

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

MILENA BARBOSA PARREIRA DA SILVA

Eficácia de isolados bacterianos na mortalidade de *Meloidogyne exigua*

ALEGRE – ES

2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

MILENA BARBOSA PARREIRA DA SILVA

Eficácia de isolados bacterianos na mortalidade de *Meloidogyne exigua*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção de título de Mestre em Agronomia, na área de concentração de Agronomia, Linha de pesquisa Proteção sustentável de Plantas.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Ramos Alves

Coorientador: Prof. Dr. André Xavier da Silva

ALEGRE – ES

2023

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de
Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

S586e Silva, Milena, 1999-
Eficácia de isolados bacterianos na mortalidade de
Meloidogyne exigua / Milena Silva. - 2023.
48 f. : il.

Orientador: Fábio Alves.

Coorientador: André Xavier.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal
do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias.

I. Alves, Fábio. II. Xavier, André. III. Universidade Federal
do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias.
IV. Título.

CDU: 63


EFICÁCIA DE ISOLADOS BACTERIANOS NA MORTALIDADE DE *Meloidogyne exigua*

Milena Barbosa Parreira da Silva


Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Agronomia do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Agronomia na área de Proteção sustentável de plantas.

Aprovada em 14 de fevereiro de 2023.


Comissão examinadora:

Documento assinado digitalmente
 ELCIO DO NASCIMENTO CHAGAS
Data: 12/03/2023 07:40:11-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>


Prof. Dr. Elcio do Nascimento Chagas
Instituto Federal do Espírito Santo – Campus Alegre
Membro Externo

Documento assinado digitalmente
 FERNANDA PEREIRA DA SILVA
Data: 10/03/2023 13:55:56-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. Fernanda Pereira da Silva
Universidade Federal do Espírito Santo
Membro Interno

Documento assinado digitalmente
 WILLIAN BUCKER MORAES
Data: 09/03/2023 17:28:20-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. William Bucker Moraes
Universidade Federal do Espírito Santo
Membro Interno

Documento assinado digitalmente
 FABIO RAMOS ALVES
Data: 13/03/2023 09:49:13-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. Fábio Ramos Alves
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por todas as bênçãos concedidas em todo percurso de minha trajetória acadêmica, por ter me dado força e sabedoria para alcançar mais essa vitória.

Minha vida tem sido marcada por realizações diárias, que às vezes não dou o devido valor, mas eu sei que a graça de Deus se faz presente em todos os momentos.

A Universidade Federal do Espírito Santo – UFES. Ao Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCAUE-UFES) e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia (PPGAG), pela oportunidade de cursar o mestrado;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Fábio Ramos Alves pela orientação, ensinamentos, dedicação, paciência, por me incentivar a buscar a fazer sempre o melhor, contribuindo para o meu crescimento profissional e pessoal.

Ao coorientador Dr. André da Silva Xavier por todo apoio concedido durante o mestrado e pelos ensinamentos que me tornarem uma pessoa e uma profissional melhor;

Ao Laboratório BIOTA, pelo espaço cedido para a realização dos procedimentos experimentais;

Aos membros da banca por suas contribuições ao meu trabalho;

Aos integrantes dos laboratórios NEMATUFES, LAVIB e LEMP que me auxiliaram ao longo do mestrado, em especial ao Caio Portes Deorce Pimenta, Rayla Vieira Frangilo, Íris Petronilia Dutra, Gabrielle Ferreira da Silva e Breno Benvindo dos Anjos;

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) – Código de Financiamento 001

Gratidão!

Porque a sabedoria serve de proteção, como de proteção serve o dinheiro; mas a excelência do conhecimento é que a sabedoria dá vida ao seu possuidor.

Ec, 7,12.

BIOGRAFIA

Milena Barbosa Parreira da Silva, filha de Ademir correia da Silva e Isabel Barbosa Parreira da Silva, nasceu em Alegre, Espírito Santo, no dia 15 de abril de 1999. Graduada em Licenciatura em Ciências Biológicas em março de 2021, pelo instituto Federal do espírito Santo. Durante o período de graduação atuou como voluntária no Setor de Agroecologia do IFES-Campus de Alegre (2017), pelo Programa de Iniciação Científica PIBIC (2017-2018). Foi bolsista da Fundação de Amparo à pesquisa e Inovação do Espírito Santo Programa de Iniciação tecnológica-FAPES (2019-2020). Em fevereiro de 2021 iniciou o Mestrado no Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal da Universidade Federal do Espírito Santo, atuando na área de Proteção sustentável de plantas, sob orientação do Prof. Dr. Fábio Ramos Alves, submetendo-se à defesa de dissertação em fevereiro de 2023.

RESUMO

Um dos métodos mais utilizados para o manejo de *M. exigua* é através da aplicação de nematicidas químicos, porém, esses produtos são prejudiciais aos animais, ao homem e ao meio ambiente, por isso têm-se buscado formas alternativas de manejo desse patógeno, como o uso de bactérias antagonistas. Dois experimentos (experimentos 1 e 2) foram conduzidos e repetidos uma vez. No primeiro estudou-se o efeito de isolados bacterianos obtidos a partir de biofertilizantes comerciais na mortalidade de *M. exigua* 'in vitro'. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado (DIC) com 22 tratamentos (20 isolados bacterianos + um controle positivo + uma testemunha negativa) e quatro repetições, totalizando 88 unidades experimentais. Sete dos vinte isolados bacterianos (B74, B75, B84, B85, B86, B88, B121), demonstraram efeito na mortalidade de J2s de *M. exigua* após 24 horas de incubação. As bactérias B74, B75, B84, B86 e B88 foram identificadas e pertencem ao gênero *Bacillus* sp., já os isolados B85 e B121 foram identificadas como *Micrococcus* sp. e *Brevibacterium epidermidis*, respectivamente. Os isolados B88, B74, B121, B86 apresentaram percentuais de mortalidade superiores a 75%, já o B75, B84 e B85 atingiram percentuais superiores a 57%. No segundo experimento foi feita a seleção e o teste de compatibilidade entre os isolados bacterianos antagonistas a *M. exigua* mais promissores no experimento 1. O delineamento experimental foi DIC com 9 tratamentos (7 isolados bacterianos + uma controle positiva + uma testemunha negativa) e quatro repetições. Não houve efeito antagônico entre os isolados bacterianos estudados. Os resultados dos experimentos 1 e 2 evidenciam o potencial, principalmente dos isolados B121, B74, B86, B88, como possíveis agentes de controle biológico de *M. exigua* e indicam que essas bactérias podem ser empregadas de forma combinada para manejo dos fitonematoides, pois elas não têm efeito antagônico entre si.

Palavras-chave: Nematóide das galhas, Isolados bacterianos, antagonista, Controle biológico.

ABSTRACT

One of the most used methods for managing *M. exigua* is through the application of chemical nematicides, however, these products are harmful to animals, humans and the environment, which is why alternative ways of managing this pathogen have been sought, such as the use of antagonistic bacteria. Two experiments (experiments 1 and 2) were carried out and repeated once. In the first, the effect of bacterial isolates obtained from commercial biofertilizers on the mortality of *M. exigua* 'in vitro' was studied. The experimental design was completely randomized (CRD) with 22 treatments (20 bacterial isolates + one positive control + one negative control) and four replications, totaling 88 experimental units. Seven out of twenty bacterial isolates (B74, B75, B84, B85, B86, B88, B121), demonstrated effect on the mortality of *M. exigua* J2s after 24 hours of incubation. Bacteria B74, B75, B84, B86 and B88 were identified and belong to the genus *Bacillus* sp., whereas isolates B85 and B121 were identified as *Micrococcus* sp. and *Brevibacterium epidermidis*, respectively. Isolates B88, B74, B121, B86 showed mortality percentages greater than 75%, whereas B75, B84 and B85 reached percentages greater than 57%. In the second experiment, the selection and compatibility test was carried out between the most promising bacterial isolates antagonistic to *M. exigua* in experiment 1. The experimental design was CRD with 9 treatments (7 bacterial isolates + one positive control + one negative control) and four repetitions. There was no antagonistic effect among the studied bacterial isolates. The results of experiments 1 and 2 show the potential, mainly of isolates B121, B74, B86, B88, as possible biological control agents for *M. exigua* and indicate that these bacteria can be used in combination for the management of phytonematodes, as they do not have an antagonistic effect on each other

Key words: Root-knot nematode, Bacterial isolates, antagonist, Biological control.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADE: Água Destilada Esterilizada;

KADO: Meio de cultura Kado; **CN:**

Caldo nutriente

COVs: Compostos Orgânicos Voláteis;

BIOTA: Laboratório de Biotecnologia Agrícola e Ambiental

NEMATUFES: Laboratório de Nematologia da UFES

NUDEMAFI: Núcleo de Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Manejo Fitossanitário de Pragas e Doenças;

D.O: Densidade óptica

UFES: Universidade Federal do Espírito Santo;

NPPs: Nematoides parasitas de Plantas

NGs: Nematoides de galhas

RPCPs: Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas

VOCs: Compostos orgânicos voláteis

GLM: Modelos lineares generalizados

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Modelo de posicionamento de poços em placas de Petri contendo meio Kado para caracterização da interação neutra ou antagônica entre isolados bacterianos (B86, B88, B121, B74, B75, B84 e B85 + testemunha positiva e testemunha negativa).....	25
Figura 2 - Percentual de mortalidade (%) de <i>M. exigua</i> após tratamentos por 24 horas com isolados bacterianos (B74, B75, B84, B85, B86, B88, B121) - Exp1.....	26
Figura 3 - Percentual de mortalidade (%) de <i>M. exigua</i> após tratamentos por 24 horas com isolados bacterianos (B74, B75, B84, B85, B86, B88, B121)- Exp2.....	27
Figura 4 - Avaliação da compatibilidade dos sete isolados bacterianos (B74, B75, B84 e B85, B86, B88 e B121) obtidos a partir de dois biofertilizantes comerciais: i) um produto orgânico contendo cepas de <i>Bacillus subtilis</i> , <i>B. licheniformis</i> e <i>Lactobacillus sp.</i> ; ii) um produto fluido 100% orgânico rico em matéria orgânica (ácidos húmicos e fúlvicos).	31
Figura 5 - Média do percentual de mortalidade (%) de <i>M. exigua</i> após tratamentos por 24 horas com 20 isolados bacterianos no Exp1 e Exp2.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Sequenciamento de amostras de colônias bacterianas provenientes do laboratório de Nematologia - Nudemafi – Ufes	28
Tabela 2- Percentual de mortalidade– Teste T.....	26
Tabela 3 – Clusters formados do Fingerprint genômico utilizando Rep-PCR.	43

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1	Nematoides das galhas (<i>Meloidogyne</i> spp.)	16
2.2	Importância de <i>Meloidogyne exigua</i>	17
2.3	Utilização de bactérias no manejo de <i>Meloidogyne</i> spp.....	17
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1	Área experimental.....	21
3.2	Período de condução do experimento.....	21
	Experimento 1. Efeito de isolados bacterianos obtidos a partir de biofertilizantes na mortalidade de <i>M. exigua</i>	21
3.3	Obtenção dos isolados bacterianos	21
3.4	Obtenção e preparo do inoculo de <i>M. exigua</i>	22
3.5	Teste de mortalidade de J2s de <i>M. exigua</i> 23	
3.6	Análise estatística.	23
	Experimento 2. Seleção e teste de compatibilidade entre isolados bacterianos antagonistas de <i>M. exigua</i>	24
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1.	Efeito de isolados bacterianos obtidos a partir de biofertilizantes na mortalidade de <i>M. exigua</i>	26
4.2.	Seleção e teste de compatibilidade entre isolados bacterianos antagonistas de <i>M. exigua</i>	31
5	CONCLUSÃO.....	35
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35
	ANEXOS.....	43

1 INTRODUÇÃO

Os nematoides são encontrados em uma imensa variedade de habitats. Muitas espécies são saprofíticas enquanto outras se alimentam de bactérias, fungos, e outros organismos, e há ainda aqueles que são parasitas de plantas. O que diferencia um fitonematoide de outros grupos de nematoides é a presença de estilete no aparelho bucal, órgão em forma de agulha hipodérmica que o patógeno utiliza para perfurar as células da planta hospedeira para obter seu alimento (FERRAZ & BROWN, 2016).

Entre os nematoides parasitas de plantas (NPPs) os do gênero *Meloidogyne*, ou nematoides das galhas (NGs) estão entre os mais importantes. Esses fitopatógenos atacam as raízes de plantas causando aumento no número e tamanho das células, cujo sintoma típico é a formação de galhas radiculares (NEVES *et al.*, 2021). Algumas espécies estão incluídas como as mais importantes economicamente, por estarem amplamente distribuídas em todo o mundo e pelos danos que causam às plantas hospedeiras (MATTOS, 2017). *Meloidogyne exigua* Goeldi, 1887, é uma espécie bastante disseminada nos cafezais brasileiros e o efeito do parasitismo desse nematoide pode causar redução de 50 a 68,2% na produção de *Coffea arabica* L. (GUERRA NETO *et al.*, 1985).

Por se tratar de um patógeno habitante do solo, o manejo de *M. exigua* é complexo, exigindo a integração de métodos, sendo um dos mais utilizados o controle químico, por apresentar resultados rápidos (FERRAZ, 2018; ZASADA *et al.*, 2018; SIKANDAR *et al.*, 2020). Porém, a aplicação de nematicidas é prejudicial aos animais e ao homem e onera o custo de produção, por essa razão pesquisadores em todo o mundo têm buscado formas alternativas de manejo desses patógenos, como o uso de biofertilizantes que comumente contêm em sua composição agentes de controle biológico, como bactérias (WEI, 2014).

As principais bactérias estudadas para controle biológico de fitonematoides são aquelas que habitam a rizosfera e têm a capacidade de invadir os tecidos internos das plantas, ou seja, as endofíticas facultativas, especialmente as do gênero *Bacillus* (MACHADO *et al.*, 2012).

Essas bactérias podem agir de forma direta através de toxinas que afetam a eclosão ou a mobilidade das formas juvenis dos nematoides ou de forma indireta, pela alteração dos exsudatos radiculares, dificultando a localização das raízes pelos nematoides. Uma outra possibilidade é pela indução de resistência sistêmica da planta (TORRES-VERA *et al.*, 2014 ; HU *et al.*, 2018; PHOUR *et al.*, 2020).

Apesar de muitos isolados bacterianos serem considerados antagônicos à *Meloidogyne* spp., poucos produtos comerciais para o biocontrole desses fitopatógenos estão atualmente disponíveis no mercado brasileiro, por isso é necessário encontrar diferentes isolados de bactérias eficientes na redução populacional dos *M. exigua* com o intuito de ampliar a possibilidade de

otimizaçãodo manejo desses nematoides (XUE *et al.*, 2009).

Há alguns biofertilizantes disponíveis no mercado que reduzem a população de *M. exigua* no campo (CÔGO, 2020; FIGUEIREDO, 2020). Esses produtos apresentam considerável diversidade de microrganismos em sua composição, o que dificulta o entendimento do efeito isolado desses microrganismos o nematoide. Côgo (2020) estudou a diversidade genética dos microrganismos presentes em dois biofertilizantes, um produto orgânico contendo cepas de *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis* e *Lactobacillus* sp. outro produto fluido 100% orgânico rico em matéria orgânica (ácidos húmicos e fúlvicos) e, partir desta triagem, foi possível ampliar o conhecimento sobre a biodiversidade da microbiota desses biofertilizantes, permitindo uma melhor compreensão da diversidade genética das comunidades presentes nesses produtos.

O estudo dos microrganismos presentes em biofertilizantes, em ambiente controlado é essencial para que se compreenda quais desses são efetivos na mortalidade de *M. exigua*, e qual o papel isolado ou em conjunto dessa microbiota na mortalidade desse patógeno (MAGRINI *et al.*, 2011).

Diante do exposto, objetivou com o presente trabalho: avaliar a eficiência de isolados bacterianos presentes em dois biofertilizantes comerciais sobre a mortalidade de juvenis de segundo estágio (J2s) de *M. exigua* e estudar ‘in vitro’ a compatibilidade existente entre as bactérias obtidas a partir desses biofertilizantes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Nematoides das galhas (*Meloidogyne* spp.)

Entre os nematoides fitoparasitas, os nematoides do gênero *Meloidogyne*, ou NGs estão incluídos entre os mais importantes economicamente, por estarem amplamente distribuídos em todo o mundo e pelos danos que causam às plantas parasitadas (MATTOS, 2017).

O ciclo de vida de *Meloidogyne* spp. apresenta quatro estádios juvenis até atingir a fase adulta. O primeiro estágio (J₁) ocorre no ovo e a eclosão é estimulada por condições ambientais favoráveis. Quando o nematoide deixa o ovo, no segundo estágio (J₂), permanece deste modo até encontrar a raiz, na qual inicia o processo de penetração na zona meristemática, logo abaixo da coifa, onde por meio de choques mecânicos promovidos pelo estilete, o nematoide consegue penetrar a raiz e iniciar a sua busca pela célula no cilindro vascular que darão origem ao sítio de alimentação, passando, então, mais três ecdises até se tornar adulto. Após formado o sítio de alimentação, o nematoide se alimenta de forma sedentária e reproduz sendo que o ciclo ovo-adulto dura de 28 a 30 dias (NIEBEL, GHEYSEN *et al.*, 1994).

Do ponto de vista epidemiológico, um estágio marcante no ciclo de vida de *Meloidogyne* spp. é o J₂, único estágio que tem a capacidade de se mover pelo solo e infectar as plantas e, durante seu trajeto em busca das raízes, esses indivíduos interagem com uma vasta gama de microrganismos (TOPALOVIC *et al.*, 2019).

Os sintomas causados por *Meloidogyne* spp. podem ser diretos, quando observados nas raízes das plantas infectadas, ou reflexos, verificados na parte aérea das plantas nas quais nota-se tamanho desigual, murcha e a diminuição da produtividade (FERRAZ; MONTEIRO, 1995). O sintoma direto mais característico é a formação de galhas, que aparecem quando os tecidos em torno do corpo do nematoide sofrem hiperplasia e hipertrofia (FERREIRA, 2017). Essas galhas são respostas fisiológicas das plantas, em que as células transformam-se em tecido nutridor, provendo aos nematoides nutrientes necessários ao seu desenvolvimento e reprodução (FERRAZ, 2001).

Assim, os danos que *Meloidogyne* spp. causam às plantas podem ser explicados pela espoliação de nutrientes por esses patógenos a partir dos tecidos radiculares, alteração na absorção e translocação de água e nutrientes, modificação ou destruição de tecidos radiculares, ou ainda diminuição do crescimento das raízes (HUSSEY & WILLIAMSON, 1996; VIAENE & ABAWI, 1996; SPIEGEL & CHET, 1998; WIDMER *et al.*, 1999; CHEN *et al.*, 1999; CASTILLO *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2006).

2.2. Importância de *Meloidogyne exigua*

No Brasil, os danos causados pelos nematoides foram primeiramente relatados em 1878. Ao descrever a espécie *M. exigua*, o pesquisador suíço Emilio Goeldi, relatou os grandes estragos causados por esse patógeno ao cafeeiro na então Província do Rio de Janeiro. Desde então, *M. exigua* têm causado danos em importantes regiões produtoras de café (SANTOS, 1997).

A espécie *M. exigua* encontra-se em todas as regiões produtoras de café no Brasil, especialmente nos estados de Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro e São Paulo, causando sintomas típicos de galhas nas raízes mais finas (GONÇALVES, 2004). De acordo com o autor, a presença desse patógeno está associada à menor capacidade de desenvolvimento radicular, principalmente das radículas, local em que ocorre maior nível de absorção de nutriente e água para suprir as necessidades da planta.

M. exigua é considerada uma das espécies mais danosas aos cafezais, não necessariamente pela agressividade do patógeno, mas por sua ampla distribuição em campos de produção de café arábica, cuja redução na produtividade pode atingir 70% caso o nematoide não seja adequadamente manejado (GONÇALVES, 1992; CAMPOS *et al.*, 1990).

Barbosa *et al.* (2004) avaliaram em um campo de cultivo de café, na região Noroeste Fluminense, RJ, as reduções de produtividade em cultivares arábicas isentas e infestadas por *M. exigua* e, devido ao parasitismo desse patógeno, observaram perdas de até 45%, sendo estas estimadas em lavouras comerciais com os melhores tratamentos culturais da região. As plantas jovens são mais prejudicadas que as adultas, sendo comum a ocorrência de desfolha, baixa produção de fotoassimilados, redução na produtividade e, conseqüentemente, prejuízo ao cafeicultor (CAMPOS & VILLAIN, 2005).

Além de ocasionar danos à cultura do cafeeiro, *M. exigua* pode infectar também plantas de seringueira. Todavia, pouca atenção tem sido dada a esse patossistema, apesar de danos já terem sido relatados em seringueira (TAKAHASHI, 2015).

2.3. Utilização de bactérias no manejo de *Meloidogyne* spp.

Várias táticas de manejo de *Meloidogyne* spp. estão disponíveis na literatura. Porém, devido à inconsistência de resultados em alguns casos e/ou poluição ambiental causada pelos nematicidas químicos, os agricultores têm buscado alternativas de manejo mais sustentáveis e ecológicas (MOSLEHI *et al.*, 2021). Uma estratégia que têm despertado o interesse é o uso de biofertilizantes que contêm em sua composição bactérias com potencial de agir no controle biológico dos NGs (ZHANG *et al.*, 2016).

As interações entre essas bactérias compartilhando um mesmo nicho ecológico geralmente revestem-se de características fundamentalmente competitivas. Os mecanismos utilizados pelos organismos biocontroladores são: (a) o enfraquecimento ou a mortalidade de *Meloidogyne* spp., por meio de antagonismo direto; (b) produção de toxinas que agem sobre os NGs; (c) habilidade competitiva por espaço e nutrientes; (d) produção de enzimas que degradam os componentes celulares de *Meloidogyne* spp.; (e) indução dos mecanismos de defesa das plantas, em um processo conhecido como indução de resistência (TUZUN, 2001).

É importante destacar que os microrganismos antagonistas de *Meloidogyne* spp. podem interagir entre si, gerando alguns tipos de interações, quais sejam: neutra, quando um microrganismo não potencializa a ação do outro; antagônica, quando um microrganismo afeta o outro ou sinérgica, quando um microrganismo potencializa a ação do outro (BACK *et al.*, 2002).

As rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCPs), por exemplo, encontram-se na região da rizosferada das plantas onde podem estabelecer uma relação benéfica com as raízes, podendo promover o crescimento vegetal e o biocontrole de *Meloidogyne* spp. (ANTIL *et al.*, 2022).

As bactérias endofíticas podem ser candidatas potenciais para o controle biológico de uma ampla gama de doenças de plantas, pois podem colonizar os tecidos internos do hospedeiro, formando associações mutualísticas de longo prazo, sem apresentar nenhum dano evidente ao hospedeiro (SOUZA, MENDONÇA & SOARES, 2015).

As bactérias são eficientes pois produzem de toxinas, antibióticos, proteínas cristalinas e substâncias nematocidas (MOSLEHI *et al.*, 2021). Outros compostos, como uracila, 9H-purina e di-fidrouacil, serina, 2,4-diacetilfloroglucinol provenientes do metabolismo de bactérias apresentaram eficiência na mortalidade de *Meloidogyne* spp. (SIDDIQUI & SHAUKAT, 2003; QIUHONGET *et al.*, 2006 & OLIVEIRA *et al.*, 2014).

Uma possibilidade de redução populacional de *Meloidogyne* spp. é quando ocorre o estímulo dos mecanismos de defesa das plantas pela produção de quitinases e proteases vegetais por bactérias antagonistas. As quitinases podem interromper a formação de camadas de quitina em ovos de nematoides e impedir a eclosão dos J₂ (XIANG *et al.*, 2018; SOLIMAN, 2019).

No que se refere ao parasitismo das plantas por *Meloidogyne* spp., todos os danos ocorrem no hospedeiro quando os J₂ conseguem penetrar no sistema radicular, assim, caso uma medida de controle interrompa essa etapa do ciclo de vida nematoide não haverá novos indivíduos parasitando a planta. A fase de J₂ é uma das mais sensíveis à ação de métodos de controle devido à sua exposição no solo (HUSSEY, 1985).

O uso de biofertilizantes para o manejo de fitonematoides vem sendo estudado nos últimos anos, o que pode ser explicado pelos elevados riscos à saúde humana e ao ambiente causados pelos nematocidas químicos comerciais e pela busca por produtos que promovam menor impacto

ambiental (RODRIGUES *et al.*, 2016; JONES *et al.*, 2017).

Alguns autores afirmam que o uso de biofertilizantes pode reduzir a população de *Meloidogyne* spp. no solo e no sistema radicular, além do número de galhas, massas de ovos e de fêmeas (YOUSSEF & EISSA, 2014). As rizobactérias, presentes nesses biofertilizantes podem estar relacionadas a essa redução populacional de *Meloidogyne exigua* (CÔGO, 2020; FIGUEIREDO, 2020).

Vale lembrar que há biofertilizantes disponíveis no mercado brasileiro que contêm bactérias em sua formulação. Esses biofertilizantes são obtidos a partir da fermentação do melaço da cana, que produzem ácidos fúlvicos, aminoácidos, vitaminas, antibióticos, enzimas e substâncias antagônicas (fitoalexinas) que podem proporcionar a indução de resistência das plantas à fitonematoides e estimular o desenvolvimento e potencial fotossintético da planta (AGROHUMUS, 2019).

Entre os biofertilizantes comerciais no Brasil, há dois muito comuns, um produto orgânico contendo cepas de *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis* e *Lactobacillus* sp.; e outro que é fluido 100% orgânico e rico em matéria orgânica (ácidos húmicos e fúlvicos). A aplicação desses biofertilizantes tem demonstrado efeito positivo na redução populacional de *M. exigua* no campo (CÔGO, 2020; FIGUEIREDO, 2020). Entretanto, não se conhece o efeito isolado ou combinado das bactérias presentes nesses produtos na mortalidade de *M. exigua*.

Todas as bactérias da família Bacillaceae têm potencial como agentes de biocontrole de *Meloidogyne* spp., o que tem resultado no desenvolvimento de bionematicidas comerciais (TIAN *et al.*, 2007). *Bacillus thuringiensis* (Bt), membro dessa família, produz uma grande variedade de proteínas inseticidas, incluindo a família das proteínas de Crystal-Cry (KAHN *et al.*, 2021). Segundo o autor, as proteínas Cry14Ab dessas bactérias danificam as células intestinais de *Heterodera glycines*. Já *B. cereus* pode produzir esfingosina, que induz o acúmulo reativo de oxigênio e destrói a área genital em nematoides inibindo sua reprodução (GAO *et al.*, 2016).

Embora sejam raros os trabalhos que relacionam *Brevibacterium* spp. a nematoides de plantas, alguns autores isolaram *B. frigoritolerans* do nematoide de cistos, *Globodera rostochiensis*, e nematoide da madeira do pinheiro, *Bursaphelenchus xylophilus* (KWON *et al.*, 2010; SINGH *et al.*, 2015).

Adam *et al.*, (2014) relatou que a bactéria *Micrococcus* spp. interage com *Meloidogyne hapla* no solo, aderindo-se à cutícula dos J2s e regulando as densidades populacionais do nematoide. Segundo Pamphile *et al.*, (2017) e Perez *et al.*, (2019) *Micrococcus* spp. produz lipases, importantes enzimas que promovem a desorientação e mortalidade de nematoides fitopatogênicos

Em outro trabalho, o isolado FB39 de *Micrococcus luteus* foi selecionado em estudos conduzidos 'in vitro' e apresentou elevado percentual demortalidade e inibição da eclosão de J2

de *M. incognita* (WILLE, 2019).

Uma vantagem dessas bactérias citadas anteriormente como biocontroladoras de *Meloidogyne* spp., é a ampla possibilidade de aplicação. Elas podem ser aplicadas em sementes, estacas vegetativas, tubérculos, plântulas ou ainda ao solo para promover redução no parasitismo de raízes por nematoides, contribuindo com a supressão direta de diversos patógenos, proporcionado através da competição por espaço e nutrientes. Além disso, podem promover o crescimento, assim como ativar os mecanismos de resistência das plantas contra a infecção de fitopatógenos (KIPNGENO *et al.*, 2015).

Além das possibilidades de uso mencionados anteriormente, suspensões rizobacterianas podem ser misturadas a materiais orgânicos, mantidas a 35°C por 5-10 dias, homogêneas diariamente acrescentando-se água e, dentro de 10 dias, a bactéria terá atingido altas populações e o material orgânico estará pronto para ser usado no campo (SIDDIQUI & MAHMOOD, 1999).

No que se refere ao controle de *Meloidogyne* spp., produtos comerciais à base de *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Serratia* são mais promissores, pois não apenas suprimem as populações dos NGs, mas também estimulam o crescimento das plantas (MIGUNOVA & SASANELLI, 2021).

As principais vantagens das bactérias como agentes de biocontrole de *Meloidogyne* spp. são: fácil produção massal devido à habilidade que possuem de serem cultivadas ‘in vitro’; fácil armazenamento; boa adaptação às tecnologias de formulação; não requerimento de manipulação genética; eficiente crescimento saprofítico; pequenas quantidades de inóculo necessárias à aplicação; não dependência de fontes de energia para sua sobrevivência; aplicação simples; à medida que as raízes crescem se tornam colonizadas pelas rizobactérias; apresentam atividade antagônica a fitonematoides durante a fase mais sensível de desenvolvimento das culturas, ou seja, durante o desenvolvimento inicial e é economicamente e ecologicamente aceitável (FERRAZ *et al.*, 2010; ALVES *et al.*, 2012).

O sucesso para o manejo de fitonematoides por meio de biofertilizantes está relacionado aos metabolitos produzidos por bactérias contidas nesses produtos (YOUSSEF & EISSA, 2014).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Área experimental

Dois experimentos foram conduzidos no Laboratório de Nematologia da UFES (NEMATUFES) em parceria com laboratório de biotecnologia agrícola e ambiental (BIOTA), situado no Setor de Fitopatologia do Núcleo de Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Manejo Fitossanitário de Pragas e Doenças (NUDEMAFI), da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), localizado no município de Alegre – ES, latitude 20°45'' Sul, longitude 41°48'' Oeste e altitude de 250 m.

3.2 Período de condução dos experimentos

O experimento 1 foi realizado no período de fevereiro de 2022 a julho de 2022. E o experimento 2 foi realizado no período de setembro de 2022 a dezembro de 2022. Ambos repetidos nas mesmas condições e em tempos diferentes.

Experimento 1. Efeito de isolados bacterianos obtidos a partir de biofertilizantes na mortalidade de *M. exigua*

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com 22 tratamentos, e quatro repetições; sendo 20 isolados bacterianos, + uma controle positivo (480 g/L) + uma testemunha negativa (água estéril), totalizando 88 unidades experimentais. Um microtubo tipo eppendorf de 2 mL foi considerado uma repetição.

3.3 Obtenção dos isolados bacterianos

Os isolados bacterianos foram obtidos a partir de dois biofertilizantes comerciais: um produto orgânico contendo cepas de *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis* e *Lactobacillus* sp. e outro produto fluido 100% orgânico rico em matéria orgânica (ácidos húmicos e fúlvicos).

Os isolados bacterianos consistiram em: B74, B75, B76, B77, B78, B79, B81, B83, B84, B85, B86, B87, B88, B89, B107, B109, B115, B120, B121, B123. Estes isolados foram obtidos a partir do trabalho de Côgo (2020) e cedidos pelo laboratório BIOTA da Universidade Federal do Espírito Santo (CCAUE-UFES). Os 20 isolados bacterianos que foram selecionados para serem estudados nessa pesquisa foram formados em Fingerprint genômico

utilizando Rep-PCR (CÔGO, 2020), o que permitiu agrupar os isolados de acordo com a sua similaridade genética.

Para a reativação dos isolados bacterianos, previamente preservados em glicerol 15% à -20 °C, foi utilizado a técnica de semeadura por espalhamento (MARIANO & SOUZA, 2016), para isso foram realizadas repicagens pipetando-se 150 µL das suspensões em placas Petri contendo meio de cultura Kado (4 g extrato de levedura, 10 g sacarose, 8 g de caseína, 2 g de fosfato dipotássico, 0,300 g de sulfato de Magnésio, 18 g ágar, H₂O: 1000 mL) e incubadas por 24-36 horas a 28°C ± 2 °C em incubadora de crescimento bacteriano.

Após esse período, foram preparadas suspensões com os isolados bacterianos, para isso as bactérias foram cultivadas em incubadora shaker a 180 rpm (por 24 horas). A concentração das suspensões foi ajustada em espectrofotômetro para densidade ótica OD₆₀₀ = 0,6, o que corresponde a aproximadamente 1 x 10⁸ UFC/mL (células bacterianas por mL de suspensão).

3.4 Obtenção e preparo do inóculo de *M. exigua*

Os J₂ utilizados nos experimentos foram obtidos a partir de uma população pura de *M. exigua* multiplicada e mantida em plantas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) cv. 'Catuaí- 144' em vasos contendo substrato autoclavado composto de solo + areia na proporção 1:1 (v:v), por 60 dias em casa de vegetação.

A extração do nematoide de foi realizada segundo a técnica de COOLEN & D'HERDE, (1972) com modificações. As raízes foram picadas em pedaços de 1 cm a 2 cm de comprimento e em seguida trituradas em liquidificador por 60 segundos e vertidas em câmaras de eclosão, (CLIFF; HIRSCHMANN, 1985). As suspensões aquosas foram coletadas em peneiras de 500 mesh e transferidas para frascos tipo Becker. As coletas dos J₂ foram realizadas a cada 24 horas com auxílio de uma pisseta, sendo necessárias três coletas, uma a cada 24 horas, para obtenção da quantidade de J₂ desejada para instalação dos experimentos.

As suspensões aquosas coletadas foram mantidas em oxigenação até serem utilizadas no teste de mortalidade. Antes da instalação do experimento, essas suspensões foram calibradas para 32 J₂/0,7 mL.

A escolha da fase J₂ do ciclo de vida do nematoide a ser utilizada nos experimentos foi devido ao fato de esta ser uma das fases mais sensíveis à ação de métodos de controle (HUSSEY, 1985), este é o único estágio que tem a capacidade de se mover pelo solo e infectar as plantas.

3.5 Teste de mortalidade de J₂ de *M. exigua*

Para determinar o efeito dos isolados bacterianos na mortalidade dos J₂ de *M. exigua*, em cada microtubo foram colocados 700 µl de uma suspensão aquosa contendo 32 J₂ recém- eclodidos + 700 µl de suspensão de cultura de cada isolado bacteriano. Após 24 horas incubados a 28 ± 2°C, os tubos ependorf foram retirados da câmara de crescimento e os J₂ quantificados em câmara de contagem de Peters com auxílio de um microscópio de objetiva invertida. Para a contagem foram determinados os J₂ móveis e imóveis na testemunha e, posteriormente, nos demais tratamentos.

Para melhor visualização dos J₂ móveis e imóveis, 200 µl de solução hidróxido de sódio a 1% (p/v) (1N de NaOH) foram adicionados à suspensão de nematoides por 3 minutos e, após esse período, as formas móveis e imóveis foram quantificadas (CHEN e DICKSON, 2000).

Os J₂ que se encontravam retos e imóveis foram considerados mortos e os que estavam curvados e/ou móveis foram considerados vivos. A porcentagem de mortalidade dos J₂ em cada tratamento foi calculada por comparação com o número obtido na testemunha empregando-se a fórmula $MJ (\%) = (D/T) \times 100$, em que MJ representa o percentual de mortalidade dos J₂s, D representa o número de J₂s mortos e T o número total de J₂s utilizados no teste (YIN, 2021).

Os sete isolados bacterianos mais promissores nesse experimento foram selecionados para serem utilizados no experimento 2, para isso, as colônias foram submetidas à extração de DNA mediante o uso do Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, EUA) conforme recomendado pelo fabricante. A concentração do DNA total foi determinada em espectrofotômetro NanoDrop2000c (Thermo Scientific). A região 16S rRNA foi amplificada por PCR utilizando-se os primers RP1/FD2, seguido de sequenciamento.

Os produtos de PCR foram purificados usando o kit PCR ExoSAP-IT™ e sequenciados em um sequenciador ABI PRISM 3100. Os reagentes e equipamentos utilizados para sequenciamento dos fragmentos de DNA foram da Applied Biosystems. As sequências de consenso foram montadas usando o software SeqAssem (HEPPERLE, 2004). Todas as sequências foram verificadas e ajustadas manualmente, e as posições ambíguas dos nucleotídeos foram esclarecidas usando sequências de ambas as fitas de DNA. Foram obtidos fragmentos de aproximadamente 1400pb.

Para a identificação, as sequências de consenso foram testadas contra o banco de dados do GenBank e verificado a porcentagem de identidade.

3.6 Análise estatística

Para diagnóstico de normalidade e homogeneidade os dados foram submetidos à análise preliminar de variância pelo teste “T” e, apresentando distribuição diferente da Gaussiana, optou-se por utilizar modelos lineares generalizados (GLM), de acordo os dados de contagem

(número de J_2) foi possível aplicar a função binomial, as médias foram comparadas pelo teste Tukey ($p < 0,05$). As análises foram feitas com auxílio do software R versão 4.1.3 (R Development Core Team, 2022).

Experimento 2. Seleção e teste de compatibilidade entre isolados bacterianos antagonistas de *M. exigua*

Os sete isolados bacterianos mais promissores no experimento 1, ou seja, B74, B75, B84, B85, B86, B88 e B121 foram selecionados para serem utilizados no experimento 2.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com 9 tratamentos (isolados bacterianos) e quatro repetições. Uma placa de Petri foi considerada uma repetição.

Para caracterizar o tipo de interação entre isolados bacterianos foi empregada a técnica de poço, na qual os isolados foram avaliados pelo método de pareamento de culturas em placa de Petri. Em cada placa foram confeccionados 5 poços, sendo que em três deles foram adicionados 50 μ l da suspensão dos respectivos isolados bacterianos; nos dois poços restantes a controle positivo (Hipoclorito de sódio 2,5%) e a testemunha negativa (50 μ l de meio líquido em que bactéria foi cultivada).

Após a reativação dos isolados bacterianos e crescimento das colônias, estas foram cultivadas em 3 mL de meio caldo nutriente (CN) contidos em tubos Falcon de 50 mL, a 28 ± 2 °C, os quais foram mantidos em incubadora shaker a 180 rpm por 52 horas.

Posteriormente, as culturas bacterianas foram centrifugadas a 6.000 rpm por 20 min e a solução sobrenadante foi despejada em placas de Petri esterilizadas. Antes de ser vertido, o sobrenadante foi filtrado em membranas PVDF de 0,45 μ m de diâmetro para eliminar as células bacterianas restantes e obtenção apenas dos metabólitos secundários para caracterização da interação entre os isolados.

Após o crescimento bacteriano e ajuste da D.O $600=0,6$, uma alíquota de 50 μ l de isolado bacteriano (B75, B74, B86, B88, B121) foi incorporada em meio fundente com temperatura variando entre 53-55° C e, em seguida, o meio foi vertido em placas de Petri. Após a solidificação do meio, 5 poços (4 mm de profundidade x 6 mm de diâmetro) foram confeccionados em cada placa de forma equidistante com o auxílio de um furador.

Em cada um desses poços foi adicionado 50 μ l de filtrado de sobrenadante, de forma que cada isolado bacteriano, que consistiu em uma bactéria teste (incorporados em meio fundente), foram confrontados com o filtrado de 3 isolados, para avaliação do efeito destes quanto a presença de halo de inibição de crescimento conforme ilustração abaixo:

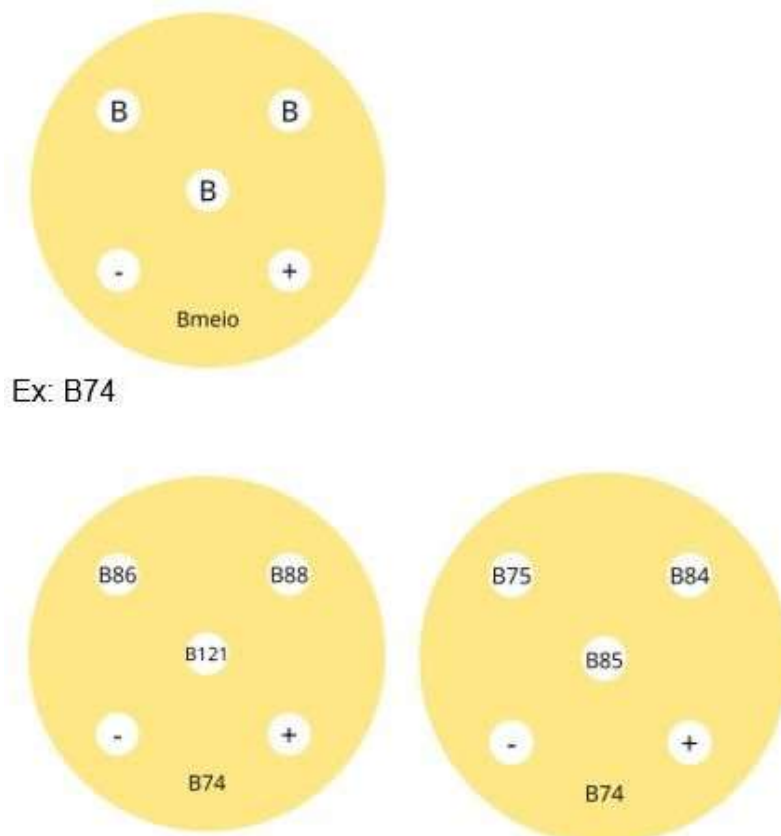


Figura 1 - Modelo de posicionamento de poços em placas de Petri contendo meio Kado para caracterização da interação neutra ou antagônica entre sete isolados bacterianos (B86, B88, B121, B74, B75, B84 e B85 + controle positivo + testemunha negativa).

As placas foram vedadas com filme plástico e mantidas em fotoperíodo por 12 horas, e examinadas periodicamente quanto ao crescimento das bactérias testes e presença ou ausência de halos de inibição. Caso algum isolado apresentasse efeito antagônico seria realizada a quantificação do halo de inibição com base em tabela padronizada e posteriormente seria calculado o índice de antibiose ($IA = \frac{\text{Diâmetro do halo}}{\text{Diâmetro da Colônia}}$). Os isolados bacterianos com efeito neutro serão utilizados em experimento posterior para validação da eficácia do biocontrole de *M. exigua* em teste in vivo.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Efeito de isolados bacterianos obtidos a partir de biofertilizantes na mortalidade de *M.exigua*

Não houve diferença na média do percentual de mortalidade dos J₂ de *M. exigua* nos experimentos 1 e 2, exceto para o isolado B84 em que as médias obtidas nos experimentos foi diferente (Tabela 2)

Tabela 2- Percentual de mortalidade (%) – Teste T

Trat	Exp1	Exp 2	P-valor	resultado
B74	0,766	0,680	0,1399	Igual
B75	0,570	0,570	0,7747	Igual
B84	0,586	0,609	0,0111	diferentes
B85	0,656	0,648	0,1274	Igual
B86	0,828	0,703	0,0722	Igual
B88	0,750	0,734	0,6603	Igual
B121	0,812	0,828	0,6918	Igual
CN	0,250	0,250	0,3194	Igual
CP	0,891	0,922	0,5733	Igual

Devido ao elevado número de isolado bacterianos empregados na pesquisa, foi apresentado somente os resultados dos isolados cujos efeitos na mortalidade do nematoide apresentaram mortalidade superior à 57%; os resultados que apresentaram mortalidade inferior à 57% foram inseridos no Anexo 1.

No experimento 1, dos 20 isolados bacterianos, sete deles (B74, B75, B84, B85, B86, B88, B121), demonstraram efeito na mortalidade de J₂ de *M. exigua* após 24 horas de incubação, sendo que B74, B86, B88, B121 apresentaram percentuais de mortalidade superiores a 75% e B75, B84, B85 atingiram percentuais superiores a 57% (Figura 2).

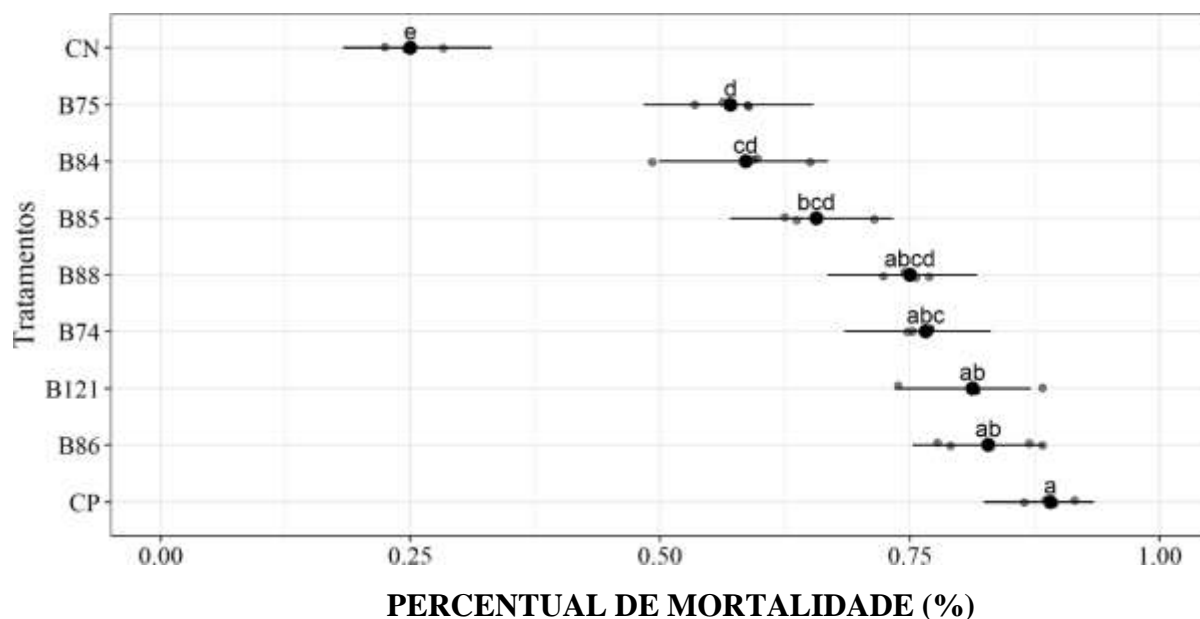


Figura 2 - Percentual de mortalidade (%) de *M. exigua* após tratamentos por 24 horas com isolados bacterianos (B74, B75, B84, B85, B86, B88, B121) – Experimento 1

*Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey($p < 0,05$)

** Apresentação somente os resultados dos isolados cujos efeitos na mortalidade donematoide foram superiores à 57%.

No experimento 2 foi realizado a avaliação nas mesmas condições experimentais, e os resultados não diferiram estatisticamente (Figura 3).

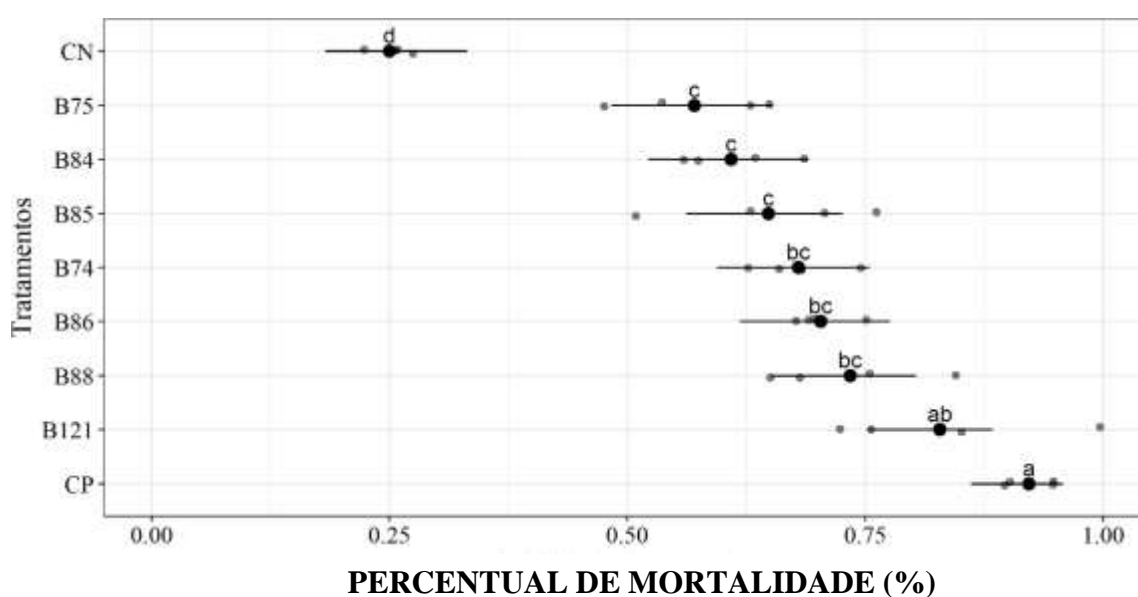


Figura 3 - Percentual de mortalidade (%) de *M. exigua* após tratamentos por 24 horas com isolados bacterianos (B74, B75, B84, B85, B86, B88, B121)- Experimento 2

*Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey($p < 0,05$)

Esses resultados, coerentes nos experimentos 1 e 2, evidenciam o potencial, principalmente dos isolados B121, B74, B86, B88, como possíveis agentes de controle biológico de *M. exigua*.

A identificação desses sete isolados bacterianos mais promissores na mortalidade de *M. exigua* encontra-se sumarizada na Tabela 1.

Tabela 1- Resultado da identificação, por meio de análises moleculares, de sete isolados bacterianos obtidos a partir de dois biofertilizantes comerciais: um produto orgânico contendo cepas de *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis* e *Lactobacillus* sp. e outro produto fluido 100% orgânico rico em matéria orgânica (ácidos húmicos e fúlvicos).

Colônias	Identificação molecular	Acesso de referência	% Identidade
B74	<i>Bacillus</i> sp.	OP393694.1	99.80%
B75	<i>Bacillus</i> sp.	MT197315.1	99.22%
B84	<i>Bacillus</i> sp.	MG786930.1	99.86%
B85	<i>Micrococcus</i> sp.	MH777900.1	99.71%
B86	<i>Bacillus</i> sp.	MN733016.1	99.44%
B88	<i>Bacillus thuringiensis</i>	CP116325.1	99.86%
B121	<i>Brevibacterium epidermidis</i>	KJ575060.1	99.57%

As colônias B74, B75, B84, B86 e B88 foram identificadas como *Bacillus* sp. As colônias B85 e B121 foram identificadas como *Micrococcus* sp. e *Brevibacterium epidermidis*, respectivamente.

Para destacar a importância da mortalidade dos J₂ de *M. exigua* pelos isolados bacterianos em nossa pesquisa é de fundamental importância que se considere alguns aspectos biológicos do patógeno e epidemiológicos da doença. Uma das condições que afetam o desenvolvimento de uma epidemia é a quantidade de inóculo próximo ao hospedeiro, de forma que quanto maior a quantidade de propágulos do patógeno dentro ou próximo das áreas cultivadas, maior quantidade de inóculo chegará à planta hospedeira e com maior rapidez, aumentando muitas possibilidades de ocorrência de uma epidemia (ZINGER *et al.*, 2021, RABELLO *et al.*, 2021).

O ciclo de vida de *M. exigua* apresenta 5 fases, juvenil de primeiro estágio (J₁), J₂, J₃, J₄ e fêmea ou macho adulto. O J₂ é a forma infectante. A penetração do J₂ ocorre na região meristemática da raiz e, posteriormente o nematoide migra até córtex, endoderme, periciclo e parênquima, onde induz a formação de células gigantes que consistem no sítio de alimentação do nematoide. O patógeno torna-se sedentário passando por três ecdises até a fase adulta. O ciclo de vida, de ovo a ovo, dura em média quatro semanas e uma fêmea produz aproximadamente 500 ovos por ciclo (CORDEIRO *et al.*, 2005).

Caso o J₂ tenha sucesso em alcançar as radículas da planta, penetrar, exercer o parasitismo e sofrer o dimorfismo sexual transformando-se em uma fêmea adulta haverá um aumento considerável do número de indivíduos no campo (RABELLO *et al.*, 2021). Taylor e Sasser, (1978) afirmaram que esse aumento populacional de fitonematoides é previsível, uma vez que o nematoide se multiplica em escala logarítmica. Assim, é de se esperar que com plantios consecutivos de uma cultura hospedeiras, o nível de inoculo inicial (y₀) no solo seja maior no início de cada plantio (RABELLO *et al.*, 2021; ZINGER *et al.*, 2021).

Muitos dos principais processos fisiológicos de planta hospedeira como respiração, fotossíntese, absorção e translocação de água e nutrientes, balanço hormonal, podem ser afetadas direta e indiretamente pelo parasitismo de *M. exigua*, além das deformações morfológicas e anatômicas (BARBOSA, 2003). Os danos mecânicos provocados pelos nematoides ao penetrarem e se movimentarem nos tecidos das plantas levam ao bloqueio de tecidos vasculares nos sítios de alimentação, limitando a translocação de água e nutrientes, reprimindo o crescimento das plantas e o rendimento das culturas, todos esses danos fisiológicos e mecânicos levam à redução do crescimento das plantas (SANTOS, *et al.* 2015). Conseqüentemente, as plantas podem apresentar desfolha, murcha, queda acentuada na produção, amarelecimento, crescimento reduzido ou nanismo, frutos menores, clorose e sintomas de deficiências nutricionais (MOREIRA & SHARMA, 2001; GOMES *et al.*, 2008); dentre outros sintomas.

Barbosa *et al.* (2004) afirmaram que o cafeeiro arábica atacado por *M. exigua* pode ter sua produção reduzida de 30 a 45%, já Campos e Villain (2005) citam que embora as plantas jovens sejam as mais prejudicadas, dependendo de alguns fatores como tipo de solo, as plantas adultas podem sofrer séria desfolha, prejudicando a produção de fotoassimilados, o que pode implicar na redução da produtividade.

É importante lembrar que todos esses prejuízos fisiológicos e mecânicos ocorrem em plantas parasitadas por *M. exigua* quando os J₂ têm êxito em sua penetração nas raízes dessas plantas, portanto qualquer medida de controle que interrompa essa ou qualquer outra das etapas do ciclo do nematoide é de crucial importância para o manejo da doença, sendo que uma das fases mais sensíveis à ação de métodos de controle é o J₂ devido ao fato de estar exposto no solo (HUSSEY, 1985), exatamente a etapa do ciclo de vida de *M. exigua* afetada em nosso estudo pelos isolados bacterianos.

A mortalidade de J₂ causada por bactérias em experimentos conduzidos ‘in vitro’ já foi observada por outros autores. Gattoni *et al.* (2022), relataram que *Bacillus* spp. aumentaram a mortalidade de J₂ em 62,2% e, segundo os autores, os mecanismos envolvidos na mortalidade do nematoide estão relacionados a metabólitos produzidos pela bactéria, o que pode também explicar os resultados obtidos em nossa pesquisa.

Ao contrário dos nematicidas químicos, os agentes bacterianos não causam danos aos seres humanos, animais e meio ambiente, podendo ser usado de forma segura e contínua durante o cultivo de culturas para manejar os nematoides e tem excelente atividade de produção de moléculas voláteis, como indol-3-acético (IAA), promotor do crescimento das plantas (ZHANG *et al.*, 2022).

O isolado B85, identificado como *Micrococcus* sp., apresentou resultado promissor na mortalidade de *M. exigua* em nosso estudo. Segundo Wille *et al.*, (2019) *M. luteus* produz pelo menos um composto relacionado ao biocontrole de fitonematoides com níveis de mortalidade do patógeno que variam entre 78 e 100% e inibição da eclosão de juvenis entre 73 e 100%.

Para confirmar que bactérias isoladas de *Meloidogyne hapla* se ligam fortemente à cutícula dos J₂ desse nematoide, Topalovic, (2019) observou 40 a 200 unidades formadoras de colônias (UFCs) do isolado K5 de *Micrococcus* sp. aderidas por J₂, afetando a mortalidade, a motilidade e a eclosão dos juvenis. O autor observou também a redução da invasão das raízes de tomateiro pelos J₂, sugerindo o papel benéfico de *Micrococcus* sp. na supressividade do solo contra *M. hapla*.

Outro efeito benéfico de *Micrococcus* sp é o estímulo ao crescimento vegetativo de plantas. Calsin (2021), por exemplo, verificou que o isolado XT23 de *M. luteus* produziu elevados níveis de auxina em estudos ‘in vitro’, o que pode ter estimulado o crescimento de plantas cujas sementes foram microbiolizadas com essa rizobactéria. Esse fitormônio está relacionado à formação das raízes, melhorando a absorção de nutrientes.

A bactéria B121, *Brevibacterium epidermidis*, também apresentou resultado promissor na mortalidade de *M. exigua* com percentual de mortalidade superior a 75% de J₂, embora não haja evidências na literatura disponível dessa bactéria na mortalidade de *Meloidogyne* spp., demonstrando a importância de estudos posteriores que investiguem com maior profundidade o seu real potencial para manejo de *Meloidogyne* spp. em nível de campo.

A efetividade dos isolados bacterianos B74, B84, B85, B86, B88, B121 na mortalidade dos J₂ de *M. exigua* em nosso trabalho ajudam a explicar o resultado promissor obtido nas pesquisas de Côgo (2020) e Figueiredo (2020). Os autores perceberam que os dois biofertilizantes, de onde esses isolados citados anteriormente foram obtidos, reduziram a população de *M. exigua* em cafeeiro no campo. Segundo Venzon *et al.*, (2005) a presença de rizobactérias nesses produtos realmente explica a redução populacional de fitonematoides. Os metabólitos produzidos pelas bactérias podem provocar alterações na forma, tamanho, ou no conteúdo dos sítios de alimentação estabelecidos no sistema radicular pelos nematoides, e isso acarreta a má alimentação das fêmeas prejudicando sua reprodução (FERRAZ *et al.*, 2010). É possível que um determinado isolado rizobacteriano exiba não apenas um modo de ação sobre o fitonematoide, mais sim um conjunto de eventos que resulta em sua efetividade.

Conforme observado em nosso estudo, a maioria dos isolados bacterianos pertencem ao gênero *Bacillus*, ou seja, B74, B75, B84 e B86. O único isolado que foi identificado em nível de espécie foi o B88 (*Bacillus thuringiensis*).

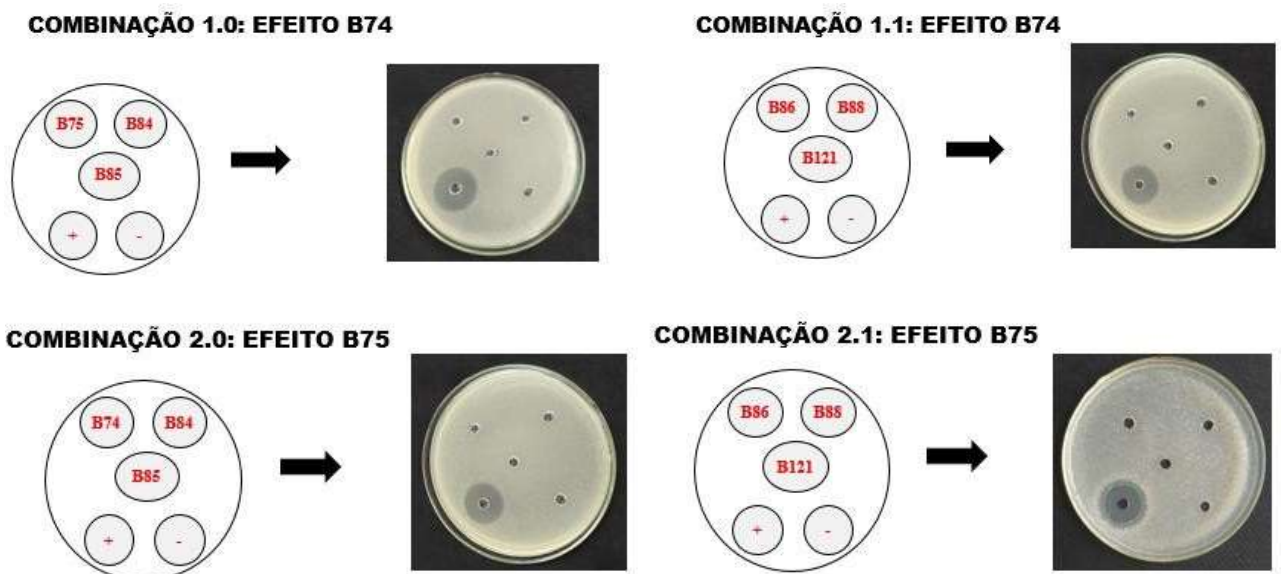
Moura & Carneiro (2020) notaram que um biopesticida comercial à base de *B. subtilis* linhagem FMCH002 (DSM32155) e *B. licheniformis* linhagem FMCH001(DSM32154) apresentou efeito positivo na redução populacional de *M. exigua*. Segundo os autores, essas bactérias, são capazes de predação e de competir com nematoides, além de estimular o crescimento das plantas e de induzir a sua resistência ao ataque desses fitopatógenos.

Alguns autores afirmam ainda que uma das principais características que tornam *B. subtilis* e *B. licheniformis* bons agentes de controle biológico é a produção de compostos tóxicos que, em contato com os nematoides, interferem no seu ciclo reprodutivo, principalmente na ovoposição e eclosão dos juvenis (SPIEGEL & CHET, 1998; SHARON *et al.*, 2001; EAPEN *et al.*, 2008; FERREIRA *et al.*, 2008).

O manejo integrado de fitonematoides consiste na utilização conjunta de medidas para a redução populacional de fitonematoides. Nesse sentido, deve-se considerar a inclusão de novos métodos, como a inclusão das bactérias presentes nos dois biofertilizantes empregados em nosso estudo.

4.2. Seleção e teste de compatibilidade entre isolados bacterianos antagonistas de *M. exigua*

Após 24 horas de incubação as placas foram examinadas periodicamente quanto ao crescimento das bactérias e presença ou ausência de halos de inibição, sendo constatada a ausência de efeito antagonístico entre as combinações de todos os isolados bacterianos estudados (Figura 4).



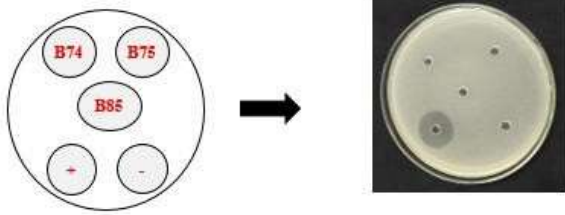
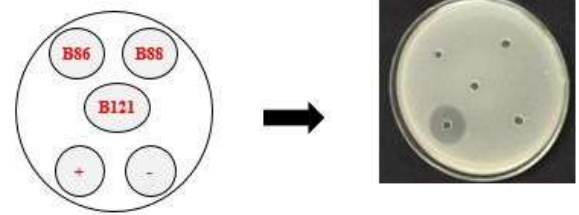
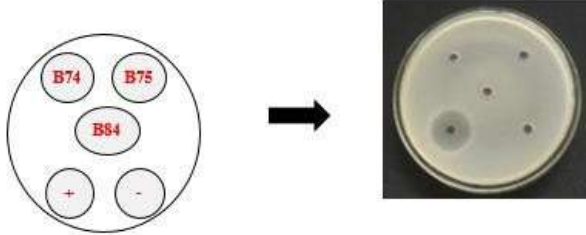
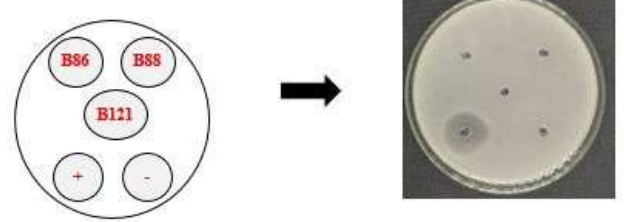
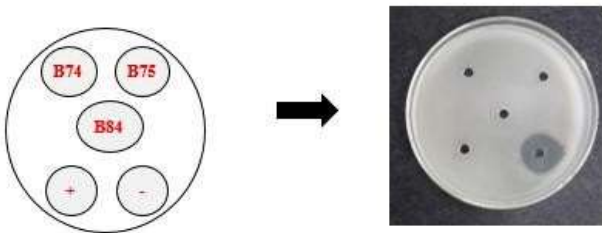
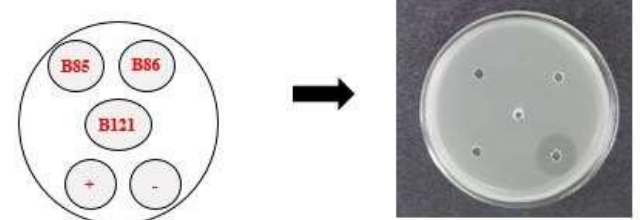
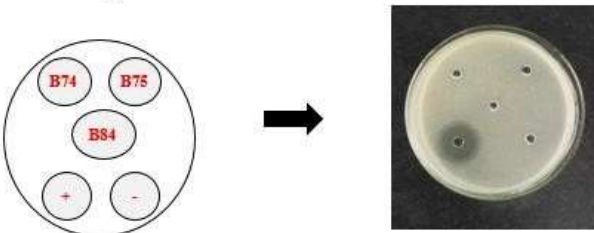
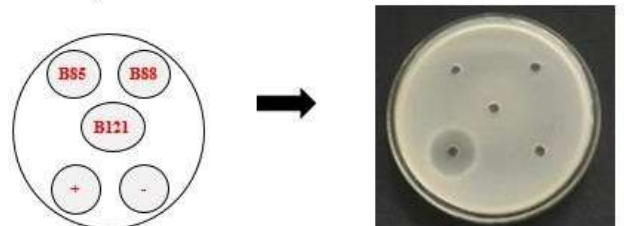
COMBINAÇÃO 3.0: EFEITO B84**COMBINAÇÃO 3.1: EFEITO B84****COMBINAÇÃO 4.0: EFEITO B85****COMBINAÇÃO 4.1: EFEITO B85****COMBINAÇÃO 6.0: EFEITO B88****COMBINAÇÃO 6.1: EFEITO B88****COMBINAÇÃO 7.0: EFEITO B121****COMBINAÇÃO 7.1: EFEITO B121**

Figura 4 - Avaliação da compatibilidade de sete isolados bacterianos (B74, B75, B84 e B85, B86, B88 e B121) obtidos a partir de dois biofertilizantes comerciais: i) um produto orgânico contendo cepas de *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis* e *Lactobacillus* sp.; ii) um produto fluido 100% orgânico rico em matéria orgânica (ácidos húmicos e fúlvicos).

Ao analisar os resultados percebe-se que essas bactérias têm potencial de ser empregadas de forma combinada para manejo dos fitonematoides, pois não têm efeito antagônico entre si. De acordo com Dupponois & Mateille (1999) o uso combinado de microrganismos para manejo de fitonematoides é uma prática desejável, pois esses microrganismos possuem diferentes modos de ação que, se utilizados de forma conjunta, podem potencializar o manejo de fitonematoides por

devido à produção de antibióticos e toxinas que inibem a eclosão e a motilidade de juvenis, além de modificarem os exsudados radiculares, o que dificulta a localização e posterior infecção das raízes pelos nematoides.

Migunova & Sasanelli (2021) destacam que os agentes de controle biológico, usados isoladamente, podem não proporcionar níveis satisfatórios de manejo, mas a integração desses antagonistas apresentando diferentes modos de ação, associado a outras táticas, podem levar a medidas sustentáveis de manejo de *Meloidogyne* spp. com menor ou nenhuma dependência de nematicidas químicos.

Segundo Cordovez (2018) compostos orgânicos voláteis (VOCs) de *Microbacterium* sp. causaram mais de 50% de mortalidade de J₂ de *M. exigua* em teste 'in vitro' em apenas 3 a 4 horas de exposição dos J₂ a esses compostos. Em nosso estudo, os isolados bacterianos B74 (*Bacillus* sp.), B75 (*Bacillus* sp.), B84 (*Bacillus* sp.), B86 (*Bacillus* sp.), B88 (*B. thuringiensis*), B85 (*Micrococcus* sp.) e 121 (*B. epidermidis*) foram eficazes na mortalidade de *M. exigua*. Os compostos produzidos por esses isolados não foram analisados em nossa pesquisa, mas é importante o seu conhecimento caso esses isolados sejam utilizados em estudos futuros para produção de biopesticidas.

Algumas bactérias produzem enzimas ou toxinas que afetam os ovos ou prejudicam a eclosão dos juvenis de fitonematoides (WESTCOTT & KLUEPFEL, 1993). Os membros da família Bacillaceae, por exemplo, produzem proteases, quitinases, colagenases, lipases e complexos de enzimas que afetam diferentes estágios do ciclo de vida dos fitonematoides RADHAKRISHNAN *et al.*, 2017).

Resultados promissores foram relatados também quando foram empregados complexos bacterianos para o manejo de *Meloidogyne ethiopica* e *Xiphinema index* em videira. Em experimentos em que foram utilizadas misturas líquidas, em pó e não formuladas de *Bacillus amyloliquefaciens* FR203A, *B. megaterium* FB133M, *B. thuringiensis* FS213P e FB833T, *B. weihenstephanensis* FB25M, *B. frigiditolerans* FB37BR e *Pseudomonas fluorescens* FP805PU foi observada supressão da reprodução dos dois nematoides. Alguns complexos bacterianos apresentaram inclusive efeitos semelhantes ao nematicida organofosforado Cadusafós (ABALLAY *et al.*, 2020). Vale lembrar que em nossa pesquisa *B. thuringiensis* B88 apresentou resultado satisfatório na mortalidade de *M. exigua*.

A bactéria *B. thuringiensis* (Bt) é uma bactéria Gram positiva que se caracteriza pela presença de inclusões cristalinas denominadas de δ -endotoxinas ou proteínas Cry (RAMALAKSHMI. *et al.*, 2020), que são acumuladas na célula durante a esporulação e correspondem a 25% do peso seco da célula (AGAISSE & LERECLUS, 1995). Estas inclusões cristalinas podem conter uma ou mais proteínas Cry, que, por sua vez, apresentam atividade contra insetos, ácaros, protozoários e fitonematoides (SCHNEPF *et al.*, 1998). Ramalakshmi. *et al.*,

(2020) relataram que misturas de esporos e cristais de 6 isolados de *B. turingiensis* mostraram 100% de inibição da emergência de J₂ de *M. incognita*, além da supressão do número de massas de ovos, redução da população de fêmeas e diminuição do índice de galhas nas raízes.

Devido à alta toxicidade ao homem e ambiente, além de alto custo, muitos nematicidas químicos já foram excluídos do mercado. Com isso, os produtos microbianos e naturais ganham importância e são candidatos potenciais a substituírem os químicos (ZINGER *et al.*, 2021).

Vale destacar aqui que os isolados bacterianos B74, B75, B84, B86 e B88, B85, estudados em nossa pesquisa, podem ser candidatas a futuras formulações de biopesticidas. O mercado de produtos à base de microrganismos antagonistas a fitonematoides está crescendo e suas características tecnológicas, como persistência, possibilidades de transporte, armazenamento e prazo de validade, têm melhorado significativamente (MIGUNOVA & SASANELLI, 2021). Segundo os autores, há algumas formulações contendo duas ou mais bactérias para o controle de *Meloidogyne* spp. disponível do mercado atual.

A maioria das formulações comerciais existentes é representada por uma única cepa. Os principais alvos desses produtos são *Meloidogyne* spp. e *Heterodera* spp. sendo que os produtos à base de *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp. e *Serratia* spp. têm sido apontados como os mais promissores, porque não apenas suprimem os fitonematoides, mas também estimulam o crescimento das plantas (CASTILLO *et al.*, 2013; XIANG *et al.*, 2017).

Em nosso experimento foram confrontados filtrados bacterianos contra isolados de bactérias para detectar alguma possível interferência de um isolado sobre o outro. Em futuros experimentos para verificar a eficácia dessas bactérias na mortalidade de *Meloidogyne* spp. é importante destacar que se pode utilizar somente esses filtrados e não necessariamente as células bacterianas (MENDONZA *et al.*, 2008). Além disso é importante lembrar que um dos métodos promissores para o controle de *Meloidogyne* spp. é a aplicação de consórcios que incluem não apenas bactérias ou filtrados bacterianos, mas também fungos (WOLFGANG *et al.*, 2019).

O resultado prático que se espera em nível de campo com a utilização de microrganismos antagonistas à *Meloidogyne* spp. é a diminuição da densidade populacional do patógeno e estimulação da resistência sistêmica adquirida em plantas. Os pesticidas químicos são agressivos aos agroecossistemas, enquanto as bactérias são componentes naturais importantes dos ecossistemas (WOLFGANG *et al.*, 2019).

A necessidade crescente de aumentar a produção agrícola e reduzir a contaminação ambiental aponta para o futuro promissor das bactérias, como as contidas em biofertilizantes, para o manejo de *Meloidogyne* spp., principal gênero de fitonematoides em nível mundial. Os múltiplos modos de ação ‘in situ’ pelas bactérias as tornam uma ferramenta segura e sustentável contra o manejo dos nematoides de galhas.

5 CONCLUSÃO

Os resultados dos experimentos 1 e 2 são animadores pois evidenciam o potencial, principalmente dos isolados B121, B74, B86, B88, como possíveis agentes de controle biológico de *M. exigua* e indicam que essas bactérias podem ser empregadas de forma combinada para manejo dos fitonematoides, pois elas não têm efeito antagônico entre si.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABALLAY, E. *et al.* Assessment of rhizobacterial consortia to manage plant parasitic nematodes of grapevine. **Crop protection**, v.131, 105103,2020.
- AGAISSÉ H. & LERECLUS D. How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n.21, p.6027–6032, 1995.
- ADAM, M. *et al.* Specific microbial attachment to root knot nematodes in suppressive soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v.80, n.9, p2679-2686, 2014.
- AGROHUMUS:** Adubos Orgânicos. Disponível em: <https://www.agrohumusorganicos.com/>. Acesso em: 01 de jun. 2021.
- ALVES, F. R.; ZINGER, F. D. ; CRUZ, T. P. ; Souza, R.M. de ; COSTA, D. C. . Controle Biológico de Nematoides: Uma abordagem Prática. In: Dirceu Pratissoli, Waldir Cintra de Jesus Jr., Hugo Bolsoni Zago, Fábio Ramos Alves, Ulysses Rodrigues Viana, Hugo José Gonçalves dos Santos Jr., Celso Rodrigues. (Org.). **TÓPICOS ESPECIAIS EM PRODUÇÃO VEGETAL III**. IIIed. Visconde do Rio Branco, MG: Suprema Gráfica Editora, v., p. 238-278, 2012.
- ANTIL, S. *et al.* Plant growth-promoting rhizobacteria-*Bacillus cereus* KMT-5 and *B. megaterium* KMT-8 effectively suppressed *Meloidogyne javanica* infection. **Applied Soil Ecology**, v. 174, p. 104-419, 2022.
- BARBOSA, D.H.S.G. Levantamento dos nematoides de galha (*Meloidogyne* spp.) em áreas cafezeiras fluminenses e estimativa dos seus danos à produtividade regional. **Dissertação** (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 2003.
- BARBOSA, D.H.S.G.; VIEIRA, H.D.; SOUZA, R.M.; VIANA, A.P.; SILVA, C.P. Field estimates of coffee yield losses and damage threshold by *Meloidogyne exigua*. **Nematologia Brasileira**, v. 28, n.1, p.49- 54, 2004.
- CALSIN, C.P.M. Potencial de bactérias na promoção de crescimento e biocontrole de fitonematoides em cana-de-açúcar. **Dissertação** (Mestrado em Fitopatologia), Pelotas- 2021.
- CAMPOS, V. P.; VILLAIN, L. Nematodes parasites of coffee and cocoa. IN: LUC, M.; SIKORA, R. A.; BRIDGE, J. (Eds.). **Plant Parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture**, 2. ed. Wallingford: CAB. p. 529-579, 2005.

- CAMPOS, V.P., SIVAPALAN, P., GNANAPRAGASAM, N.C. Nematode parasites of coffee, cocoa and tea. In: M. Luc, R. Sikora and J. Bridge (eds) **Plant Parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture**. Wallingford: CABI, p. 387- 430, 1990.
- CASTILLO, J.D.; LAWRENCE, K.S.; KLOEPPER, J.W. Biocontrol of the Reniform Nematode by *Bacillus firmus* GB-126 and *Paecilomyces lilacinus* 251 on Cotton. **Plant Disease**, v. 97, n.7, p. 967-976, 2013.
- CASTILLO P. *et al.* First Report of *Meloidogyne arenaria* Parasitizing LeUuce in Southern Spain. **Plant disease**. v.90. n.7, p.975, 2006.
- CORDOVEZ, V. *et al.* Priming of plant growth promotion by volatiles of root-associated Microbacterium, **Applied and Environmental Microbiology** , 2018.
- CHEN J.; ABAWI G. S.; ZUCKERMAN B. M. Suppression of *Meloidogyne* hapla and Its damage to lettuce grown in a mineral soil amended with chitin and biocontrol organisms. **Supplement to the Journal of Nematology**. v.3,n.4, p.719–725, 1999.
- CHEN, S.Y. & DICKSON, D.W. A technique for determining live second-stage juveniles 234 of *Heterodera glycines*. **Journal of Nematology**, v.32, n.1, p.117-121, 2000.
- CÔGO, A. Caracterização da microbiota antagonista em biofertilizantes e seu papel nas interações multitróficas para o manejo do *Meloidogyne exigua* em cafeeiro arábica, **Dissertação** (Mestrado em Produção Vegetal), Alegre-ES, 2020.
- CLIFF, G.M.; HIRSCHMANN, H.H. Evaluation of morphological variability in *Meloidogyne arenaria*. **Journal of Nematology**, v.17, p. 445-449, 1985.
- COOLEN, W.A.; D'HERDE, C.J. **A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue Ghent**: State Nematology and Entomology Research Station, p.77, 1972.
- CORDEIRO, M.J.Z. *et al.* In: KIMATI,H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (eds.). **Manual de Fitopatologia: Doenças das Plantas Cultivadas**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, p.99-117, 2005.
- DUPONNOIS, R.; BA, A.M.; MATEILLE, T. Beneficial effects of *Enterobacter cloacae* and *Pseudomonas mendocina* to biocontrol of *Meloidogyne incognita* with the endospore-forming bacterium *Pasteuria penetrans*. **Nematology**, v. 1, n.1, p.95-101, 1999.
- EAPEN, A. J.; BEENA, B.; RAMANA, K. V. Evaluation of fungal bioagents for management of root-knot nematodes in ginger and turmeric fields. **Journal of spices andaromatics Crops**, v.17, n.2, p.122-127, 2008.
- FERRAZ, C. C. B.; MONTEIRO, A. R. Nematoides. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v. 1, p. 168-201, 1995.
- FERRAZ, L.C.C.B. As meloidoginoses da soja: passado, presente e futuro. In: SILVA, J.F.V. **Relações parasito-hospedeiro nas meloidoginoses da soja**. Londrina/PR: Embrapa Soja, p.

15-38, 2001.

FERRAZ, L.C.C.B. Nematodos. In: AMORIN, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia**. 5ª ed. Ouro Fino – MG. Agronômica Ceres, p.195- 211, 2018.

FERRAZ, S.; FREITAS, L.G. ; LOPES, E. A.; DIAS-ARIEIRA, C.R. **Manejo sustentável de fitonematoides**. Viçosa, MG, Ed. UFV. p.139-169, 2010.

FERRAZ, L.C.C.B.; BROWN, D.J.F. **Nematologia de plantas: Fundamentos e sua importância**. Manaus: Norma editora, 2016

FERREIRA, R.M.I. Estrutura e desenvolvimento da galha radicular induzida por *Meloidogyne javanica* em *Glycine max L.*(soja). **Dissertação** (Mestrado em Biologia Vegetal), Uberlândia/MG, 2017.

FIGUEIREDO, M.S. Efeito de Biofertilizantes, produtos químicos e biológicos no manejo de *Meloidogyne exigua* e na produtividade de café arábica na Zona da Mata de Minas Gerais. **Dissertação** (Mestrado em Produção vegetal), Alegre- ES, 2020.

GAO, H. *et al.* *Bacillus cereus* strain S2 shows high nematocidal activity against *Meloidogyne incognita* by producing sphingosine. **Ciência Rep** , v.6 ,n.1, p.28756, 2016.

GATTONI, K.M.; PARK, S.W; LAWRENCE, K. Evaluation of the mechanism of action of *Bacillus* spp. to manage *Meloidogyne incognita* with split root assay, RT-qPCR and qPCR. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, p. 5614, 2022

GOMES V.M, SOUZA R.M, SILVA M.M, DOLINSKI C. Caracterização do estado nutricional de goiabeiras em declínio parasitadas por *Meloidogyne mayaguensis*. **Nematologia Brasileira**, v.32, n. 2 p. 154-160, 2008.,

GONÇALVES, W. *et al.* Manejo de nematoides na cultura do cafeeiro. In: REUNIÃO ITINIRANTE DE FITOSSANIDADE DO INSTITUTO BIOLÓGICO-CAFÉ, 10, 2004, Mococa. Anais. São Paulo: **Instituto Biológico**, 2004. p. 48-66.

GONÇALVES, W. Melhoramento do cafeeiro visando resistência a nematoides. Informe Agropecuário, v.16, p. 72-77. 1992.

GUERRA NETO. *et al.* **Influência de *Meloidogyne exigua* Goeldi, 1887, no desenvolvimento de lavoura de *Coffea arabica* L., variedade Mundo Novo**. Resumos, 12º Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, Caxambu, MG, p.36-37, 1985.

HEPPERLE, D. SeqAssem ©. Uma ferramenta de análise de sequência, montador de contig e ferramenta de visualização de dados de rastreamento para sequências moleculares. Versão 7/2008, 2004. Disponível em: <http://www.sequentix.de>. Acesso em: abril de 2023.

HU, L. *et al.* Os metabólitos do exsudato da raiz conduzem os feedbacks da planta e do solo sobre o crescimento e a defesa, moldando a microbiota da rizosfera. **Nature Communications**, v 9, n.1, p. 2738, 2018.

HUSSEY R.S & WILLIAMSON V. M. Nematode pathogenesis and resistance in plants. **Plant Cell**, v.8, p.1735-1745, 1996.

HUSSEY, R.S. Host-parasite relationships and associated physiological changes. In: SASSER

E CARTER. Na advanced treatise on Meloidogyne, **Biology and Control**. Chapter v.1, n.12, p. 143-153, 1985.

JONES, J. G. *et al.* Evaluation of nematicides for southern root-knot nematode management in lima bean. **Crop protection**, v. 96, p. 151-157, 2017.

KAHN, T.W. *et al.* Uma proteína *Bacillus thuringiensis* Cry controla o nematoide de cisto da soja em plantas transgênicas de soja., **Nat Commun**, v.12 , p.3380, 2021.

KWON, R.H., *et al.* Suppression of pine wilt disease by na antibacterial agent, oxolinic acid, **Pest Management Science**, v.66 , p.634-639, 2010.

KIPNGENO, P.; LOSENGE, T.; MAINA, N.; KAHANGI, E.; JUMA, P. Efficacy of *Bacillus subtilis* and *Trichoderma asperellum* against *Pythium aphanidermatum* in tomatoes. **Biological Control**, v.90, p.92-95, 2015.

MACHADO, V., *et. al.* Bactérias como agentes de controle biológico de fitonematoides. **Oecologia Australis**, v.16, n.2, p.165-182, 2012.

MAGRINI, F. E. *et al.* Características químicas e avaliação microbiológica de diferentes fases de maturação do biofertilizante Bokashi. **Agrarian**, v. 4, n. 12, p. 146-151, 2011.

MARIANO, R. L. R.; SOUZA, E. B. **Manual de Práticas em Fitobacteriologia**. 3o ed. Recife: Editora da Universidade Federal Rural de Pernambuco, p. 51-55, 2016.

MATTOS, V.S. Caracterização e identificação de populações de *Meloidogyne* spp. do arroz, estabelecimento de marcadores SCAR e seleção de novas fontes de resistência em *Oryza* spp. a *M. graminicola*. **Tese** (Doutorado em Fitopatologia), BRASÍLIA-DF, 2017.

MENDOZA, A.R.; KIEWNICK, S.; SIKORA, R.A. In vitro activity of *Bacillus firmus* against the burrowing nematode *Radopholus similis*, the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* and the stem nematode *Ditylenchus dipsaci*. **Biocontrol Science and Technology**, v.18, n.4, p. 377–389, 2008.

MIGUNOVA, V. D.; SASANELLI, N. Bacteria as biocontrol tool against phytoparasitic nematodes. **Plants**, v.10, n. 2, p. 389, 2021.

MOREIRA, W.A.; SHARMA, R.D. Nematoides. In. Goiaba Fitossanidade. Série Frutas do Brasil. Brasília, **Embrapa Informação Tecnológica**, p. 19-28, 2001.

MOSLEHI *et al.* Potential of some endophytic bacteria in biological control of root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v.31, n.50, p 1-11, 2021.

MOURA, R. M. D.; CARNEIRO, J. Fitonematologia Primeiros Passos: Inimigos Naturais Dos Nematoides. **Sociedade Brasileira de Nematologia**, p. 56, 2020.

NEVES, W.S. *et al.* Avaliação de isolados de bactérias e do fungo *Trichoderma* spp. obtidos de solos tratados com farinha de sementes de mamão para o controle de *Meloidogyne javanica*. In: SOUSA , C.S ; SABIONI, S.C; LIMA, F.S. **Agroecologia Métodos e Técnicas**

para uma Agricultura Sustentável . GUARUJÁ - SP: Científica digital, p.191-201, 2021.

NIEBEL, A., G. GHEYSEN. *et al.* "Plant-cyst nematode and plant-root-knot nematode interactions". **Parasitol Today**, v.10, n.11, p.424-430, 1994.

PAMPHILE, J. A. *et al.* aplicações biotecnológicas de metabólitos secundários extraídos de fungos endofíticos: o caso do *Colletotrichum* sp. biotechnological applications of secondary metabolites extracted from endophytic fungi: the case of *Colletotrichum* sp. **Revista UNINGÁ**, v. 53, n. 1, p. 113–119, 2017.

PHOUR, M. *et al.* Cross-kingdom signaling in plant-rhizomicrobiome interactions for sustainable agriculture. **Microbiological Research**, v.241 , p. 126589, 2020.

PEREZ, M. M. *et al.* Fungal Lipases: versatile tools for white biotechnology. in recent advancement in white biotechnology through fungi (pp. 361-404). **Springer, Cham**. 2019.

QIUHONGET, N. *et al.* *Bacilo* sp. B16 mata nematoides com uma serina protease identificada como fator patogênico. **Microbiologia aplicada e Biotecnologia**, v. 69, n.6, p. 722-730, 2006.

R Development Core Team. 2022. **R**: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna.

RABELLO, L.K. *et al.* Quantification of damage and yield losses caused by Root-knot nematode in lettuce in Brazil. *Idesia (Arica)*, v. 39, p. 121-130, 2021.

RADHAKRISHNAN. *et al.* Bacillus: A biological tool for crop improvement through bio-molecular changes in adverse environments. **Frontiers in physiology**, v.8, p. 1–14, 2017.

RAMALAKSHMI, A. *et al.* Nematicidal activity of native *Bacillus thuringiensis* against the root knot nematode, *Meloidogyne incognita* . **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v.30,p. 1-9, 2020.

RODRIGUES, L. L. *et al.* Management of *Meloidogyne javanica* with biological pesticides and oils in a lettuce field. **Nematoda**, v.3, p.01-09, 2016.

SANTOS, H. S. *et al.* Pathogenicity of *Meloidogyne javanica* in lettuce as a function of tray cell size and seedling transplant age. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 28, n. 2, p. 253-259, 2006.

SANTOS, J.M. Taxonomia de espécies de *Meloidogyne* Goeldi, 1889 que infectam o cafeeiro (*Coffea* spp.) no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 22, p. 229-230, 1997.

SANTOS, P.S. Aplicação em sulco de nematicidas em soja. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia Agrícola). Universidade Federal de Santa Maria, Programa de Pós Graduação em Engenharia Agrícola, Santa Maria, 2015.

SCHNEPF, H.E. *et al.* *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Review**, v.62,n. 3, p.775–806, 1998.

SHARON, E. *et al.* Biological control of the Root-Knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. **Phytopathology**, v.91, n. 7, p. 687-693, 2001.

SIDDIQI, I.A.; SHAUKAT, S.S. Rhizobacteria-mediated induction of systemic resistance

(ISR) in tomato against *Meloidogyne javanica*. **Journal of Phytopathology**, v. 150, n. 8-9, p.469–473, 2002.

SIDDIQUI I.A, SHAUKAT S.S. C. Endophytic bacteria: prospects and opportunities for the biological control of plant-parasitic nematodes. *Nematologia Mediterranea*, v 31, n.1, p.111–120, 2003.

SIDDIQUI, Z.A.; MAHMOOD, I. Role of bacteria in the management of plant parasitic nematodes: a Review. **Bioresource and Technology**, v.69, p. 167-179, 1999.

SIKANDAR, A. *et al.* Review article: *Meloidogyne Incognita* (Root-Knot Nematode) a risk to agriculture. **Applied Ecology and Environmental Research**, v 18, n.1, p.1679- 1690, 2020.

SINGH, P. *et al.* Biosynthesis, characterization, and antimicrobial applications of silver nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v.10 , p.2567, 2015.

SOLIMAN, G.M., *et al.* In vitro evaluation of some isolated bacteria against the plant parasite nematode *Meloidogyne incognita*. **Bulletin of the National Research Centre**, p. 43, v.171, 2019.

SOUZA, R.D; MENDONÇA, E.A.F; SOARES, M.S. Antagonistic activity to pathogenic microorganisms by endophytic bacteria isolated from *Echinodorus scaber* Rataj. **Summa Phytopathologica**, v. 41, p. 229-232, 2015.

SPIEGEL, Y.; CHET, I. Evaluation of *Trichoderma* spp. as a biocontrol agent against soilborne fungi and plant-parasitic nematodes in Israel. **Integrated Pest Management Reviews**, v.3, p.169 -175, 1998.

TAKAHASHI, V. S. P. Inter-relações entre nematoides, fungo e a cultura da seringueira. **Tese** (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2015.

TIAN, P.O.R. *et al.* Bacteria used in the biological control of plant parasitic nematodes: populations, mechanisms of action and future prospects. **FEMS Microbiologia Ecologia**, v. 61 , n.2, p. 197–213, 2007.

TOPALOVIC, O. *et al.* Bacteria isolated from the cuticle of plant-parasitic nematodes attached to and antagonized the root-knot nematode *Meloidogyne hapla* , **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-13, 2019.

TORRES-VERA *et. al.* As estrigolactonas contribuem para a defesa das plantas. **Mol. Plant Pathol.** v.15, n.2 , p. 211 – 216, 2014.

TUZUN, S. The relationship between pathogen-induced systemic resistance (ISR) and multigenic (horizontal) resistance in plants. **European Journal of Plant Pathology**, v.107, n.1, p.85-93, 2001.

VENZON, M.; PAULA JÚNIOR, T. J.; PALLINI, A. **Controle alternativo de pragas e doenças**. Viçosa: UFV, 2005.

VIAENE, N. M., ABAWI, G. S. Management of *Meloidogyne hapla* on lettuce in organic soil with sudangrass as a cover crop. **Plant Disease**. v. 82, n.8, p.945-952, 1998.

- WEI, L. *et al.* Isolation and characterization of a rhizobacterial antagonist of root-knot nematodes. **Plos one**, v. 9, n. 1, p. e85988, 2014.
- WESTCOTT, S. W; KLUEPFEL, D. A Inibição da eclosão de ovos de *Criconemella xenoplax* por *Pseudomonas aureofaciens* . **Phytopathology**, v. 83 , p. 1245-1249, 1993.
- WIDMER, T.L. *et al.* The northern root-knot nematode on carrot, lettuce, and onion in New York. **New York's food and life sciences bulletin**. New York. N156, 1999.
- WILLE, C.N. 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** (Agronomia) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.
- WOLFGANG, A. *et al.* Novel strategies for soil-borne diseases: Exploiting the microbiome and volatile-based mechanisms toward controlling Meloidogyne-based disease complexes. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 2019.
- XIANG, N. *et al.* Biological Control of Meloidogyne incognita by spore-forming plant growth-promoting rhizobacteria on cotton. **Plant Disease**, v.101, n.5, p.774–784, 2017
- XIANG, N.; LAWRENCE, K. S.; DONALD, P. A. Biological control potential of plant growth-promoting rhizobacteria suppression of *Meloidogyne incognita* on cotton and Heterodera glycines on soybean: A review. **Journal of Phytopathology**, v. 166, n. 7-8, p. 449–458, 2018.
- XUE, Q.Y. *et al.* Evaluation of the strains of Acinetobacter and Enterobacter as potential biocontrol agents against Ralstonia wilt of tomato. **Biological Control** , v.48, n.3, p. 252-258, 2009.
- OLIVEIRA, D. F.*et al.* Purification and identification of metabolites produced by Bacillus cereus and B. subtilis active against *Meloidogyne exigua*, and their in silico interaction with a putative phosphoribosyltransferase from *M. incognita*. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v. 86, p. 525–538, 2014.
- YIN, N. *et al.* Volatile Organic Compounds of Bacillus cereus Strain Bc-cm103 Exhibit Fumigation Activity against Meloidogyne incognita. **Plant disease**, v. 105, n. 4, p. 904-911, 2021.
- YOUSSEF, M. M. A.; EISSA, M. F. M. Biofertilizers and their role in management of plant parasitic nematodes. A review. **Journal of Biotechnology and Pharmaceutical Research**, v. 5, n. 1, p. 1-6, 2014.
- ZASADA, I. *et al.* Plant Parasitic Nematodes of the Pacific Northwest: Idaho, Oregon and Washington. In: Subbotin, S. A. & Chitambar, J. **Plant Parasitic Nematodes in Sustainable Agriculture of North América**, v. 2 - Western USDA and Mexico, p. 1-25, 2018.
- ZHANG, J. *et al.* Biological control of the cereal cyst nematode (*Heterodera filipjevi*) by *Achromobacter xylosoxidans* isolate 09X01 and *Bacillus cereus* isolate 09B18. **Biological Control**, v. 92, p. 1-6, 2016.

ZHANG, R. *et al.* Nematicidal Activity of *Burkholderia arboris* J2S 11 Against *Meloidogyne incognita* on Tobacco. **Frontiers in Microbiology**, v.3, 2022.

ZINGER, F. D. ; RABELLO, L. K. C. ; MORAES, W. B. ; CAMARA, G. R. ; ALVES, F.R. Quantification of damage and yield losses and management of root-knot nematode in conilon coffee. **Revista Caatinga** , v. 34, p. 287-297, 2021.

ANEXOS

Tabela 3 - Clusters formados do Fingerprint genômico utilizando Rep-PCR

Clusters formados	Representante	Identificação Bacterioteca	Grupo que representa
1	M1	B74	1
2	M2	B75	2
3	M3	B76	3
4	M4	B77	5
5	M5	B78	12
6	M6	B79	6
7	M8	B81	8
8	M10	B83	10
9	M11	B84	11
10	M12	B85	12
11	M13	B86	13
12	M14	B87	14
13	M15	B88	15
14	V1	B89	16
15	V19	B107	34
16	V21	B109	36
17	V27	B115	42
18	V32	B120	47
19	V33	B121	48
20	V35	B123	50

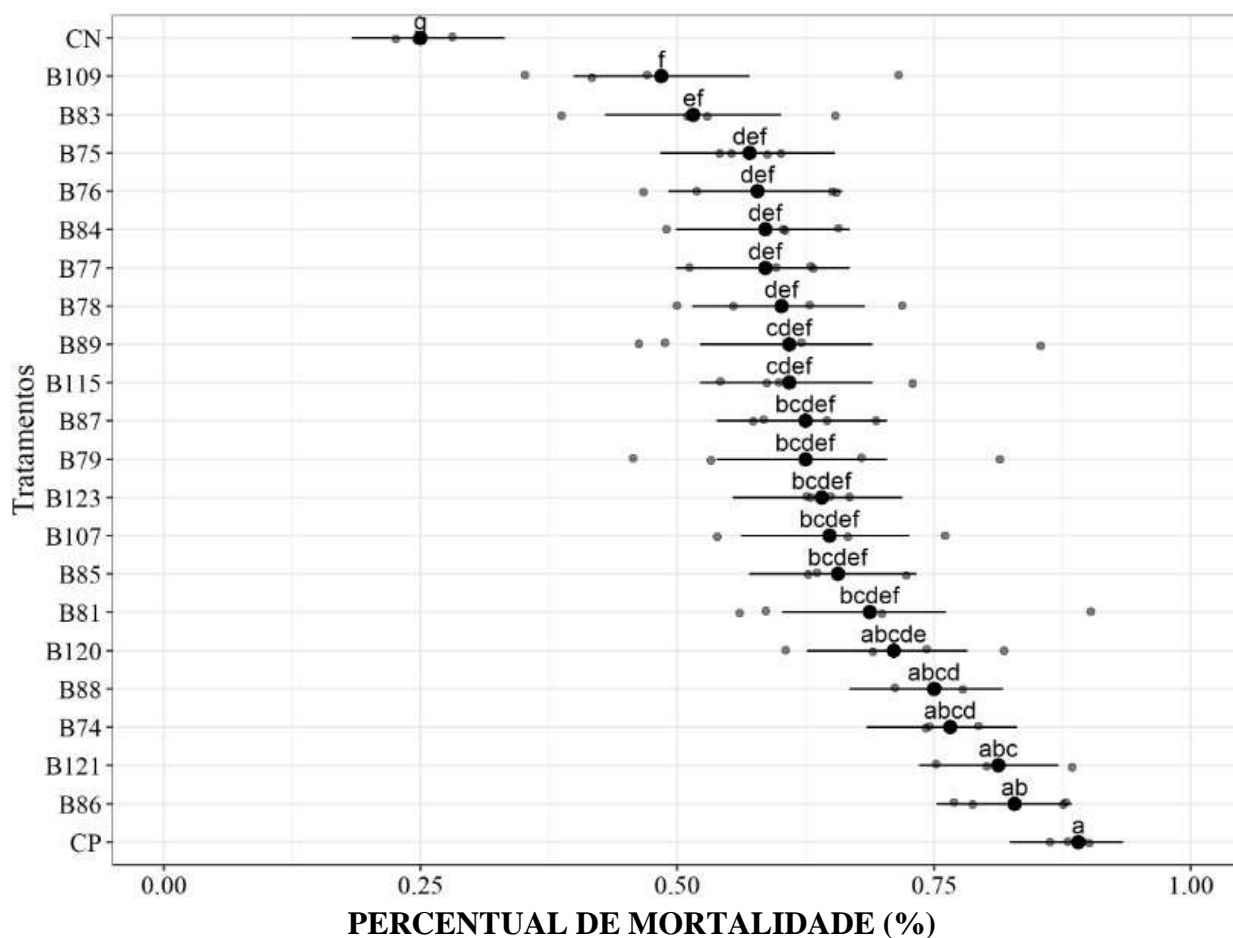


Figura 5 - Média do Percentual de mortalidade (%) de *M. exigua* após tratamentos por 24 horas com 20 isolados bacterianos no Exp1 e Exp2.

*Isolados com espécimes não identificadas apresentando mortalidade inferior à 57% :

B76 (57%), B77 (55%), B78 (56%), B79 (57%), B81(56 %), B83 (51%), B87 (56%), B89 (57 %), B107 (56%), B109 (48%), B115 (56%) , B120 (56 %), B123 (54%)