 46°40'7,21"O), no município Patos de Minas/MG. Foi realizada a análise de solo para realização das correções necessárias, em seguida, o solo foi autoclavado a 120 °C durante uma hora, por duas vezes, com intervalo de 24 h. Após o preparo, o solo foi colocado em vasos plásticos de 5 L de capacidade, os quais foram mantidos em casa de vegetação. Os ovos de *M. incognita* foram extraídos conforme descrito no item 2.4.2, o solo de cada vaso foi infestado com 5.000 ovos e posteriormente, foi revolvido para a homogeneização (Fernandes et al., 2018).

### **2.5.2- Inoculação das bactérias e manutenção das plantas**

As suspensões bacterianas foram aplicadas no solo com o auxílio de pulverizador manual pressurizado com dose ajustada para 1 L /ha-1, logo após a inoculação dos ovos de *M. incognita*. Subsequentemente, foram aplicados 200 mL de água esterilizada na superfície do solo, com o objetivo de permitir a percolação das células bacterianas no perfil do solo, aumentando o contato direto com os ovos do nematoide, sem resultar da perda do inóculo bacteriano. Foram usados como controles, um produto comercial biológico QUARTZO<sup>®</sup> formulado a partir de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* e um nematicida químico NIMITZ<sup>®</sup> (princípio ativo, concentração, empresa).

As mudas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) variedade Santa Cruz foram cultivadas inicialmente em bandejas com substrato. Dois dias após a inoculação do solo com os microrganismos, as mudas de tomateiro aos 40 dias de semeadura foram transplantadas para os vasos (Fernandes et al., 2018) e foi aplicada solução nutritiva, composta por ácido bórico, sulfato de cobre, sulfato de zinco, sulfato de potássio, cloreto de ferro e cloreto de manganês. As plantas foram mantidas em casa de vegetação a temperatura média de 25 °C durante 45 dias. Após esse período foram analisadas as variáveis fotossintéticas, nematológicas e promoção do crescimento do tomateiro.

O delineamento utilizado foi do tipo blocos casualizados, com oito repetições, cada vaso com uma planta representando uma unidade experimental.

### **2.5.3- Análise de variáveis fotossintéticas**

Os atributos de fluorescência e trocas gasosas foram avaliados com um analisador portátil infravermelho (LICOR 6400XT, Li-COR, Lincoln, Nebraska) em folhas totalmente expandidas após 45 dias de plantio. Taxa de assimilação de carbono ( $A$ ), condutância estomática ( $g_s$ ) e taxa de concentração interna e externa de  $CO_2$  ( $C_i/C_a$ ) foram determinadas em sistema aberto sobre luz artificial saturada ( $1.000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de fótons) e, simultaneamente, foi determinada a eficiência da captura da energia excitada pelos centros de reação do fotossistema II ( $F_v'/F_m'$ ).

### **2.5.4- Análise da promoção do crescimento**

As plantas foram cortadas na altura do colo e pesadas em balança analítica, para determinação da massa fresca da parte aérea (MFPA). Foram determinadas também as massas frescas da folha (MFF) e da raiz (MFR). O material foliar posteriormente foi submetido a secagem em estufa a  $70^\circ\text{C}$  por 48 horas para a avaliação da massa seca de folha (MSF) e parte aérea (MSPA).

### **2.5.5- Quantificação de *M. incognita* nas plantas de tomate**

Os nematoides foram extraídos das raízes utilizando a metodologia de Hussey e Barker (1973). Foram determinados os números de ovos e J2 por planta com o auxílio do microscópio, por grama de raiz e o fator de reprodução (FR), conforme metodologia proposta por Coollen e D'Herde (1972).

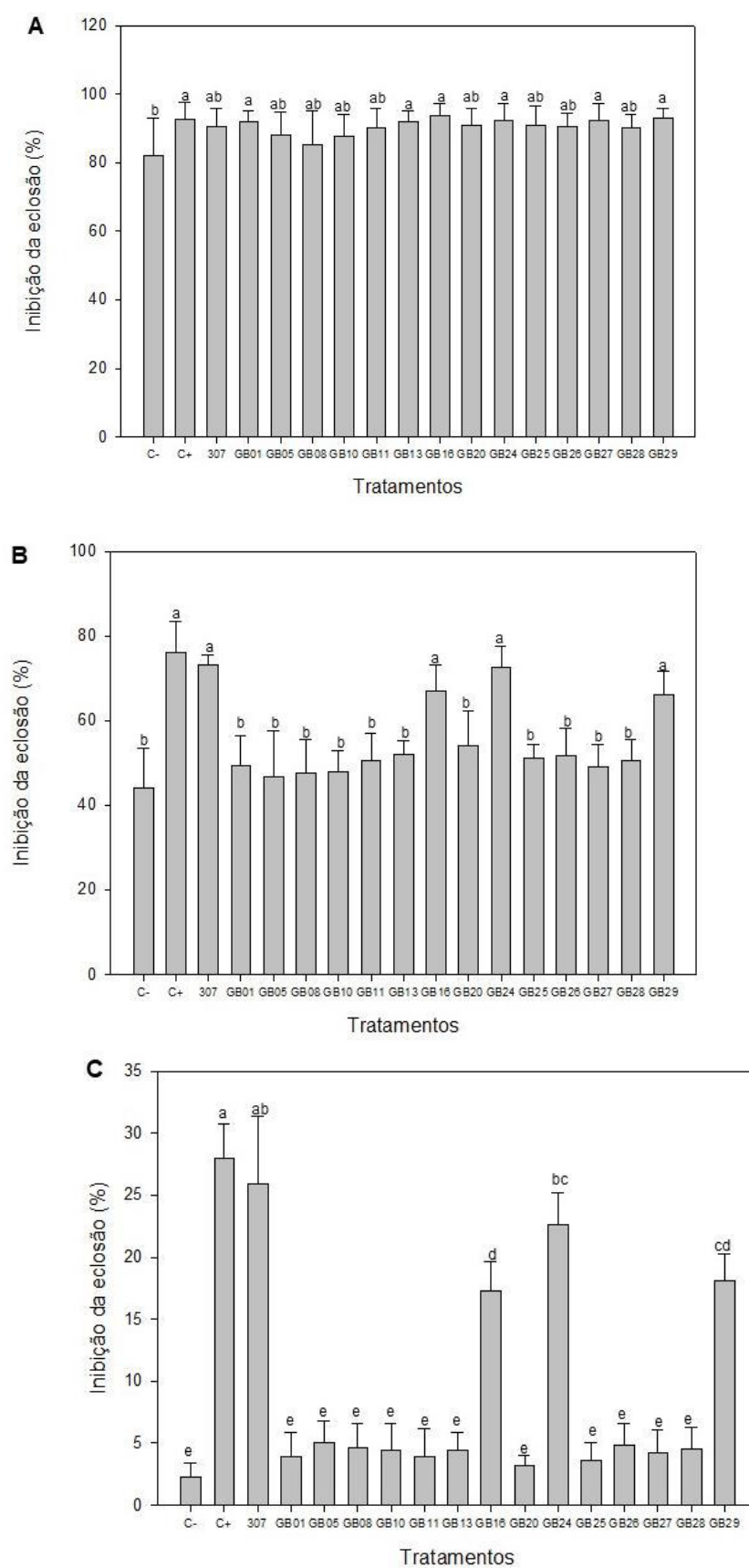
## **2.6- Análises estatísticas**

Os dados obtidos foram submetidos aos testes de Shapiro-Wilks e O'Neill-Mathews para verificar a normalidade e homogeneidade das variâncias, respectivamente, e posteriormente foi realizada a análise de variância. Quando o valor de  $P$  foi significativo ( $p < 0,05$ ), as médias foram comparadas através do teste de Tukey ( $p = 0,05$ ) com o auxílio do programa estatístico R (R Development Core Team, 2017).

## **3- RESULTADOS**

### **3.1- Inibição da eclosão dos ovos de *Meloidogyne incognita***

A eclosão de juvenis de *M. incognita* submetidos aos diferentes tratamentos com *Bacillus* spp. foi determinada em diferentes tempos, conforme apresentado na Figura 1. Após 24 h de incubação dos ovos nas soluções observou-se um percentual de inibição de eclosão significativo nos tratamentos C+ (produto comercial biológico), GB01, GB13, GB16, GB24, GB27 e GB29 (Figura 1A). Aos 6 (Figura 1B) e 12 dias (Figura 1C) de incubação dos ovos nas diferentes soluções, os tratamentos que diferiram significativamente da testemunha foram C+, isolados 307, GB16, GB24 e GB29.

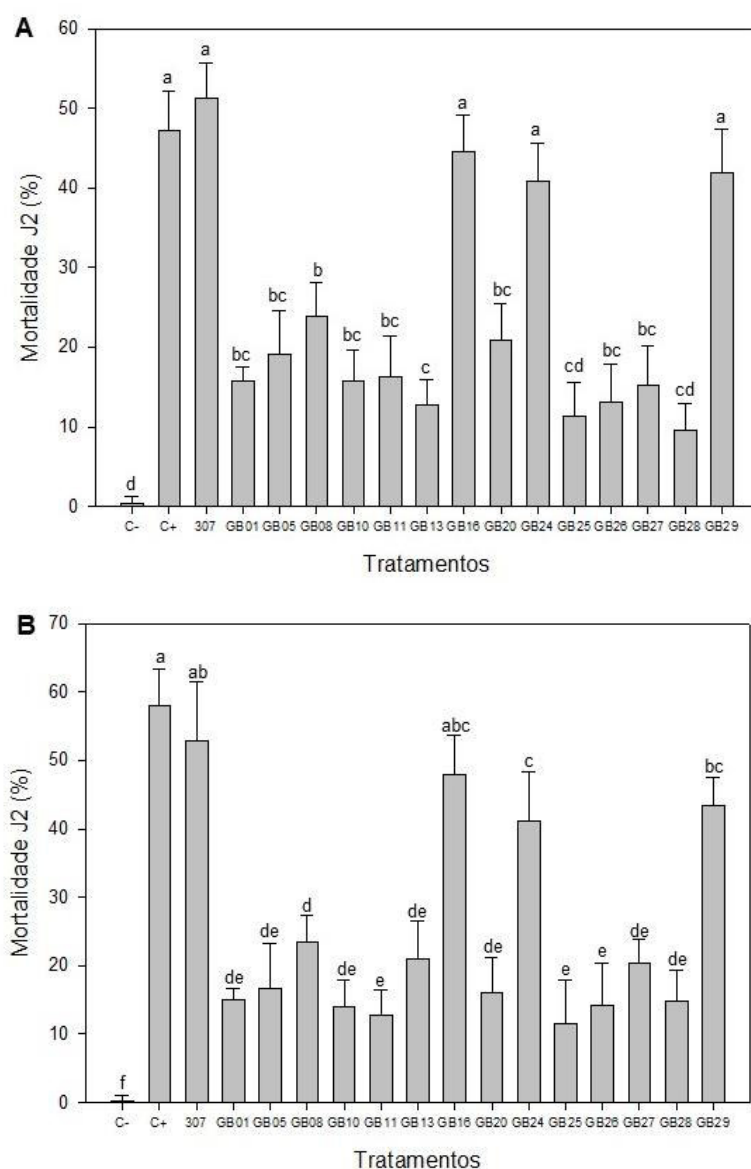


**Figura 1-** Efeito de isolados de *Bacillus* spp. na inibição da eclosão de juvenis de *Meloidogyne incognita* incubados por 24 h (A), 6 dias (B) e 12 dias (C) a 25°C na ausência de luz. As barras representam os valores médios de 10 repetições. As médias

com letras diferentes na figura diferiram entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade. C-: controle negativo (solução salina NaCl 0,85 %, v:v). C+: controle positivo (produto comercial biológico QUARTZO® formulado a partir de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*). 307 - GB29: isolados de *Bacillus* spp. Figura A – limitar em 100%

### 3.2- Mortalidade de J2 de *Meloidogyne incognita*

Os tratamentos C+ (produto comercial biológico), isolados 307, GB16, GB24 e GB29 exibiram maiores porcentagens de mortalidade de J2 a 24 e 48 h (Figura 2). Em 24 h, a mortalidade de J2 foi significativamente maior no C+ (47,22 %), 307 (51,28 %), GB16 (44,55 %), GB24 (40,90 %) e GB29 (41,92 %), comparado a testemunha (0,45 %) (Figura 2A). Nos demais tratamentos, a mortalidade variou entre 9,53 % (GB28) a 23,09 % (GB08). O mesmo foi observado no tempo de 48 h, no entanto, houve aumento no percentual de J2 mortos, C+ (58,12 %), 307 (52,77 %), GB16 (48,02 %), GB24 (41,12 %) e GB29 (43,40 %) (Figura 2B). A mortalidade nos outros tratamentos variou de 11,62 % (GB25) a 23,50 % (GB08).



**Figura 2-** Efeito de isolados de *Bacillus* spp. na mortalidade de J2 de *Meloidogyne incognita* incubados por 24 h (A) e 48 h (B) a 25°C na ausência de luz. As barras representam os valores médios de 10 repetições. As médias com letras diferentes na figura diferiram entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade. C-: controle negativo (solução salina NaCl 0,85 %, v:v). C+: controle positivo (produto comercial biológico QUARTZO<sup>®</sup> formulado a partir de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*). 307 - GB29: isolados de *Bacillus* spp.

### 3.3- Avaliação do efeito dos isolados de *Bacillus* spp. nos parâmetros fotossintéticos em tomateiros submetidos ao *M. incognita*

Os resultados obtidos indicam que a assimilação de carbono (A) e a transpiração (Fv'/Fm') nas plantas do tratamento GB16 foi maior do que os demais tratamentos (Tabela 2). A concentração interna e externa de CO<sub>2</sub> (C<sub>i</sub>/C<sub>a</sub>) também variou entre os

tratamentos, sendo observado o maior valor no tratamento GB24 (Tabela 2). A única variável analisada que não diferiu significativamente entre os tratamentos foi a condutância estomática ( $G_s$ ).

**Tabela 2-** Efeito dos isolados dos *Bacillus* spp. nas variáveis fotossintéticas em plantas de tomate sobre condições de casa de vegetação e submetidas ao nematoide de galhas, *Meloidogyne incognita*

| Tratamentos    | Variáveis Fotossintéticas |             |               |             |
|----------------|---------------------------|-------------|---------------|-------------|
|                | A                         | $G_s$       | $C_i/C_a$     | $F_v'/F_m'$ |
| C-             | 7,0±1,7 b                 | 0,09±0,02 a | 254,0±31,3 b  | 1,7±0,1 b   |
| C+ (Biológico) | 8,6±1,8 b                 | 0,10±0,03 a | 271,9±13,6 ab | 2,4±0,3 ab  |
| C+(Químico)    | 10,9±2,5 ab               | 0,13±0,06 a | 283,1±26,9 ab | 2,7±0,8 ab  |
| 307            | 8,4±2,5 b                 | 0,10±0,05 a | 264,0±26,7 ab | 2,7±1,6 ab  |
| GB16           | 15,2±1,8 a                | 0,15±0,05 a | 251,1±11,2 b  | 4,2±1,3 a   |
| GB24           | 8,2±2,0 b                 | 0,10±0,06 a | 307,4±27,2 a  | 2,0±0,7 ab  |
| GB29           | 12,2±4,5 ab               | 0,12±0,05 a | 234,4±11,7 b  | 3,4±1,7 ab  |
| CV%            | 25,5                      | 44,7        | 8,7           | 40,0        |

Média ± DP. Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade. A: assimilação de carbono.  $g_s$ : condutância estomática.  $C_i/C_a$ : taxa de concentração interna e externa de CO<sub>2</sub>.  $F_v'/F_m'$ : eficiência da captura da energia excitada pelos centros de reação do fotossistema II (transpiração). C-: controle negativo (sem aplicação de isolados de *Bacillus* spp.). C+ (Biológico): produto comercial biológico QUARTZO<sup>®</sup> formulado a partir de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*. C+ (Químico): nematicida químico comercial NIMITZ<sup>®</sup>. CV%: Coeficiente de variação.

### 3.4- Avaliação do efeito dos isolados de *Bacillus* spp. na promoção de crescimento em tomateiros submetidos ao *M. incognita*

Os isolados bacterianos não promoveram o crescimento de tomateiros infectados com *M. incognita* (Tabela 3). As porcentagens médias de redução ou aumento da biomassa de cada variável foi determinada. Em relação ao controle negativo, os tratamentos com os isolados 307, GB16 e GB24 apresentaram um aumento na MFPA de 1,5; 6,7 e 2,0 %, respectivamente (Tabela 3). Quanto a MSPA observou-se um aumento de 4,6 % no tratamento GB16, 5,3 % no GB24 e 1,5 % no GB29 (Tabela 3). Apenas o tratamento com controle químico alcançou valores de MFF (34,7 %) e MSF

(6,3 %) maior de que o controle negativo. Quanto a MFR somente o tratamento com o isolado 307 apresentou aumento de 7,3 % da biomassa, em comparação a testemunha (Tabela 3).

**Tabela 3-** Efeito dos isolados dos *Bacillus* spp. na promoção do crescimento em plantas de tomate cultivadas em condições de casa de vegetação e submetidas ao nematoide de galhas, *Meloidogyne incognita*

| Tratamento     | Variáveis de crescimento vegetal |              |            |              |           |              |            |              |             |              |
|----------------|----------------------------------|--------------|------------|--------------|-----------|--------------|------------|--------------|-------------|--------------|
|                | Folhas                           |              |            |              |           |              |            |              | Raiz        |              |
|                | MFPA                             | Variação (%) | MSPA       | Variação (%) | MFF       | Variação (%) | MSF        | Variação (%) | MFR         | Variação (%) |
| C-             | 76,1±14,8 a                      | -            | 10,7±2,2 a | -            | 5,8±2,7 a | -            | 0,47±0,2 a | -            | 27,9±8,0 a  | -            |
| C+ (Biológico) | 63,2±19,6 a                      | -16,9        | 9,1±2,9 a  | -15,5        | 4,2±2,2 a | -28,7        | 0,29±0,2 a | -37,7        | 25,6±12,8 a | -8,0         |
| C+ (Químico)   | 67,9±24,2 a                      | -10,7        | 10,3±3,8 a | -4,4         | 7,9±5,0 a | 34,7         | 0,50±0,1 a | 6,3          | 15,9±6,8 a  | -43,1        |
| 307            | 77,3±10,6 a                      | 1,5          | 10,5±1,7 a | -2,2         | 2,9±1,5 a | -49,7        | 0,21±0,1 a | -56,1        | 29,9±9,4 a  | 7,3          |
| GB16           | 81,3±8,7 a                       | 6,7          | 11,2±1,6 a | 4,6          | 3,1±1,5 a | -47,1        | 0,23±0,1 a | -51,4        | 25,4±9,9 a  | -8,7         |
| GB24           | 77,7±11,9 a                      | 2,0          | 11,3±2,4 a | 5,3          | 2,8±1,1 a | -51,8        | 0,21±0,1 a | -55,6        | 26,7±16,4 a | -4,1         |
| GB29           | 74,6±10,8 a                      | -2,0         | 10,9±2,2 a | 1,5          | 1,7±0,9 a | -70,7        | 0,18±0,1 a | -61,7        | 23,0±9,6 a  | -17,4        |
| CV%            | 20,9                             |              | 24,6       |              | 112,9     |              | 112,9      |              | 41,7        |              |

Os valores representam a média de 8 repetições. Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente segundo o teste de Tukey a 5% de probabilidade. Valores negativos na variação (%) indica redução da biomassa e valores positivos, aumento da biomassa em relação ao controle negativo. C-: controle negativo (sem aplicação de isolados de *Bacillus* spp.). C+ (biológico): produto comercial biológico QUARTZO<sup>®</sup> formulado a partir de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*. C+ (químico): nematicida químico comercial NIMITZ<sup>®</sup>. MFPA: massa fresca da parte aérea. MSPA: massa seca da parte aérea. MFF: massa fresca da folha. MSF: massa seca da folha. MFR: massa fresca da raiz.

### **3.5- Avaliação do efeito dos isolados de *Bacillus* spp. no controle de *M. incognita* em tomateiros**

Todos os isolados de *Bacillus* spp. avaliados exibiram um efeito significativo ( $p < 0,05$ ) no controle de *M. incognita* em plantas de tomate (Tabela 4). A porcentagem média total da redução dos nematoides foi calculada para evidenciar melhor as diferenças entre os tratamentos. Foi observado que as maiores médias percentuais de redução dos nematoides foi alcançado usando os isolados 307 (59,08 %) e GB24 (58,91 %) em comparação ao controle negativo. Já o isolado GB29 exibiu uma redução média de 39,56 % dos nematoides. Em relação aos controles positivos, vale ressaltar que os isolados 307 e GB24 apresentaram maior percentual de redução de *M. incognita* do que o produto comercial biológico utilizado como controle (56,23 %). Nenhum tratamento ultrapassou o percentual médio de redução obtido nos ensaios com o nematicida químico (84,12 %).

**Tabela 4-** Efeito dos isolados dos *Bacillus* spp. nos parâmetros reprodutivos de *Meloidogyne incognita* em plantas de tomate cultivadas em condições de casa de vegetação

| Tratamentos    | Parâmetros do nematoide |          |               |          |                                           |          |             |          |                         |
|----------------|-------------------------|----------|---------------|----------|-------------------------------------------|----------|-------------|----------|-------------------------|
|                | Ovos/g de raiz          |          | J2/g de raiz  |          | Total de nematoides (Ovos + J2)/g de raiz |          | FR          |          | Redução média total (%) |
|                | Nº                      | Red. (%) | Nº            | Red. (%) | Nº                                        | Red. (%) | Nº          | Red. (%) |                         |
| C-             | 1128,50±534 a           | -        | 617,65±355 a  | -        | 1746,25±771 a                             | -        | 8,98±2,8 a  | -        | -                       |
| C+ (Biológico) | 498,50±303 bc           | 55,82    | 278,62±141 bc | 54,90    | 776,87±427 bc                             | 55,50    | 3,73±3,0 b  | 58,70    | 56,23                   |
| C+ (Químico)   | 222,87±123 c            | 80,25    | 102,37±76 c   | 83,41    | 325,25±289 c                              | 81,37    | 0,76±0,3 c  | 91,48    | 84,12                   |
| 307            | 386,37±253 bc           | 65,76    | 287,75±116 bc | 53,40    | 674±299 bc                                | 61,39    | 3,97±2,2 b  | 55,78    | 59,08                   |
| GB16           | 633,25±353 bc           | 43,88    | 343,87±159 bc | 44,33    | 977,12±424 b                              | 44,04    | 4,77±2,5 b  | 46,93    | 44,79                   |
| GB24           | 500,62±268 bc           | 55,62    | 245,62±155 bc | 60,21    | 746,37±406 bc                             | 57,24    | 3,37±1,8 bc | 62,58    | 58,91                   |
| GB29           | 704,62±395 c            | 37,56    | 400,75±222 ab | 35,14    | 1105,12±444 c                             | 36,70    | 4,6±1,6 b   | 48,84    | 39,56                   |
| CV%            | 53,05                   |          | 51,36         |          | 42,59                                     |          | 40,94       |          |                         |

Os valores representam a média de oito repetições. Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente segundo o teste de Tukey a 5% de probabilidade. FR: fator de reprodução do nematoide. Red (%): porcentagem de redução do número de nematoides em relação ao controle. C-: controle negativo (sem aplicação de isolados de *Bacillus* spp.). C+ (Biológico): produto comercial biológico QUARTZO<sup>®</sup> formulado a partir de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*. C+ (químico): nematicida químico comercial NIMITZ<sup>®</sup>. CV%: coeficiente de variação.

#### 4- DISCUSSÃO

Os isolados 307, GB16, GB24 e GB29 destacaram-se pela capacidade de inibir a eclosão de ovos e aumentar a mortalidade de J2 de *M. incognita*, apresentando atividade nematocida *in vitro* e *in vivo*. A produção de endotoxinas e outras substâncias diversas por *Bacillus* spp. tem sido relacionada à interferência no ciclo reprodutivo, principalmente a ovoposição e a eclosão dos juvenis dos nematoides (Sharma e Gomes, 1996; Abd-Al-Khair et al., 2019).

Cetintas et al. (2018) verificaram que o gênero *Bacillus* exsudam enzimas na rizosfera das plantas que são capazes de degradar a massa protetora que envolve os ovos dos nematoides levando-os a desidratação, o que por consequência inviabiliza a eclosão. Similarmente, Neugebauer et al. (2019) reportaram que quitinases, proteases e lipases estão intimamente relacionadas à degradação da massa de ovos de nematoides. A casca dos ovos do *M. incognita*, que atua como proteção aos agentes químicos, é formado por três camadas: a externa chamada camada vitelínica, a camada média quitinosa que é formada por uma matriz proteica de microfibrilas de quitina e a mais interna que é constituída por uma camada lipídica (Bird e McClure, 1976). Esta última é a responsável pela impermeabilização da casca dos ovos, enquanto as outras garantem a estruturação. As enzimas hidrolíticas produzidas pelos *Bacillus* spp. podem atuar nesses componentes estruturais, inviabilizando os embriões, sendo portanto, um possível mecanismo de controle biológico. Assim como o efeito sobre a massa de ovos, essas enzimas também possuem a capacidade de atrasar a eclosão de J2, o que leva a mortalidade das formas infectantes dos nematoides ou atuam interferindo o processo de reconhecimento da planta hospedeira (Messa et al., 2019).

Os resultados das avaliações *in vivo* mostraram que as plantas dos tratamentos com as bactérias do gênero *Bacillus* aumentaram a assimilação de carbono (A), a transpiração e a concentração de CO<sub>2</sub>. O aumento na A indica aumento na fotossíntese que por sua vez aumenta a produção de fotoassimilados (Taiz et al., 2017) que podem estar sendo direcionados para os mecanismos de defesa da planta ou para alimentação dos nematoides (Figueiredo et al., 2020).

Algumas espécies do gênero *Bacillus* são promotoras de crescimento, devido à capacidade de produzirem hormônios, antibióticos e sideróforos, além de auxiliar na assimilação e solubilização de nutrientes para as plantas (Baysal e Tor, 2014; Wu et al., 2015). Porém, os efeitos dos exsudatos são variáveis e dependentes da cultura na qual estão associadas. Assim, a ausência de diferença significativa na promoção de crescimento entre os tratamentos com e sem as bactérias, pode indicar que as bactérias estudadas não possuem a capacidade de produzir substâncias promotoras de crescimento vegetal ou não promovem esses efeitos quando associadas ao tomateiro.

A redução no número de ovos e J2 de *Meloidogyne* nas raízes do tomateiro pode estar relacionada a colonização dos ovos do patógeno pelos exsudatos radiculares ou pela indução de resistência sistêmica da planta pelas bactérias aplicadas (D'Errico et al., 2019). Plantas de tomate colonizadas por *Bacillus* tendem a alterar a composição de metabólitos exsudatos pelas raízes tornando-as menos atraentes ou repelentes para J2 (Li et al., 2019). A indução de resistência pode ocorrer também pelo aumento na produção de lignina, o que confere uma barreira física que dificulta a infecção pelo patógeno, ou pelo aumento na transcrição de genes que ativam enzimas no metabolismo de defesa, como quitinase, lipoxigenase, peroxidase,  $\beta$ -1,3-glucanase e chalcona sintase (Zhou et al., 2021).

## 5- CONCLUSÃO

Os isolados de *Bacillus* 307, GB16, GB24 e GB29 controlaram *M. incognita* *in vitro* e *in vivo*. Os isolados 307 e GB24 apresentaram porcentual médio de redução dos nematoides superiores ao produto comercial biológico à base de *B. subtilis* e *B. licheniformis*, sendo, portanto, os mais indicados e mostrando-se mais eficientes no controle do *M. incognita*. Dessa forma, pode-se concluir que os isolados 307 e GB24 possuem potencial para o controle do nematoide das galhas em tomateiro.

## 6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABD-EL-KHAIR, H.; EL-NAGDI, W. M. A.; YOUSSEF, M. M. A.; ABD-ELGAWAD, M. M. M.; DAWOOD, M. G. Protective effect of *Bacillus subtilis*, *B. pumilus*, and *Pseudomonas fluorescens* isolates against root knot nematode *Meloidogyne incognita* on cowpea. **Bulletin of the National Research Centre**, v. 43, n. 64, p. 1-7, 2019.
- ADAM, M.; HEUER, H.; HALLMANN, J. Bacterial antagonists of fungal pathogens also control root-knot nematodes by induced systemic resistance of tomato plants. **PloS One**, v. 9, n. 2, p. e90402, 2014.
- BAYSAL, O.; TOR, M. Smart biologics for crop protection in agricultural systems. **Turkey Journal Agriculture Formation**, v. 38, p. 723- 731, 2014.
- BIRD, A. F.; MCCLURE, M. A. The tylenchid (Nematoda) egg shell: structure, composition and permeability. **Parasitology**, v. 72, p. 19-28, 1976.

BUCHANAN, R. E.; GIBBONS, N. E. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**, 8th ed. Williams & Wilkins Co., Baltimore. 1984. 1246 p.

CAO, H.; JIAO, Y.; YIN, N.; LI, Y.; LING, J.; MAO, Z.; YANG, Y.; XIE, B. Analysis of the activity and biological control efficacy of the *Bacillus subtilis* strain Bs-1 against *Meloidogyne incognita*. **Crop Protection**, v. 122, p.125-135, 2019.

CETINTAS, R.; KUSEK M.; FATEH, S. A. Effect of some plant growth-promoting rhizobacteria strains on root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*, on tomatoes. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 28, n. 7, p. 1-5, 2018.

CHEN, Z. X.; DICKSON, D. W. Biological control of nematodes with bacterial antagonists. In: CHEN, Z. X.; CHEN, S. Y.; DICKSON, D. W. (Ed). **Nematology – Advances and Perspectives**. Volume II: Nematode Management and Utilization. Beijing & Wallingford: Tsinghua University Press & CABI Publishing, 2004. 1041-1062 p.

CHINHEYA, C. C.; YOBO, K. S.; LAING, M. D. Biological control of the root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* (Chitwood) using *Bacillus* isolates, on soybean. **Biological Control**, v. 109, p. 37-41, 2017.

CHOUDHARY, D.; JOHRI, B. Interactions of *Bacillus* spp. and plants – with special reference to induced systemic resistance (ISR). **Microbiological Research**, v. 164, p. 493-513, 2009.

CHRISTIE, J. R.; PERRY, V. G. Removing nematodes from the soil. **Proceedings of the Washington Helminthological Society**, v.18, p.106-108, 1951.

COOLEN, W, A.; D'HERDE, C, J. A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue. **State Agriculture Research Center – GHENT**, Belgium. 1972. p.77

D'ERRICO, G.; MARRA, R.; CRESCENZI, A.; DAVINO, S. W.; FANIGLIULO, A.; WOO, S. L.; LORITO, M. Integrated management strategies of *Meloidogyne incognita* and *Pseudopyrenochaeta lycopersici* on tomato using a *Bacillus firmus*-based product and two synthetic nematicides in two consecutive crop cycles in greenhouse. **Crop Protection**, v. 122, p. 159-164, 2019.

EXPÓSITO, A.; GARCIA, S.; GINÉ, A.; ESCUDERO, N.; SORRIBAS, F. J. *Cucumis metuliferus* reduces *Meloidogyne incognita* virulence against the Mi1.2 resistance gene in a tomato–melon rotation sequence. **Pest Management Science**, v. 75, p. 1902–1910, 2019.

FERNANDES, R. H.; LOPES, E. A.; BONTEMPO, A. F.; FUGA, C. A. G.; VIEIRA, B. S. *Bacillus* spp. isolates for the control of *Meloidogyne incognita* in common bean. **Científica**, v. 46, n. 3, p. 235-240, 2018.

FIGUEIREDO, F. R. A.; NÓBREGA, J. S.; RIBEIRO, J. E. S.; SILVA, T. I.; ALBUQUERQUE, M. B.; PODESTÁ, G. S.; NASCIMENTO, L. C.; CORRÊA, E. B. Physiological changes in *Solanun lycopersicum* L. in the presence of root-knot nematodes and salicylic acid. **Bioscience Journal**, v. 36, n. 6, p. 2032-2040, 2020.

HAJIHASSANI, A.; DAVIS, R. F.; TIMPER, P. Evaluation of selected nonfumigant nematicides on increasing inoculation densities of *Meloidogyne incognita* on cucumber. **Plant Disease**, v. 103, n. 12, p. 3161-3165, 2019.

HUANG, Y.; MA, C.; ZHANG, L.; DUAN, K.; MO, C.; HE, M. Characterisation of volatiles produced from *Bacillus megaterium* YFM3.25 and their nematocidal activity against *Meloidogyne incognita*. **European Journal Plant Pathology**, v. 126, p. 417-422, 2010.

HUSSEY, R. S.; BARKER, K. R. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. **Plant Disease Reporter**, v.57, p.1025-1028, 1973.

KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v. 60, p. 969-976, 1970.

KEPENEKCI, I.; HAZIR, S., LEWIS, E. Evaluation of entomopathogenic nematodes and control of the root-knot nematodes *Meloidogyne incognita* and *Meloidogyne arenaria*. **Pest Management Science**, v. 72, p. 327–334, 2016.

KEPENEKCI, I.; HAZIR, S.; OKSAL, E.; LEWIS E. E. Application methods of *Steinernema feltiae*, *Xenorhabdus bovienii* and *Purpureocillium lilacinum* to control root-knot nematodes in greenhouse tomato systems. **Crop Protection**, v. 108, p. 31-38, 2018.

LI, X.; HU, H. J.; LI, J. Y.; WANG, C.; CHEN, S. L.; YAN, S. Z. Effects of the endophytic bacteria *Bacillus cereus* BCM2 on tomato root exudates and *Meloidogyne incognita* infection. **Plant Disease**, v. 103, p. 1551-1558, 2019.

LIAN, L. H.; TIAN, B. Y.; XIONG, R.; ZHU, M. Z.; XU, J.; ZHANG, K. Q. **Proteases from *Bacillus*: a new insight into the mechanism of action for rhizobacterial suppression of nematode populations.** *Letters in Applied Microbiology*, v. 45, n. 3, p. 262-269, 2007.

LUO, T.; HOU, S.; YANG, L.; QI, G.; ZHAO, X. Nematodes avoid and are killed by *Bacillus mycoides*-produced styrene. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 159, p. 129-136, 2018.

MA, Y. Y. LI, Y. L.; LAI, H. X.; GUO, Q.; XUE, Q. H. Effects of two strains of *Streptomyces* on root-zone microbes and nematodes for biocontrol of root-knot nematode disease in tomato. **Applied Soil Ecology**, v. 112, p. 34-41, 2017.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Controle biológico.** Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 388. 2000.

MESSA, V. R.; NUNES, J.; MATTEI, D. Seed treatment with *Bacillus amyloquefaciens* for the control of *Meloidogyne javanica* “in vivo” bean culture and its direct effect on the motility, mortality and hatching of *M. javanica* “in vitro”. **Agronomy Science and Biotechnology**, v. 5, n. 2, p. 59-69, 2019.

MOHAMMED, S. H.; EL SAEDY, M. A.; ENAN, M. R.; IBRAHIM, N. E.; GHAREEB, A.; MOUSTAFA, S. A. Biocontrol efficiency of *Bacillus thuringiensis* toxins against root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. **Journal of Cell and Molecular Biology**, v. 7, n. 1, p. 57-66, 2008.

MURUNGI, L., KIRWA, H., COYNE, D., TEAL, P., BECK, J., TORTO, B. Identification of key rhizobacteria on cotton. **Plant Disease**, v.101, p. 774-784, 2018.

NEUGEBAUER, W. C.; GOMES, C. B.; MOTA, M. Seleção de bactérias para controle biológico de *Meloidogyne incognita* em figueira. **Revista de la Facultad de Agronomía**, v. 118, n. 1, p. 51-60, 2019.

NIU, Q.; XIAOWEI, H.; BAOYU, T.; JINKUI, Y.; JIANG, L.; LIN, Z.; KEQIN, Z. *Bacillus* sp. B16 kills nematodes with a serine protease identified as a pathogenic factor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 69, n. 6, p. 722-730, 2006.

OOSTENBRINK, R. Major characteristics of the relation between nematodes and plants. **Mededeelingen der Landbouw-Hoogeschool**, v. 66, n. 3, p. 1-46, 1966.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. 2017. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.

SHARMA, R.D.; GOMES, A.C. Effect of *Bacillus* spp. toxins on oviposition and juvenile hatching of *Heterodera glycines*. **Nematologia Brasileira**, v. 20, p. 53-62, 1996

SIDDIQUI, I. A.; HASS, D.; HEEB, S. Extracellular protease of *Pseudomonas fluorescens* CHA0, a biocontrol factor with activity against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 9, p. 5646-5649, 2005.

SILVA, E. H. C.; SOARES, R. S.; DINIZ, G. M.; FRNACO, C. A.; MARIN, M. V.; CANDIDO, W. S.; BRAZ, L. T.; SOARES, P. L. M. Grafting as a management tool to control *Meloidogyne incognita* in okra: Identifying rootstocks candidates. **Scientia Horticulturae**, v. 246, p. 354–359, 2019.

STATSOFT. **Statistica for Windows**. Versão 7.0. Tulsa: Statsoft Inc., 2004.

TAIZ, L. ZEIGER, E.; MOLLER, I. M.; MURPHY, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 888 p.

TAYLOR, A. L.; SASSER, J. N. **Biology, identification and control of root-knot nematodes**. Raleigh: North Carolina State University Graphics, 1978. 111p.

TEREFE, M.; TEFERA, T.; SAKHUJA, P. K. Effect of a formulation of *Bacillus firmus* on root-knot nematode *Meloidogyne incognita* infestation and the growth of tomato plants in the greenhouse and nursery. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 100, p. 94-99, 2009.

VOSS, G. B. Produção de *Bacillus subtilis* em biorreatores airlift e sua aplicação no controle de nematoide de galhas do tomateiro. **Dissertação** (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2013. 115p.

WILLE, C.N. 2013. Potencial de bactérias isoladas de raízes de figueira e folhelhos pirobetuminosos no controle de *Meloidogyne incognita* em *Ficus carica* cv Roxo de Valinhos. **Tese**. (Doutorado em Agronomia, Área de Concentração em Fitossanidade) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 104f.

WU, L.; WU, H.; QIAO, J.; GAO.; BORRISS, R. Novel routes for improving biocontrol activity of *Bacillus* based bioinoculants. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. 1395, 2015.

XIA, Y.; LI, S.; LIU, X.; ZHANG, C.; XU, J.; CHEN, Y. *Bacillus halotolerans* strain LYSX1-induced systemic resistance against the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* in tomato. **Annals of Microbiology**, v. 69, p. 1227-1233, 2019.

XIANG, NI.; LAWRENCE, K. S.; KLOEPPER, J. W.; DONALD, P. A.; LAWRENCE, J. A. M. G. W. Biological Control of *Meloidogyne incognita* by spore-forming plant growth-promoting rhizobacteria on cotton. **Plant Disease**, v. 101, n. 5, p. 774-784, 2017.

ZHOU, C.; ZHU, J.; QIAN, N.; GUO, J.; YAN, C. *Bacillus subtilis* SL18r induces tomato resistance against *Botrytis cinerea*, involving activation of long non-coding RNA, MSTRG18363, to decoy miR1918. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 1-14, 2021.