



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOPATOLOGIA**

**Uso de *Bacillus* spp. para o controle de *Fusarium oxysporum* f. sp.  
*vasinfectum* e *Meloidogyne incognita* no algodoeiro (*Gossypium  
hirsutum*)**

**Sandro Coelho Linhares Montalvão**

**Brasília – DF  
2016**

**Sandro Coelho Linhares Montalvão**

**Uso de *Bacillus* spp. para o controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e  
*Meloidogyne incognita* no algodoeiro (*Gossypium hirsutum*)**

Tese apresentada à Universidade  
de Brasília como requisito parcial  
para a obtenção do título de Doutor  
em Fitopatologia pelo Programa de  
Pós-Graduação em Fitopatologia

**Orientador**

Prof. Luiz Eduardo Bassay Blum, Ph.D. Fitopatologia

**Co-orientador**

Dra. Rose Gomes Monnerat, PhD em Microbiologia

**BRASÍLIA**

**DISTRITO FEDERAL - BRASIL**

**2016**

Trabalho realizado junto ao Programa de Pós-graduação em Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação do **Professor Luiz Eduardo Bassay Blum**, com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (EMBRAPA – CENARGEN).

**Uso de *Bacillus* spp. para o controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e *Meloidogyne incognita* no algodoeiro (*Gossypium hirsutum*)**

**Sandro Coelho Linhares Montalvão**

TESE APROVADA em \_\_/\_\_/\_\_\_\_ por:

Dr. Jadir Borges Pinheiro  
Examinador externo – EMBRAPA-Hortaliças

Prof. Cristina Schetino Bastos  
Examinador externo – UnB-PPG-FAV

Prof. Cleber Furlanetto  
Examinador interno – UnB-PPG-FIT

Prof. Juvenil Enrique Cares  
Examinador interno – UnB-PPG-FIT

Prof. Luiz Eduardo Bassay Blum  
Orientador (Presidente)

BRASÍLIA – DISTRITO FEDERAL  
BRASIL

**2016**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Montalvão, Sandro Coelho Linhares.

Uso de *Bacillus* spp. para o controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e *Meloidogyne incognita* no algodoeiro (*Gossypium hirsutum*). / Sandro Coelho Linhares Montalvão

Brasília, 2016. Número de páginas p.: 169 il.

Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Universidade de Brasília, Brasília-DF

1. Fitopatologia – Bacteriologia – Nematologia – Micologia

I. Universidade de Brasília. PPG/FIT.

II. Uso de *Bacillus* spp. para o controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e *Meloidogyne incognita* no algodoeiro (*Gossypium hirsutum*).

*Dedicatória I*

*“...Dedico este trabalho aos meus queridos pais, Ednir Coelho Linhares Montalvão e Hélio Santos Montalvão, pela educação, amor incondicional, conselhos e ensinamentos em todos os momentos da minha vida...”*

## *Dedicatória II*

*“...dedico também este trabalho aos meus avós maternos e paternos, em especial à minha avó materna Maria Coelho Linhares (in memoriam) que sempre me apoiou durante toda essa jornada de estudos e partiu a um mês da conclusão desse trabalho...”*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus e a Nossa Senhora por serem meus guias nessa jornada, dando-me coragem para lutar e persistência nessa caminhada. Muito obrigado pela saúde e pelas oportunidades a mim concebidas. Aos meus irmãos Márcia e Paulo Ricardo, assim como a todos os meus familiares pela confiança e amizade durante esta jornada.

À Universidade de Brasília (UnB), em especial ao Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade da realização do curso. Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro. A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pela oportunidade e espaço, onde comecei e desenvolvi meu trabalho de pesquisa.

Ao meu orientador Professor Luiz Eduardo Bassay Blum, pela atenção contínua, ensinamentos, pelos conselhos e oportunidades, e principalmente pela confiança depositada durante essa jornada. A minha coorientadora Doutora Rose Gomes Monnerat, pelos conselhos, amizade, colaboração e pelas sugestões na elaboração desta tese. A Pesquisadora da Embrapa – Cenargen, Dra. Regina Maria Dechechi G. Carneiro pelos conhecimentos passados, críticas e conselhos que foram fundamentais na elaboração deste trabalho.

Aos professores da UnB, principalmente do Departamento de Fitopatologia pela amizade e contribuição para a minha formação profissional. Aos colegas do departamento de Fitopatologia, pelas experiências e amizade. A secretaria do Programa de Pós-graduação em Fitopatologia na pessoa do M.Sc. Ribamar Frazão.

Aos funcionários da Embrapa – Cenargen, Ana Cristina Gomes, Dra. Lilian Praça, Dra. Bárbara Eckstein, Dra. Daniela Aguiar e José Alves. Aos pesquisadores do Instituto Matogrossense do Algodão, Dr. Carlos Marcelo Soares, Dra. Erica Martins e Dr. Paulo Queiroz.

Aos amigos do laboratório de Bactérias Entomopatogênicas da Embrapa - CENARGEN, Aline, Anabele, Briana, Carla, Clarinha, Cristina, Ester, Evelin, Fernanda, Flávia, Jônatas Jório, Luiza, Lunalva, Marcel, Marcela, Marcelo Berçot, Marcelo Castro, Marina, Neila, Rayane, Suca, Zonaite além dos que passaram por lá, pela amizade, pela ajuda e pelo agradável convívio.

Aos amigos, em especial, Flávia Santana e Marcelo Tavares de Castro que sempre estiveram presentes e dispostos a me ajudar. Aos meus colegas de Doutorado da Turma 2012.2: Alaerson, Eugênio e Maurício.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS .....	xii
LISTA DE FIGURAS .....	xv
RESUMO GERAL .....	1
GENERAL ABSTRACT .....	3
JUSTIFICATIVA .....	5
HIPÓTESE .....	5
OBJETIVO GERAL .....	5
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	5
CAPÍTULO 1 .....	6
REVISÃO DE LITERATURA .....	6
A CULTURA DO ALGODÃO .....	7
O ALGODÃO NO MUNDO .....	8
DOENÇAS DO ALGODOEIRO .....	11
MURCHA-DE-FUSARIUM – <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>vasinfectum</i> .....	12
MELOIDOGINOSE – <i>Meloidogyne incognita</i> (Kofoid & White) Chitwood .....	14
CICLO DE VIDA DE <i>Meloidogyne</i> spp. ....	15
IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES E RAÇAS .....	18
CONTROLE DE <i>Fusarium</i> e <i>Meloidogyne</i> .....	19
CONTROLE BIOLÓGICO .....	21
O NEMATOIDE <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	28
LITERATURA CITADA .....	32
CAPÍTULO 2 .....	43
UTILIZAÇÃO DE <i>Caenorhabditis elegans</i> COMO INDICADOR DE TOXICIDADE DE ESTIRPES DE <i>Bacillus thuringiensis</i> AO NEMATOIDE <i>Meloidogyne incognita</i> raças 3 e 4 .....	44
1. RESUMO .....	44
USE OF <i>Caenorhabditis elegans</i> AS A MODEL FOR THE DEVELOPMENT OF A METHOD FOR SELECTION OF <i>Bacillus</i> STRAINS TOXIC TO <i>Meloidogyne incognita</i> races 3 and 4 .....	45
2. ABSTRACT .....	45
3. INTRODUÇÃO .....	48

4.	MATERIAL E MÉTODOS .....	51
4.1.	ESTIRPES DE <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	51
4.2.	MANUTENÇÃO DA POPULAÇÃO DE <i>C. elegans</i> .....	51
4.3.	MANUTENÇÃO DA POPULAÇÃO DE <i>Meloidogyne incognita</i> .....	51
4.4.	SELEÇÃO DE ESTIRPES TÓXICAS A <i>C. elegans</i> .....	52
4.5.	SELEÇÃO DE ESTIRPES TÓXICAS A <i>M. incognita</i> raça 3 <i>in vitro</i> .....	53
4.6.	SELEÇÃO DE ESTIRPES TÓXICAS A <i>M. incognita</i> raça 3 <i>in vivo</i> .....	53
4.7.	CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS ESTIRPES TÓXICAS .....	54
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	56
	ENSAIO COM <i>C. elegans</i> <i>in vitro</i> e <i>M. incognita</i> <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .....	56
6.	CONCLUSÕES .....	60
7.	LITERATURA CITADA .....	61
	CAPÍTULO 3 .....	67
	MECANISMO DE AÇÃO E AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE PRODUTOS COM <i>Bacillus</i> NO CONTROLE DE <i>Meloidogyne incognita</i> raças 3 e 4 EM ALGODÃO EM CASA DE VEGETAÇÃO .....	68
1.	RESUMO .....	68
	MECHANISM OF ACTION AND EVALUATION OF EFFICIENCY OF PRODUCTS WITH <i>Bacillus</i> TO CONTROL <i>Meloidogyne incognita</i> races 3 and 4 ON COTTON UNDER GREENHOUSE .....	70
2.	ABSTRACT .....	70
3.	INTRODUÇÃO .....	72
4.	MATERIAL E MÉTODOS .....	74
4.1.	PRODUÇÃO DO INÓCULO DE <i>Meloidogyne incognita</i> .....	74
4.2.	PRODUTOS COMERCIAIS .....	74
4.3.	ENSAIO EM CASA DE VEGETAÇÃO .....	74
4.3.1.	AVALIAÇÕES .....	76
4.4.	HISTOPATOLOGIA COMPARADA ENTRE PLANTA COM E SEM BACTÉRIA .....	78
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	83
	ALTURA DE PARTE AÉREA DAS PLANTAS .....	83
	MASSA FRESCA DE PARTE AÉREA .....	89
	MASSA SECA DE PARTE AÉREA .....	90
	MASSA FRESCA DA RAIZ .....	92

FATOR DE REPRODUÇÃO DO NEMATOIDE EM CASA DE VEGETAÇÃO .....	95
HISTOPATOLOGIA .....	96
6. CONCLUSÕES.....	111
7. LITERATURA CITADA.....	112
CAPÍTULO 4.....	120
SELEÇÃO DE ESTIRPES DE <i>Bacillus</i> sp. CONTRA <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i> .....	121
1. RESUMO .....	121
SELECTION OF <i>Bacillus</i> sp. STRAINS AGAINST <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>vasinfectum</i> .....	122
2. ABSTRACT .....	122
3. INTRODUÇÃO .....	123
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	127
4.1. SELEÇÃO DE ESTIRPES DE <i>Bacillus</i> CONTRA <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i> .....	127
4.1.2. PREPARO DAS PLACAS.....	128
4.2. ANTAGONISMO DE <i>Bacillus</i> A <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i> .....	129
4.3. ESCALA DE AVALIAÇÃO DO ENSAIO DE COMPETIÇÃO .....	131
4.4. AVALIAÇÃO DO EFEITO DE METABÓLITOS NÃO VOLÁTEIS .....	133
4.5. INTERAÇÃO DE <i>Fusarium oxysporum</i> E <i>Bacillus</i> SPP. AO MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA .....	134
4.6. AVALIAÇÃO DO EFEITO DE METABÓLITOS VOLÁTEIS .....	135
4.7. TESTES EM CASA DE VEGETAÇÃO.....	136
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	140
SELEÇÃO DE MEIO DE CULTURA PARA TESTES COM <i>Fusarium oxysporum</i> ... 140	
ESCALA DE AVALIAÇÃO DO ENSAIO DE COMPETIÇÃO .....	141
AVALIAÇÃO DO ANTAGONISMO DE <i>Bacillus</i> spp. CONTRA <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i> EM CULTIVO PAREADO .....	143
AVALIAÇÃO DO EFEITO INIBIDOR DE METABÓLITOS NÃO VOLÁTEIS PRODUZIDOS POR <i>Bacillus</i> spp.....	147
TESTES EM CASA DE VEGETAÇÃO.....	154
6. CONCLUSÕES.....	159
7. LITERATURA CITADA.....	160
CONCLUSÕES GERAIS .....	167

ANEXOS..... 169

## LISTA DE TABELAS

Página

### CAPÍTULO 1

<b>TABELA 1:</b> Teste de determinação de raças de <i>Meloidogyne</i> de Taylor e Sasser (1978).....	18
--	----

### CAPÍTULO 2

<b>TABELA 1:</b> Número [transformados ( $\sqrt{x}$ )] de <i>Caenorhabditis elegans in vitro</i> e <i>Meloidogyne incognita in vitro</i> e <i>in vivo</i> (NN), percentual de controle (PC) e genes presentes nas estirpes de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	58
---	----

### CAPÍTULO 3

<b>TABELA 1:</b> Produtos utilizados no experimento com seus respectivos princípios ativos e dosagens recomendadas pelos fabricantes.....	73
<b>TABELA 2:</b> Efeito de formulações a base de <i>Bacillus</i> comerciais na altura do algodoeiro ('BRS 286') sem e com ataque de <i>Meloidogyne incognita</i> em casa de vegetação, aos 33 dias após a emergência.....	82
<b>TABELA 3:</b> Efeito de formulações a base de <i>Bacillus</i> comerciais na altura do algodoeiro ('BRS 286') sem e com ataque de <i>Meloidogyne incognita</i> em casa de vegetação, aos 74 dias após a emergência.....	83
<b>TABELA 4:</b> Efeito de formulações a base de <i>Bacillus</i> comerciais na altura do algodoeiro ('BRS 286') sem e com ataque de <i>Meloidogyne incognita</i> em casa de vegetação, aos 107 dias após a emergência.....	85
<b>TABELA 5:</b> Efeito de formulações a base de <i>Bacillus</i> comerciais na altura do algodoeiro ('BRS 286') sem e com ataque de <i>Meloidogyne incognita</i> em casa de vegetação, aos 136 dias após a emergência.....	86
<b>TABELA 6:</b> Efeito de formulações a base de <i>Bacillus</i> comerciais na altura do algodoeiro ('BRS 286') sem e com ataque de <i>Meloidogyne incognita</i> em casa de vegetação, aos 200 dias após a emergência.....	87
<b>TABELA 7:</b> Efeito de formulações a base de <i>Bacillus</i> comerciais na massa fresca da parte aérea de algodoeiro ('BRS 286') sem e com <i>Meloidogyne incognita</i> em casa de vegetação, aos 200 dias após a emergência.....	89
<b>TABELA 8:</b> Efeito de formulações a base de <i>Bacillus</i> comerciais na massa seca da parte aérea de algodoeiro ('BRS 286') sem e com <i>Meloidogyne incognita</i> em casa de vegetação, aos 200 dias após a emergência.....	90
<b>TABELA 9:</b> Efeito de formulações a base de <i>Bacillus</i> comerciais na massa fresca das raízes de algodoeiro ('BRS 286') sem e com <i>Meloidogyne incognita</i> em casa de vegetação, aos 200 dias após a emergência.....	92
<b>TABELA 10:</b> Efeito de formulações a base de <i>Bacillus</i> comerciais na massa seca de raiz de algodoeiro ('BRS 286') sem <i>Meloidogyne incognita</i> em casa de vegetação, aos 200 dias após a emergência.....	93
<b>TABELA 11:</b> Efeito de formulações a base de <i>Bacillus</i> comerciais sobre o	

fator de reprodução de <i>Meloidogyne incognita</i> em algodoeiro ('BRS 286') em casa de vegetação, aos 180 dias após a inoculação dos nematoides.....	94
<b>TABELA 12:</b> Efeito de <i>B. methylotrophicus</i> sobre o número de juvenis de <i>M. incognita</i> que penetraram em raízes do algodoeiro (FM 966) até o 12° DAI.....	96
<b>TABELA 13:</b> Número de juvenis de segundo estadio de <i>M. incognita</i> recuperados do substrato das plantas do ensaio de histopatologia até o 12° DAI (método do Funil de Baermann).....	97
<b>TABELA 14:</b> Efeito de <i>B. methylotrophicus</i> sobre o fator de reprodução (FR) de <i>M. incognita</i> no algodoeiro (FM 966) no 45° DAI do ensaio de histopatologia.....	97

#### CAPÍTULO 4

<b>TABELA 1:</b> Quantidade (g) dos reagentes usados em 1L de água destilada em meios de cultura.....	127
<b>TABELA 2:</b> Valores das notas da escala proposta em porcentagem do diâmetro total, comprimento do diâmetro em centímetros, área da colônia em centímetros quadrados, porcentagem máxima ocupada pela colônia para cada uma das notas e valores dos intervalos entre as notas em centímetros quadrados de área e porcentagem da área total.....	141
<b>TABELA 3:</b> Porcentagem de estirpes de <i>Bacillus</i> inseridas nas notas da escala sugerida no trabalho (178 estirpes avaliadas).....	142
<b>TABELA 4:</b> Efeito de metabólitos não voláteis de <i>Bacillus</i> sobre a área (cm <sup>2</sup> ) da colônia de <i>Fusarium</i> .....	146
<b>TABELA 5:</b> Efeito de metabólitos voláteis de <i>Bacillus</i> sobre a área (cm <sup>2</sup> ) da colônia de <i>Fusarium</i> .....	150
<b>TABELA 6:</b> Germinação de sementes (Número de plantas) de algodão tratadas com <i>Bacillus</i> para controle de <i>Fusarium</i> em casa de vegetação.....	155

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>CAPÍTULO 1</b>	
<b>FIGURA 1:</b> Ciclo de vida de <i>Meloidogyne</i> sp., o nematoide das galhas.....	16
<b>FIGURA 2:</b> Ciclo de vida de <i>C. elegans</i> .....	30
<b>CAPÍTULO 3</b>	
<b>FIGURA 1:</b> Raízes de algodão (FM 966) ao segundo dia de inoculação dos nematoides. As letras ‘A’ se referem a testemunha e ‘B’ ao tratamento com <i>Bacillus</i> .....	99
<b>FIGURA 2:</b> Raízes de algodão (FM 966) ao quarto dia de inoculação dos nematoides.....	100
<b>FIGURA 3:</b> Raízes de algodão (FM 966) ao sexto dia de inoculação.....	102
<b>FIGURA 4:</b> Raízes de algodão (FM 966) ao oitavo dia de inoculação.....	103
<b>FIGURA 5:</b> Raízes de algodão (FM 966) ao décimo dia de inoculação.....	104
<b>FIGURA 6:</b> Raízes de algodão (FM 966) ao décimo segundo dia de inoculação.....	105
<b>FIGURA 7:</b> Raízes de algodão (FM 966) ao décimo quinto dia de inoculação onde já pode ser observado o início da lignificação.....	106
<b>FIGURA 8:</b> secções de raízes de algodão (FM 966) coradas com azul de toluidina.....	109
<b>CAPÍTULO 4</b>	
<b>FIGURA 1:</b> Teste pareado.....	129
<b>FIGURA 2:</b> Crescimento das colônias fungicas em ensaio pareado.....	131
<b>FIGURA 3:</b> Unidade experimental do ensaio de metabólitos voláteis.....	135
<b>FIGURA 4:</b> Avaliação de crescimento das colônias de <i>Fusarium oxysporum</i> e <i>Bacillus</i> sp. em combinações de meios de cultura com diferentes concentrações de reagentes.....	139
<b>FIGURA 5:</b> Exemplos de seleção de placas com pareado.....	143
<b>FIGURA 6:</b> Imagens de Microscopia Eletronica de Varredura – MEV.....	145

**MONTALVÃO, S.C.L. Uso de *Bacillus* spp. para o biocontrole de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e *Meloidogyne incognita* no algodoeiro (*Gossypium hirsutum*) 2016. 169p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília, DF.**

## **RESUMO GERAL**

O algodoeiro é uma das espécies mais cultivadas no mundo. A cotonicultura brasileira tem destaque, ocupando o 5º lugar entre os produtores mundiais e 3º como exportador. Apresenta a maior média de produção por área cultivada (~5t/ha) em sequeiro no mundo. As pragas e doenças podem comprometer a produtividade. Assim, duas doenças merecem destaque, a meloidoginose (*Meloidogyne incognita* raças 3 e 4) e a murcha de fusário (*Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*), pois podem ser destrutivas às plantas, tanto isoladamente como em associação. A dificuldade de se fazer um controle eficiente, é devido à capacidade dos patógenos de parasitarem uma ampla gama de hospedeiros e terem grande persistência no solo, dificultando o controle através de tratamentos culturais como a rotação de cultura e até mesmo a utilização de tratamentos químicos. A busca por alternativas como o uso de *Bacillus* sp. no controle de doenças de plantas é justificada. Assim, o objetivo geral desse trabalho foi selecionar e caracterizar estirpes de *Bacillus* antagonistas a *M. incognita* e *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (*Fov*). Para tanto, foi realizado um ensaio *in vitro* com 11 estirpes de *Bacillus thuringiensis* para verificar a atividade tóxica a *Caenorhabditis elegans*, e posteriormente contra J2 de *M. incognita*, em laboratório e em casa de vegetação. Também foram testados quatro produtos biológicos (Onix, Rizos, NemaControl e Nemix) e carbofuran – (Furadan 350 SC) para o controle de *M. incognita* em casa de vegetação. Para isso, foi instalado um ensaio em delineamento inteiramente casualizado com seis repetições por tratamento e uma planta por vaso. Foram inoculados os ovos e eventuais J2 do nematoide, 20 dias após a emergência das plantas e as seguintes variáveis foram avaliadas: altura (cm), peso fresco da parte aérea (g), peso seco da parte aérea (g), peso fresco de raiz (g), peso seco de raiz (g) e fator de reprodução (FR). Para a histopatologia, foi selecionado o produto Onix (*Bacillus methylotrophicus*) inoculado em sementes de algodão. Vinte dias após a emergência das plântulas foi inoculada uma suspensão de J2 de *M. incognita*. As avaliações foram realizadas entre 2 e 45 dias após a inoculação, com o cálculo de fator de reprodução, acompanhamento da penetração de J2 durante os 12 primeiros dias após a inoculação dos nematoides e cortes histopatológicos da raiz para acompanhar o desenvolvimento do parasita. Para a realização dos ensaios de seleção de *Bacillus* contra *Fov*, foi realizada uma seleção prévia do meio de

cultura, onde diferentes concentrações de meio EMBRAPA e meio BDA foram avaliadas. Nos testes de antagonismo, foi proposta uma escala de notas para facilitar as avaliações, onde com os testes e o auxílio da escala foram avaliados 178 isolados de *Bacillus* e selecionadas 13 estirpes para os ensaios de metabólitos solúveis em água e metabólitos voláteis. Por fim, foi realizado um teste em casa de vegetação para avaliar a eficiência dos isolados selecionados *in vitro*, onde as sementes de algodão foram sanitizadas, microbiolizadas com micélio e esporo de *Fov* colocadas em bandejas com substrato, inoculadas com os tratamentos e conduzidas em casa de vegetação por 25 d. Quatro estirpes de *B. thuringiensis* tóxicas a *C. elegans* também apresentaram atividade de controle *in vivo* sobre *M. incognita*; o produto Onix reduziu aproximadamente 50% o FR de *M. incognita*; para os testes de antagonismo contra *Fov*, as estirpes de *Bacillus*, GF267, S1301, S1823, S1967, S2535 e S2536 foram selecionadas.

**Palavras-chave:** Controle biológico, fusariose, galha, tratamento de sementes.

---

Orientador – Luiz Eduardo Bassay Blum – Universidade de Brasília

Co-orientador – Rose Gomes Monnerat – EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia

**MONTALVÃO, S.C.L. Use of *Bacillus* spp. for the biocontrol of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* and *Meloidogyne incognita* in cotton (*Gossypium hirsutum*) 2016. 169p. Thesis (DSc in Plant Pathology) – Universidade de Brasília, Brasília, DF.**

## **GENERAL ABSTRACT**

Cotton crop is one of the most cultivated around the world. The Brazilian cotton production has grown, occupying 5<sup>th</sup> place among world's producers and 3<sup>rd</sup> as exporter. Brazil presents the highest world yield average per cultivated area (~5t/ha) in non-irrigated land. Pests and diseases can compromise cotton production. Thus, two diseases highlight: root-knot nematode (*Meloidogyne incognita* races 3 and 4) and *Fusarium*-wilt (*Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*). These pathogens are destructive to the plant, both singly as in association. The difficulty of making an efficient control, is due to the ability of the pathogens to infect a wide range of hosts and to have great persistence in soil, making difficult to control through cultural practices as crop rotation and even the use of chemical treatments. Search for alternatives such as the use of *Bacillus* sp. on the control of plant diseases is justified. Thus, the overall objective of this work was to select and characterize strains of *Bacillus* antagonists to *M. incognita* and *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (*Fov*). For that, initially an *in vitro* trial was conducted with 11 strains of *Bacillus thuringiensis* to evaluate their toxic activity to *Caenorhabditis elegans*, and later against J2 juveniles of *M. incognita*, in laboratory conditions and under greenhouse. Were also tested four commercial products (Onix, Rizos, NemaControl and Nemix) and carbofuran – (Furadan 350 SC) for the control of *M. incognita* under greenhouse. This test was conducted in a completely randomized design with six replications per treatment and one plant per pot. Nematode eggs were inoculated, 20 d after emergence of plants and the following plant variables were evaluated: height (cm), shoot fresh weight (g), shoot dry weight (g), fresh root weight (g), root dry weight (g), the reproduction factor (RF). For the histopathological study was selected the product Onix (*Bacillus methylotrophicus*) inoculated on cotton seeds. Twenty days after cotton seed germination a suspension of juveniles of *M. incognita* was inoculated. The evaluations was carried out from 2 to 45 d after inoculation. The reproduction factor and penetration of J2 were evaluated and observed by histopathology tissue cuts. For the tests of selection of *Bacillus* against *Fov*, a prior selection of culture media was done, where different concentrations of culture medium EMBRAPA and BDA were evaluated. In tests of antagonism 178 isolates of

*Bacillus* have been tested and 13 strains were selected for water-soluble metabolites and volatile metabolites. Finally, a greenhouse test was conducted to evaluate the efficiency of *in vitro* of selected isolates, where the cotton seeds were inoculated with *Fov* and antagonists, and, cultivated under greenhouse for 25 d. Four strains of *B. thuringiensis* toxic to *C. elegans* also *in vivo* controled *M. incognita*; the product 'Onix' reduced around 50% of RF for *M. incognita*; in tests of antagonism against *Fov*, the strains of *Bacillus*, GF267, S1301, S1823, S1967, S2535 e S2536 were selected.

**Key words:** biological control, gall, seed treatment, wilt.

## JUSTIFICATIVA

As perdas causadas por *M. incognita* e *F. oxysporum* em algodoeiro são preocupantes, sobretudo quando estes agem em interação, tornando o controle difícil e oneroso. Portanto, a busca por biocontroladores é plausível por diminuir a pressão da utilização de produtos químicos na agricultura, além de ser uma forma de controle ambientalmente limpa e com potencial para implementação em programas de manejo integrado de doenças.

## HIPÓTESE

Há estirpes de *Bacillus* que possuem características desejáveis ao controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e *Meloidogyne incognita* raças 3 e 4.

## OBJETIVO GERAL

Selecionar e caracterizar estirpes de *Bacillus*, com potencial antagônico a *M. incognita* raças 3 e 4 e *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Validar o método de bioensaio utilizando *C. elegans* como modelo e o ajustar como método para realização de bioensaio de *Bacillus* com *Meloidogyne incognita*
- Selecionar estirpes de *Bacillus* tóxicas a *Fusarium oxysporum*
- Caracterizar as estirpes de *Bacillus* tóxicas a *M. incognita* (método bioquímico e molecular) e a *Fusarium oxysporum* (método bioquímico e molecular)
- Avaliar a eficácia de produtos comerciais à base de *Bacillus* a *Meloidogyne incognita*
- Compreender o modo de ação da bactéria (ingrediente ativo) presente no produto que causar maior mortalidade ao nematoide
- Avaliar em casa de vegetação o potencial de *Bacillus* no controle de *Fusarium oxysporum* em tratamento de sementes.

# CAPÍTULO 1

REVISÃO DE LITERATURA

---

---

## A CULTURA DO ALGODÃO

Considerada como uma importante cultura mundial não alimentícia, o algodoeiro possui suas primeiras referências há 2.800 anos. Há mais de 2.500 anos A.C., no litoral do Peru foram encontrados vestígios de artefatos produzidos em algodão, com base no carbono 14, o que comprova que os povos americanos já dominavam técnicas de manipulação do algodão (BELTRÃO & ARAÚJO, 2004).

O algodoeiro é uma planta dicotiledônea hirsuta ou glabra, anual ou perene, herbácea, arbustiva ou arbórea, pertencente a família Malvaceae, gênero *Gossypium*, onde estão descritas mais de 50 espécies (LAWS, 2013). Quatro dessas se destacam pela produção de fibra comercial e devido a essa característica deram origem ao termo “algodoeiro”. São elas: *Gossypium hirsutum* L. com origem América Central; *G. barbadense* proveniente da América do Sul; *G. herbaceum* da África; e *G. arboreum* da Ásia (GRID-PAPP, 1965). A espécie que se destaca com maior importância comercial, por possuir uma maior concentração de características agronômicas desejáveis é a *G. hirsutum*, respondendo por mais de 90% das fibras de algodão produzidas no mundo (LEE, 1984). Estima-se que, na atualidade, mais de 2.500 cultivares estejam em uso nos mais de 100 países que exploram o algodão (BELTRÃO & ARAÚJO, 2004).

*Gossypium hirsutum*, conhecido como algodão herbáceo ou anual, possui altura entre 60 e 100 cm, caules variando entre as cores verde e marrom, pouco ramificada com ramos frutíferos e vegetativos, flores completas, brácteas que promovem uma proteção extra podendo possuir nectários interna ou externamente a sua base, folhas sem bainha com duas estípulas, dois tipos de glândulas e pelo menos duas gemas na base de cada folha (BORÉM & FREIRE, 2014). Nessa espécie, encontram-se sete raças geográficas, sendo elas: Latifolium (que compreende as cultivares modernas do algodão de fibra média), morrillii, richmandi, palmeri, punctatum, yucatanense e marie-galante (na qual se insere o algodão mocó do

Nordeste brasileiro). A raça latifolium é originária do México e da Guatemala, e a raça mariegalante é originária da América do Sul (BELTRÃO & ARAÚJO, 2004).

No algodão em caroço, cerca de 60% do peso é composto por sementes e 40% por pluma. Tal proporção pode sofrer variações em função da cultivar, mas, as cultivares modernas podem alcançar maior rendimento de pluma, o que é desejável na produção de fibra (ABRAPA, 2015). Essa fibra produzida é utilizada na confecção de tecidos, ataduras, fraldas, gaze e até papel (LAWS, 2013). As sementes possuem grande valor econômico para a indústria, pois, por serem ricas em óleo e proteína bruta, são utilizadas como matéria-prima na produção de sabões, margarina e óleo de cozinha. O subproduto da produção do óleo é a torta ou farelo, rico em proteína bruta (40 – 45%), e serve para a produção de ração animal. Também na produção de rações animais, podem ser aproveitados os restos da cultura como, folhas, caules, maçãs e capulhos (SOAVE & MORAES, 1987). As fibras que aderem à semente são empregadas na produção de cosméticos, pele de salsicha, dinamite e plásticos. Existem ainda outros produtos, tais como: sorvetes, propelente em alguns fogos de artifício, goma de mascar e outros que contêm na composição celulose do algodoeiro (LAWS, 2013).

Espécies selvagens não apresentam fibras ou, quando as apresentam, não possuem torções e assim não são fiáveis, além de possuírem comprimento de fibra pequeno e baixa resistência, tornando seu aproveitamento para a indústria inviável (BORÉM & FREIRE, 2014). Isso não significa que são menos importantes para a cotonicultura, pois, são essas espécies selvagens a principal fonte de resistência genética para o melhoramento (LEE, 1987).

## **O ALGODÃO NO MUNDO**

Cultivado em mais de 60 países, ocupando uma área maior que 35 milhões de hectares e produzindo em torno de 25 milhões de toneladas de pluma ao ano, o algodoeiro é um importante produto agrícola mundial e tem como seus maiores produtores a China, Índia,

Estados Unidos, Paquistão, Brasil e Uzbequistão, que juntos respondem por mais de 81% da produção mundial da fibra (ABRAPA, 2015; FAO, 2015).

Na maioria dos países a produção de algodão se dá em pequenas propriedades onde se emprega mão-de-obra familiar do produtor rural, sem o uso de alta tecnologia, implicando em baixa produtividade. Apesar disso, a China e a Índia aparecem no cenário mundial da fibra como grandes produtores, devido às extensas áreas plantadas e ao elevado número de propriedades rurais que possuem como atividade principal a cotonicultura (ABRAPA, 2015).

Em outubro de 2014, foi divulgado que após uma grande safra, em 2011/12, onde foram verificados aumentos da produção de algodão em países tais como a China, Índia e Paquistão, houve em sequência uma retração na safra 2012/13 (Relatório ICAC, 'Cotton This Month', in. relatório da ABRAPA). Quando se considera os seis maiores produtores, o que incluem Estados Unidos, Brasil e Uzbequistão, as exceções ficaram por conta dos Estados Unidos e Uzbequistão, que vinham de uma safra menos favorável em 2011/12, recuperando em 2012/2013, com aumentos de 11,2% e 13,6%, respectivamente. O mesmo não ocorreu no Brasil, visto que, o país já previa uma redução da área plantada para 2012/13, o que culminou com uma retração no volume produzido da ordem de 30% em relação a safra 2011/12. Nessa mesma safra houve registro de queda na produção de 4,2% em relação a safra 2010/11. Dado a este fato, os seis maiores produtores mundiais de algodão apresentaram uma desaceleração de 3,3% na safra 2012/13.

Na safra 2013/14 o conjunto dos seis maiores produtores mantiveram a queda de produção que foi próxima a 2%, porém o Brasil, a Índia e o Paquistão não contribuíram para essa queda, visto que tais países mostraram um aumento de volume em relação a safra 2012/13 de 30%, 8,8 % e 3,6%, respectivamente (ABRAPA, 2015). Houve evolução do Brasil em relação a sua colocação no ranking dos maiores produtores de algodão, pois, atualmente o país é o quinto maior produtor mundial da fibra, com uma área cultivada de 1,12 milhões de

hectares e uma produção de 1.734.200 toneladas (2013/14) (ABRAPA, 2015; CONAB, 2014).

O Brasil se destaca hoje como um dos maiores exportadores mundiais do algodão e possui a segunda melhor média de produtividade, perdendo apenas para a Austrália onde a cultura é praticamente toda irrigada. Levando em consideração apenas o algodão produzido em sequeiro (sem utilização de sistemas de irrigação artificiais), o Brasil se destaca com a melhor média mundial de produção nessa modalidade de cultivo (ABRAPA, 2015).

A cotonicultura brasileira está distribuída por 15 Estados, mas, 85% da área plantada se localiza no Mato Grosso e na Bahia (LUNARDON, 2007; CONAB, 2014). Esse setor agrícola passou por transformações nas últimas décadas e se configura como um dos mais modernos. O marco das mudanças para a cotonicultura do Brasil é 1996, quando, os centros produtores transitaram de pequenas propriedades ( $\leq 100$  ha), que utilizavam baixo nível tecnológico e que se concentravam no Sul e Sudeste do Brasil, para grandes propriedades ( $\geq 2.500$  ha) e com altos níveis tecnológicos, localizadas no Centro-oeste e Oeste da Bahia, dando origem a cotonicultura empresarial (BORÉM & FREIRE, 2014). Também contribuíram para essa mudança, problemas de ordem sanitária nos algodoais em São Paulo e Paraná, entre eles os nematoides fitoparasitos (LORDELLO, 1981).

Quando chegou ao bioma Cerrado, impulsionado pelos sojicultores, já instalados na região e que buscavam uma alternativa para rotação com a soja devido ao aparecimento em suas áreas do nematoide do cisto da soja (*Heterodera glycines*), o algodoeiro encontrou condições excelentes para o seu desenvolvimento, resultando em altas produtividades o que incentivou os produtores a plantarem em áreas cada vez maiores (MELO FILHO & RICHETTI, 2003).

Essa intensificação do cultivo de algodão em 1990, onde extensas áreas foram cultivadas com um reduzido número de variedades, além das condições edafoclimáticas da

região que apresenta altas temperaturas, veranicos, solos em sua maioria arenosos e a suscetibilidade das cultivares mais usadas pelos produtores à doenças, levaram ao aumento da ocorrência de doenças até então consideradas inexpressivas, assim como a epidemias e ao surgimento de novas doenças. Essa situação resultou no aumento da contribuição dos insumos químicos no custo de produção dessas áreas nos últimos anos (FREIRE, 2007; BORÉM & FREIRE, 2014).

### **DOENÇAS DO ALGODOEIRO**

A cotonicultura exige cada vez mais investimentos em tecnologias para que consiga responder a crescente demanda atual por algodão. Nos últimos anos houve expressivo aumento em produtividade da cultura em razão dos avanços genéticos e melhorias do sistema de produção. Todavia, há uma constante demanda por inovações, visto que, as condições edafoclimáticas do Cerrado brasileiro assim como o sistema de cultivo adotado nessa região com extensas áreas e um reduzido número de variedades, sendo muitas delas suscetíveis a mais de uma doença, aumenta a possibilidade de aparecimento de surtos epidêmicos (SUASSUNA & COUTINHO, 2015).

Existem mais de 250 agentes patogênicos para cultura do algodão. Dentre estes, 90% são fungos, 16 vírus, 10 nematoides, quatro bactérias e dois micoplasmas. Apesar do número de patógenos, a grande maioria é considerada praga secundária, por não causar danos econômicos. Merecem destaque os patógenos *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e *Meloidogyne incognita* raças 3 e 4, que são patogênicos e causam grandes perdas de produtividade e em alguns casos até inviabilizam a produção (BRADBURY, 1986; GOTO, 1990; CIA & SALGADO, 2005 ; IAMAMOTO, 2005; AMORIM *et al.*, 2011).

## **MURCHA-DE-FUSARIUM – *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum***

A murcha-de-fusarium ou fusariose é a principal doença do algodoeiro de ciclo anual e já se encontra disseminada em todas as regiões produtoras de algodão no mundo causando consideráveis perdas de produção. O primeiro relato desse patógeno causando danos à cotonicultura foi em 1892 no Alabama, Estados Unidos (ATKINSON, 1892 citado por DAVIS *et al.*, 2006), e logo no início do século XX, essa doença já tinha sido reportada em várias regiões produtoras de algodão no mundo (DAVIS *et al.*, 2006). No Brasil, seu primeiro relato ocorreu em Alagoinha, Paraíba, na década de 1930 (VEIGAS, 1935; KRUG, 1936). Já no final da década de 1950 a doença já se encontrava disseminada nas regiões produtoras do estado de São Paulo, onde foi responsável pela fase de decadência da cotonicultura paulista (CIA, 1977). A partir de então esse patógeno disseminou-se para as demais regiões produtoras de algodão do País e mais recentemente chegou ao estado do Mato Grosso. Em virtude de todo esse processo, surgiu a necessidade do desenvolvimento de variedades resistentes, forma economicamente viável de controle do patógeno (AMORIM *et al.*, 2011).

A doença é causada por *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* (*Fov*), que é uma espécie heteromórfica, não apresentando uma única origem filogenética. Isso sugere, que o seu desenvolvimento pode ter se dado a partir da associação entre fenótipos virulentos com mais de um grupo de compatibilidade vegetativa (KATAN & KATAN, 1988; KIM *et al.*, 1993; BAAYEN *et al.*, 2000; LORI *et al.*, 2004). Todos algodoeiros cultivados são hospedeiros de *Fov*. Ao contrário da maioria das formas especializadas, *Fov* pode apresentar outros hospedeiros, das famílias Malvaceae, Solanaceae e Leguminosae (ARMSTRONG & ARMSTRONG, 1978; ASSIGBETSE *et al.*, 1994). Davis *et al.* (2006) relataram a ocorrência de oito raças do patógeno no mundo. Até o momento, no Brasil foi relatada apenas a raça 6 do patógeno (ARMSTRONG & ARMSTRONG, 1978; BIBANCO *et al.*, 2010).

Podendo ocorrer em qualquer estadio de desenvolvimento da planta, o *Fov* causa amarelecimento em plântulas, além de enegrecimento e necrose das folhas cotiledonares, culminando na perda dessas estruturas e levando a planta à morte. Quando a ocorrência é em plantas adultas, essas se apresentam menores, com folhas e capulhos reduzidos. Os sintomas iniciam-se nas folhas basais mostrando perda de turgescência, amarelecimento em áreas irregulares da superfície foliar, crestamento do limbo e posteriormente a queda das folhas. Durante o processo infeccioso, as plantas perdem todas as folhas e as novas brotações caem permanecendo apenas o caule enegrecido (DAVIS *et al.*, 2006). Outro sintoma característico dessa doença pode ser observado seccionando-se longitudinalmente caules e raízes, onde se observa a descoloração dos feixes vasculares ocasionada pela obstrução do lúmen dos vasos pela formação de tiloses, presença de esporos e micélio do fungo e/ou por substâncias metabolizadas pelo fungo nos vasos. Como consequência disso, ocorre a murcha da planta, sintoma que nomeia a doença (AMORIM *et al.*, 2011).

Esse patógeno produz microconídios, macroconídios e clamidósporos. Os clamidósporos possibilitam a sobrevivência no solo por longos períodos (25-30 anos). Além dessa capacidade de persistência no solo na ausência de hospedeiras, há isolados de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* capazes de colonizar raízes e vasos condutores de plantas, sem, no entanto, causar sintomas de doença (SMITH *et al.*, 1981; GORDON & MARTYN, 1997). Quanto a sua dispersão, essa pode ser a curtas distâncias, onde veículos tais como a água, o vento e máquinas agrícolas podem arrastar partículas de solo de áreas contaminadas para áreas onde o patógeno ainda não está presente. Em longas distâncias, a dispersão ocorre principalmente por sementes externa ou internamente contaminadas (DAVIS *et al.*, 2006).

A infecção inicia nas raízes, sendo favorecida pela presença de nematoides, como *M. incognita*, que aumenta a severidade, devido ao processo de parasitismo exercido por este, o que aumenta a sensibilidade da planta (AMORIM *et al.*, 2011). Além disso, os nematoides

ferem as raízes das plantas durante a penetração nas raízes, o que facilita a entrada de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* nas áreas lesionadas da raiz (PAIVA *et al.*, 2001). Outras condições, como alto teor de areia no solo, pH baixo, fertilidade desequilibrada, temperaturas entre 25° C e 32° C e alta umidade, favorecem a doença (BORÉM & FREIRE, 2014).

No momento, não existem cultivares resistentes a fusariose, o que dificulta o seu controle. Porém, algumas medidas são importantes para se manejar esse patógeno no campo, como o desenvolvimento de variedades resistentes, rotação de culturas e adoção do princípio de exclusão, evitando a entrada do patógeno em áreas não contaminadas. Neste contexto, a utilização de sementes sadias e certificadas, assim como o tratamento químico de sementes são fundamentais para que se tenha sucesso no controle (BELTRÃO, 1999; CIA *et al.*, 1999).

#### **MELOIDOGINOSE – *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood**

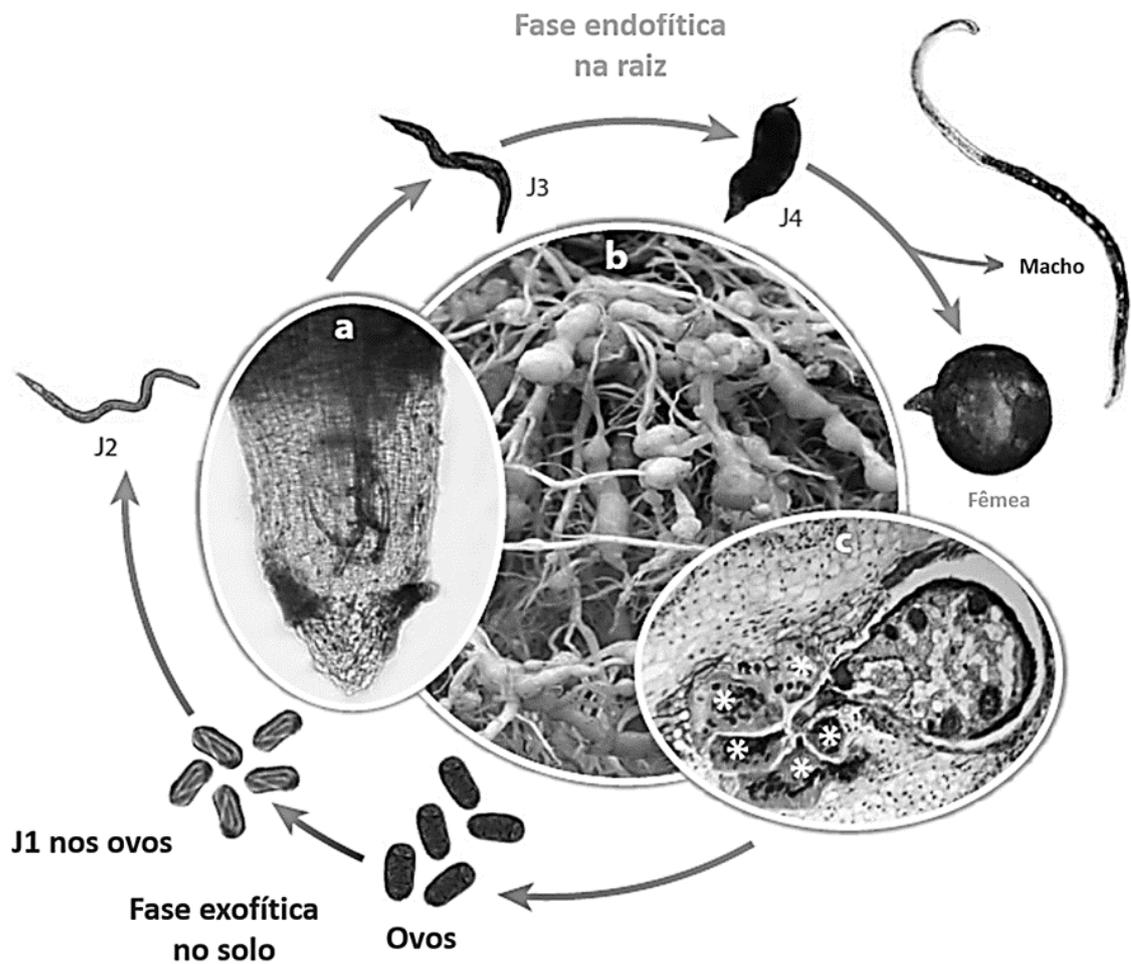
Três nematoides estão constantemente associados ao algodão no Brasil (CURI & BONA, 1972; LORDELLO, 1981; MONTEIRO & FERRAZ, 1987; GOULART *et al.*, 1997): o das galhas (*Meloidogyne incognita*); o reniforme (*Rotylenchulus reniformis*); e o das lesões radiculares (*Pratylenchulus brachyurus*) (AMORIM *et al.*, 2011).

Plantas sob ataque de *Meloidogyne* possuem a formação de galhas nas raízes no ponto de penetração do juvenil, com calibre duas a três vezes maior que regiões não parasitadas pelo patógeno. A formação das galhas nas raízes irá limitar suas funções, com consequente redução da área de contato com o solo, e, redução na absorção de água e nutrientes. Na parte aérea das plantas, os sintomas são similares aos ocasionados por outros patógenos que provocam a redução da absorção de água e nutrientes. O crescimento da planta é reduzido, assim como das folhas e frutos. É comum as folhas apresentarem um mosqueado de coloração amarelada, algumas vezes avermelhada, em contraste com o verde normal da folha. Esse

sintoma de amarelecimento inter-nerval seguido de necrose inter-nerval, é conhecido como folha “carijó” (FREITAS *et al.*, 2009; MOENS *et al.*, 2009; AMORIM *et al.*, 2011).

### **CICLO DE VIDA DE *Meloidogyne* spp.**

O ciclo de vida do nematoide (Figura 1) começa com o ovo, onde no interior será formado o juvenil de primeiro estadio (J1) a partir de várias transformações durante o seu desenvolvimento embrionário. Dentro do ovo, o J1 passa pela primeira ecdise se transformando em juvenil de segundo estadio (J2), que é a fase infectante. Sob condições ambientais favoráveis, o J2 abre um orifício na casca do ovo com o seu estilete e eclode (FERRAZ *et al.*, 2012). No solo, ele se movimenta através de filme d’água até que localize a raiz de um hospedeiro para penetrar (CURTIS *et al.*, 2009). Tal localização se dá através do gradiente de concentração formado pela liberação de exsudados radiculares da planta e funcionando como orientação para o J2. Na raiz, o nematoide irá penetrá-la na região da zona de alongação celular, logo atrás da coifa (TAYLOR & SASSER, 1983). Esta zona, por estar em diferenciação celular, possui alta atividade metabólica produzindo grande quantidade de exsudados que são liberados no ambiente. Outra característica dessa região é que as células novas possuem parede frágil com pouca deposição de lignina, suberina e celulose o que a torna suscetível à penetração pelo J2.



**FIGURA 1:** Ciclo de vida de *Meloidogyne* sp., o nematóide das galhas. (a) Estádio J2 na raiz. (b) Galhas nas raízes. (c) Fêmeas na raiz e células gigantes (\*). Fonte: modificado de Castagnone-Sereno *et al.* (2013).

Uma vez no interior da raiz, o J2 migra para o tecido vascular onde inicia sua alimentação, introduzindo substâncias nas células da planta, provocando alterações morfológicas e fisiológicas. As células parasitadas hipertrofiam, aumentando exageradamente o seu tamanho e juntamente a esse aumento há também a divisão de núcleos sem formação de parede celular e consequente divisão celular. Estas células especializadas da raiz, de 3 a 6 ao redor da cabeça do J2, recebem o nome de células gigantes (MOENS *et al.*, 2009). Ao se alimentar, o corpo do J2 sofre engrossamento e adquire uma forma alongada (“salsicha”), tornando-se sedentário (FREITAS *et al.*, 2009).

As alterações provocadas pela ação do nematoide não são restritas às células gigantes, pois, as células do córtex sofrem hiperplasia e hipertrofia, multiplicando-se desordenadamente em número e tamanho. Esse processo é o responsável pelo espessamento da raiz, formando a galha (EISENBACK & TRIANTAPHYLLOU, 1991). Em decorrência da formação das células gigantes há obstrução física dos vasos condutores, limitando ou bloqueando o livre fluxo de água e nutrientes das raízes para a parte aérea, resultando em sintomas de amarelecimento e murcha da planta (FREIRE, 2007).

Após o estabelecimento do sítio de alimentação, o J2 alimentado sofre duas ecdises, passando a J3 e J4 onde cessa sua alimentação até à fase adulta (EISENBACK & TRIANTAPHYLLOU, 1991; MOENS *et al.*, 2009). Se há a formação do macho, este adquire forma alongada, liberando a cutícula do estadio J4, saindo da raiz e deixando de se alimentar (MOENS *et al.*, 2009). Na maioria das espécies de *Meloidogyne*, ele não tem papel na reprodução, que é partenogenética (CASTAGNONE-SERENO, 2006). Quando a fêmea é formada, ela continua a se alimentar, seu corpo aumenta de volume e tamanho até tornar quase esférico completando seu amadurecimento com o início da postura de ovos em uma massa gelatinosa externa ao seu corpo (TAYLOR & SASSER, 1983). Essa massa de ovos se localiza na superfície da galha e contém de 200 a 1.000 ovos (FREIRE, 2007). Os J2 eclodem e penetram a mesma raiz ou as raízes vizinhas. A duração do ciclo de vida depende da temperatura, da umidade e do hospedeiro, podendo ocorrer aproximadamente em torno de 30 dias (FREITAS *et al.*, 2009).

Sob condições favoráveis de temperatura, umidade e hospedeiro disponível, há predominância na formação de fêmeas. Entretanto, se as condições forem desfavoráveis, o J2, passa por uma mudança e seu primórdio sexual pode se desenvolver em testículos em vez de ovários, tornando-se macho com duas gônadas. Tal fenômeno é conhecido por reversão sexual e funciona como estratégia de sobrevivência da espécie, uma vez que, com a menor

produção de ovos, o parasitismo será mais brando na planta infectada, o que garantiria a sobrevivência dos poucos indivíduos formados (FREITAS *et al.*, 2009).

## IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES E RAÇAS

Há diferenças morfométricas e morfológicas entre as espécies de *Meloidogyne*. Uma das formas de separar as espécies é usando a técnica da configuração perineal. A técnica consiste em analisar microscopicamente a região da cauda da fêmea, que engloba o ânus e a vulva. Nessa região perineal do corpo da fêmea existem marcas cuticulares características de cada espécie. Entretanto, existem populações atípicas onde a identificação apenas pela configuração perineal se torna difícil, cabendo o uso de outras ferramentas, como a eletroforese de isoenzimas que compara as diferentes enzimas de mesma atividade biológica para identificação das espécies. A união dessas duas técnicas é muito usada na identificação de espécies de *Meloidogyne* (ESBENSHADE & TRIANTAPHYLLOU, 1985; CARNEIRO *et al.*, 1996; 2000).

**TABELA 1:** Teste de determinação de raças de *Meloidogyne incognita* (Taylor e Sasser, 1978).

<i>M. incognita</i>	Fumo	Algodão
	‘NC – 95’	‘Delta Pine 16’
<b>Raça 1</b>	-	-
<b>Raça 2</b>	+	-
<b>Raça 3</b>	-	+
<b>Raça 4</b>	+	+

(+) Nematóide se multiplica; (-) Nematóide não se multiplica.

*Meloidogyne* spp. apresentam raças fisiológicas de acordo com a preferência alimentar (Tabela 1). Raças da mesma espécie não podem ser diferenciadas por morfometria,

consequentemente há a necessidade do uso de hospedeiras diferenciadoras para reprodução dessas populações (EISENBACK, 1983). *Meloidogyne hapla* não apresenta raças fisiológicas. *Meloidogyne incognita* possui quatro raças e *M. arenaria*, duas. Estas são separadas de acordo com o teste de determinação de raças de Taylor & Sasser (1978).

### **CONTROLE DE *Fusarium* e *Meloidogyne***

Esses patógenos têm ampla gama de hospedeiros e capacidade de sobreviver por longos períodos no solo sem a presença de seu hospedeiro principal, o que dificulta a adoção de métodos de controle eficientes. Os principais métodos de controle, isto é, genético, cultural e químico, são empregados para minimizar os danos causados pelos patógenos (FREIRE *et al.*, 2007).

A resistência é considerada uma das principais estratégias de controle de doenças de plantas, devido à facilidade de utilização e ao baixo custo empregado na sua utilização (AMORIM *et al.*, 2011). Até o momento, este método não se aplica para um controle satisfatório da murcha-de-fusarium do algodoeiro em qualquer área de cultivo, devido principalmente ao fato de que essa resistência é ‘quebrada’ quando, além do fungo, existe também a presença de nematoides na área cultivada, havendo assim a necessidade de se incorporar genes de resistência aos nematoides das galhas e reniforme nas cultivares resistentes a *Fov* (DAVIS *et al.*, 2006).

As seleções iniciais de resistência a fusariose conduzidas em solos infestados podem indiretamente ter selecionado para resistência ao nematoide das galhas, visto que esses patógenos podem coexistir nos campos de seleção. Essa pode ser a explicação para o bom nível de resistência alcançado pelo cultivar Cook 307-6 ao *M. incognita* (HILLOCKS, 1992).

Testes em campos infestados com *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e *M. incognita*, mostraram que cultivares que apresentavam alto nível de resistência ao nematoide tiveram

melhor desempenho na redução de perdas quando comparadas a cultivares que possuíam apenas a tolerância ao *M. incognita* associada a moderada resistência a murcha-de-fusarium (HYER *et al.*, 1974). Cultivares oriundas de cruzamentos, envolvendo um acesso de *G. hirsutum* resistente ao nematoide das galhas (Wild Mexican Jack Jones), selecionadas apenas para resistência ao nematoide, também foram resistentes ao complexo *Fusarium*-nematoide. Muitas vezes, a estratégia de selecionar genótipos resistentes ao nematoide das galhas confere, indiretamente, resistência ao complexo *Fusarium*-nematoide (HILLOCKS, 1992).

O controle cultural se baseia no uso de algumas práticas culturais (rotação de culturas, eliminação de plantas voluntárias, eliminação de hospedeiros alternativos, eliminação de restos culturais, preparo de solo, incorporação de matéria orgânica ao solo, escolha da melhor época de plantio, densidade de plantio, controle da irrigação, controle da drenagem, nutrição mineral, pH do solo, entre outros), preferencialmente combinadas, com o objetivo principal de minimizar os efeitos negativos que as doenças podem causar sobre a produção de plantas cultivadas. A atuação dessas práticas pode ser tanto sobre o hospedeiro quanto sobre o patógeno, objetivando favorecer o hospedeiro em detrimento do patógeno. As práticas utilizadas no controle cultural em sua maioria buscam exercer interferência na sobrevivência, na produção e na disseminação do inoculo do patógeno (AMORIM *et al.*, 2011).

Todavia, na maioria das vezes, o controle químico de doenças de plantas é a única medida eficiente e economicamente viável de garantir as altas produtividades e qualidade de produção. Variedades de plantas cultivadas, interessantes pelo bom desempenho agrônomico e pela preferência dos consumidores, geralmente aliam uma certa vulnerabilidade a agentes fitopatogênicos e a cultura do algodão não foge muito dessa realidade. Desta forma, o uso de produtos químicos sistêmicos ou de contato para o controle de pragas (controle químico) é muito utilizado nessa cultura, sendo essa intervenção, muitas vezes realizada antes mesmo das plantas chegarem ao campo (tratamento de sementes), seguida por aplicações sucessivas com

vários outros produtos. Este fato, pode elevar em muito os custos de produção, devido ao grande volume de agrotóxicos utilizados e aos altos preços desses produtos. Além disso, riscos ambientais e sociais (contaminação ambiental e riscos à saúde do produtor rural) podem ser potencializados, uma vez que, na maioria das vezes, tratam-se de produtos de elevada toxicidade onde o uso deve ser evitado ao máximo e quando utilizados, os cuidados durante esse uso devem ser rigorosamente acompanhados (FERRAZ & FREITAS, 2012). Nesse contexto, a necessidade de se encontrar alternativas economicamente mais vantajosas para o agricultor e menos agressivas ao meio ambiente torna-se uma realidade.

## **CONTROLE BIOLÓGICO**

O manejo das pragas e patógenos da agricultura está atualmente fundamentado no uso de agrotóxicos. Entretanto, o uso exagerado desses produtos pode acarretar efeitos colaterais como deterioração da saúde dos trabalhadores rurais e dos consumidores (LIMA *et al.*, 2000), poluição ambiental e até mesmo a seleção de patógenos resistentes aos princípios ativos (RAKH *et al.*, 2011).

Com os avanços tecnológicos e a globalização, as informações tornam-se cada vez mais dinâmicas e os conhecimentos são difundidos rapidamente em todo o mundo. Esse fato tem levado à conscientização da sociedade para as consequências de certos procedimentos para a saúde e para o meio ambiente. O controle biológico (CB) tem sido apontado como um método seguro para o manejo das doenças das plantas cultivadas (PUNJA & UTKHEDE, 2003), apresentando inúmeras vantagens em relação ao controle químico, pois com o uso de antagonistas (fungos, vírus, bactérias e outros) o controle biológico se mostra de fácil aplicação, tendo menor custo e não sendo danoso ao meio ambiente e ao homem (SOARES & SANTOS, 2006).

Segundo Baker & Cook, (1974) o CB de doenças de plantas teve início como ciência em 1926, com estudos sobre *Streptomyces scabies* (sarna comum da batata). Ainda, de acordo com esses autores, no ano de 1931 foi utilizado pela primeira vez o termo “controle biológico” em um artigo sobre *Gaeumannomyces graminis* (mal-do-pé do trigo).

O CB é resultado da interação tríplice, patógeno, planta hospedeira e antagonista, sob a influência do ambiente (BAKER & COOK, 1974). Segundo Bettiol & Ghini (1995), modificações ambientais provocadas no sítio de infecção podem resultar em limitações nas atividades do patógeno ou induzir a resistência no hospedeiro. Nessas modificações estão envolvidas práticas culturais capazes de promover condições favoráveis ao desenvolvimento do antagonista em detrimento do patógeno ou a resistência do hospedeiro.

Controle biológico é o uso de um organismo para controle de outro, podendo o agente apresentar efeito biocida, causando a morte do alvo, ou biostático, inibindo seu desenvolvimento (ZAMBOLIM, 2010). O CB pode ser visto como a redução da densidade de inóculo ou das atividades determinantes da doença, através da ação de um ou mais organismos. Para Junqueira & Gasparotto (1991), as atividades determinantes de doença são o crescimento, a infectividade, a agressividade, a virulência e outros atributos do patógeno ou processos que determinam a infecção, o desenvolvimento dos sintomas e a reprodução do patógeno. O CB visa a manutenção por meio de certas práticas, o equilíbrio do agrossistema, de forma que o hospedeiro em presença do patógeno não seja significativamente afetado, devido à ação antagônica dos biocontroladores. Além disso, os antagonistas podem induzir tão simplesmente a resistência da planta hospedeira ao ataque de patógenos (AGRIOS, 2005).

Para avaliação do antagonismo ao patógeno, são necessários testes *in vitro* e *in vivo*, a fim de determinar os mecanismos usados pelos agentes de biocontrole, bem como o efeito ecológico que resulta no controle da doença (LUMSDEN & LOCKE, 1989). Linhagens efetivas do agente controlador para determinados patógenos e ambientes específicos devem

ser selecionadas (HOWELL, 2003). Ferraz *et al.* (2001), citam que pesquisas foram realizadas com o objetivo de encontrar novos e alternativos métodos de controle para manejo de fitopatógenos objetivando explorar o potencial de seus inimigos naturais e futuramente utilizá-los em programas de controle biológico. O CB tem-se mostrado como uma alternativa sustentável para o manejo de nematoides, permitindo minimizar danos ambientais, quando comparado aos métodos químicos convencionais (COIMBRA & CAMPOS, 2005; VAZ *et al.*, 2011).

Dentre os inúmeros inimigos naturais já identificados como potenciais agentes de CB, destaca-se uma ampla gama de bactérias da rizosfera com efeito antagônico a fungos e nematoides (STURZ & NOWAK, 2000; TIAN *et al.*, 2007; MACHADO *et al.*, 2012). Estas bactérias possuem grande capacidade de sobrevivência na rizosfera, colonizando as raízes das plantas conferindo a elas, vários benefícios tais como: promoção de crescimento, disponibilização de nutrientes e hormônios vegetais, proteção contra patógenos, maior resistência a seca entre outras vantagens. Essas bactérias são também conhecidas como Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (RPCPs) (SCHROTH & HANCOCK, 1982; STIRLING, 1991; SIDDIQUI & MAHMOOD, 1999).

As RPCPs podem atuar como agentes de controle biológico principalmente pela produção de substâncias bactericidas, fungicidas ou micostáticas e nematicidas inibindo o crescimento e o desenvolvimento dos agentes patogênicos (LUZ, 1996), pela produção de antibióticos, toxinas e enzimas, interferindo no processo de reconhecimento planta-hospedeiro, induzindo resistência e/ou proporcionando o desenvolvimento saudável da planta (MANKAU, 1980; STIRLING, 1991; SIDDIQUI & MAHMOOD, 1999; TIAN *et al.*, 2007).

Chen *et al.* (1994) isolaram cento e setenta estirpes de bactérias de tecidos internos do algodão, sendo que destas 49 estirpes possuíam atividade de controle biológico contra *Rhizoctonia solani* em algodão e 25 estirpes induziram resistência sistêmica à *Colletotrichum*

*orbiculare* em pepino. Dessa forma, essas últimas foram utilizadas em ensaios para testar seu potencial de biocontrole contra murcha vascular do algodão (*F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*). As cepas foram introduzidas como endófitos em algodão 'Rowden'. Plântulas de algodoeiro foram tratadas com as bactérias 7 dias após o plantio, por perfuração das hastes com uma agulha fina. Dez dias após o tratamento, as plantas foram inoculadas por injeção da haste com microconídios do patógeno. Doze dias após a inoculação do patógeno, a expressão dos sintomas foi avaliada e seis espécies de bactérias (*Aureobacterium saperdae*, *Bacillus pumilus*, *Phyllobacterium rubiacearum*, *Pseudomonas putida*, *P. putida*, e *Ralstonia solanacearum*) reduziram a severidade da doença. Estudos de colonização revelaram que estas bactérias são capazes de sobreviver por até 28 dias na haste do algodoeiro. Cinco linhagens foram testadas para a capacidade de se mover dentro da haste e duas demonstraram movimento limitado, não superior a 5,0 cm, 14 dias após a aplicação do tratamento. Também foi observado aumento da população dessas bactérias três dias após sua introdução na haste da planta. Estes resultados indicam que bactérias endofíticas devem ser ainda avaliadas quanto à eficácia como agentes de CB de patógenos vasculares e que alguns endófitos podem sobreviver, multiplicar e apresentar movimento limitado nos vasos do algodoeiro.

Vários trabalhos relatam a ação nematicida de *Bacillus* (*B. thuringiensis*, *B. laterosporus*, *B. circulans*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. cereus*, *B. sphaericus* e *B. licheniformes*) no controle de diferentes nematoides (CARNEIRO *et al.*, 1998; JONATHAN *et al.*, 2000; KEMPSTER *et al.*, 2001; CHEN & DICKSON, 2004).

Em testes realizados *in vitro* e em casa de vegetação Zhang *et al.* (1996), testaram *Gliocladium virens* e *B. subtilis* no controle de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. Nesse experimento os autores observaram que sementes tratadas com estirpes *G. virens* e com *B. subtilis* promoveram uma redução na colonização das raízes pivotantes e secundárias de plântulas de algodoeiro por *Fusarium* spp. Em casa de vegetação, os mesmos tratamentos de

sementes suprimiram a incidência e severidade da fusariose do algodoeiro em solo infestado com *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e *M. incognita*. Gliotoxina, produzida por linhagens de *G. virens*, inibiu *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum in vitro*. Os tratamentos de sementes com *G. virens* e *B. subtilis* não afetaram a reprodução do nematoide das galhas, mas foi notado incremento de vigor e produtividade nas plantas tratadas com os antagonistas.

Mais de 60 antibióticos são sintetizados por *B. subtilis*, além de muitos polipeptídios (PHAE & SHODA, 1991). Esta bactéria também se caracteriza por produzir endotoxinas que interferem no ciclo reprodutivo dos nematoides, especialmente na oviposição e eclosão dos juvenis (SHARMA & GOMES, 1996). Melo & Valarini (1995) estudando 18 rizobactérias, isoladas da rizosfera de diferentes hospedeiros, realizaram testes *in vitro* e selecionaram três bactérias com efeito antagônico a *Fusarium solani*, agente causal da podridão radicular. Dois isolados de *B. subtilis* e dois de *Pseudomonas* sp., antagônicos a fungos patogênicos foram incluídos nos testes, os quais foram antagonistas a *F. solani*. Em testes realizados em casa de vegetação com as estirpes selecionadas, um dos isolados de *B. subtilis* controlou satisfatoriamente o patógeno nos ensaios realizados. A promoção do crescimento também foi observada nas plantas inoculadas com *B. subtilis* e *Pseudomonas* sp. quando comparadas à testemunha. Algumas toxinas são secretadas por *B. firmus* que prejudicam especialmente a formação da película externa das posturas dos nematoides formadores de galhas, inibindo a eclosão, além de atuarem sobre os juvenis (MACHADO *et al.*, 2012).

Villa *et al.* (2007), avaliando a eficiência de estirpes de *B. subtilis* no controle de *F. solani*, *F. sporotrichois* e *F. oxysporum*, patógenos da semente de cana-de-açúcar, concluíram que *B. subtilis* pode reduzir de 50 a 60% o desenvolvimento do micélio do fungo em comparação ao controle através da exposição do patógeno aos metabólitos produzidos pela bactéria. Com esse estudo os pesquisadores selecionaram três estirpes de *B. subtilis* com

efeito antagonista promissor ao desenvolvimento de novos bioprodutos que possam substituir agrotóxicos no tratamento de sementes da cana-de-açúcar.

Foi demonstrado por Araújo *et al.* (2002) que isolados de *B. subtilis* produzem metabólitos tóxicos que afetam o movimento de nematoides e também podem inibir a eclosão de juvenis e o processo de penetração nas raízes. A produção de proteases e a indução de enzimas de defesa na planta hospedeira são também mecanismos atribuídos a *B. subtilis* no controle de nematoides (LIAN *et al.*, 2007; KAVITHA *et al.*, 2007).

Testes realizados por Yuan *et al.* (2012) avaliaram a ação fungistática e inibidora de germinação de esporos, de compostos voláteis produzidos por *B. amyloliquefaciens* NJN-6 sobre *F. oxysporum* f. sp. *cubense*. De um total de 36 compostos voláteis detectados, onze inibiram completamente o crescimento micelial e a germinação de esporos do fungo, comprovando sua atividade antifúngica. Desse modo, os resultados do estudo sugerem que o mecanismo de controle produzido por essa bactéria pode desempenhar papéis importantes em curtas ou a longas distâncias na supressão de *F. oxysporum* f. sp. *cubense*.

Machado *et al.* (2012), estudando o efeito nematicida de *Bacillus* spp. chegaram a conclusão que estas bactérias atuam principalmente sobre nematoides formadores de galhas (*Meloidogyne* spp.) na cultura do tomate. Zhao *et al.* (2013) testaram o efeito fungistático de metabólitos não voláteis produzidos por estirpe de *B. amyloliquefaciens* sobre *F. oxysporum* f. sp. *spinaciae in vitro*, e isolaram, bem como, identificaram os lipopeptídeos presentes nesses metabólitos através da espectrometria de massa e posteriormente testaram seus efeitos sobre o patógeno. Esses testes revelaram que o lipopeptídeo 'fengycin' possui ação sobre a seletividade da membrana fúngica. Foram observadas ainda, mudanças morfológicas da estirpe de *F. oxysporum* f. sp. *spinaciae* e a germinação dos esporos foi inibida. O estudo sugere que fengycin produzido por *B. amyloliquefaciens* atua pelo menos como agente fungistático sobre o patógeno em estudo.

Em ensaios realizados em campo onde *B. subtilis* foi aplicado em cana-de-açúcar observou-se promoção de crescimento de plantas e redução do fator de reprodução do nematoide (*Meloidogyne* spp.) (CARDOZO & ARAÚJO, 2011).

Batista Jr. *et al.* (2002) selecionaram isolados de *B. thuringiensis*, quanto à capacidade de inibir *F. solani* f. sp. *phaseoli*, *F. solani* f. sp. *glycines*, *F. oxysporum* e *Colletotrichum* sp. Esses autores encontraram três isolados bacterianos capazes de inibir o desenvolvimento fúngico, sendo um deles capaz de inibir o crescimento dos quatro fungos avaliados. As outras duas bactérias em questão eram os isolados de *B. thuringiensis* que foram capazes de inibir o crescimento de três destes patógenos, indicando possuírem atividade antifúngica abrindo um novo campo de estudo para a utilização do *B. thuringiensis*.

Resultados semelhantes à aplicação de carbofurano foram observados quando isolados de *B. subtilis* foram aplicados no plantio da cana-de-açúcar. Tais isolados, além de controlar os nematoides (*M. incognita*, *M. javanica* e *Pratylenchus zae*), aumentaram a massa fresca da parte aérea da variedade de cana testada (MAZZUCHELLI & ARAÚJO, 2011). Testes em tomateiro mostraram incremento de biomassa da parte aérea e redução na reprodução de *Meloidogyne* quando as plantas foram tratadas com *B. subtilis* (ARAÚJO & MARCHESI, 2009). *B. subtilis* promoveu 100% de germinação de feijão (*Phaseolus vulgaris*) e reduziu o número de galhas provocadas por *M. javanica* (DAWAR *et al.*, 2008).

Zhao *et al.* (2013) avaliaram a eficiência de estirpes de *B. subtilis*, isolada da superfície de anteras e sementes de trigo, no controle de *Fusarium graminearum*, agente causal de uma devastadora doença do trigo e cevada. Para isso, foram realizados testes *in vitro* os quais propiciaram a identificação e seleção das melhores bactérias para estudos subsequentes. As estirpes de *B. subtilis* selecionadas foram testadas em campo e foi constatada redução na incidência da doença. Análises da superfície vegetal tratada mostraram também, que as aplicações com *B. subtilis* reduziram a colonização da superfície vegetal com

hifas do patógeno, devido à lise dessas hifas e subsequente extravasamento do conteúdo celular.

Fernandes *et al.* (2013) testando isolados de *Bacillus* spp. no controle de *M. javanica* em feijoeiro em casa de vegetação, não observaram incremento de massa fresca da parte aérea e raiz e tão pouco do número de galhas formadas pelos nematoides nas raízes das plantas, mas para um dos isolados foi verificada redução do fator de reprodução em quatro vezes quando comparado à testemunha. Redução de mais de 80% na população de J2 e ovos de *M. javanica* no solo foram relatadas por Fernandes *et al.* (2014), que utilizaram uma combinação de *B. subtilis* e *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) na microbiolização de sementes de tomate.

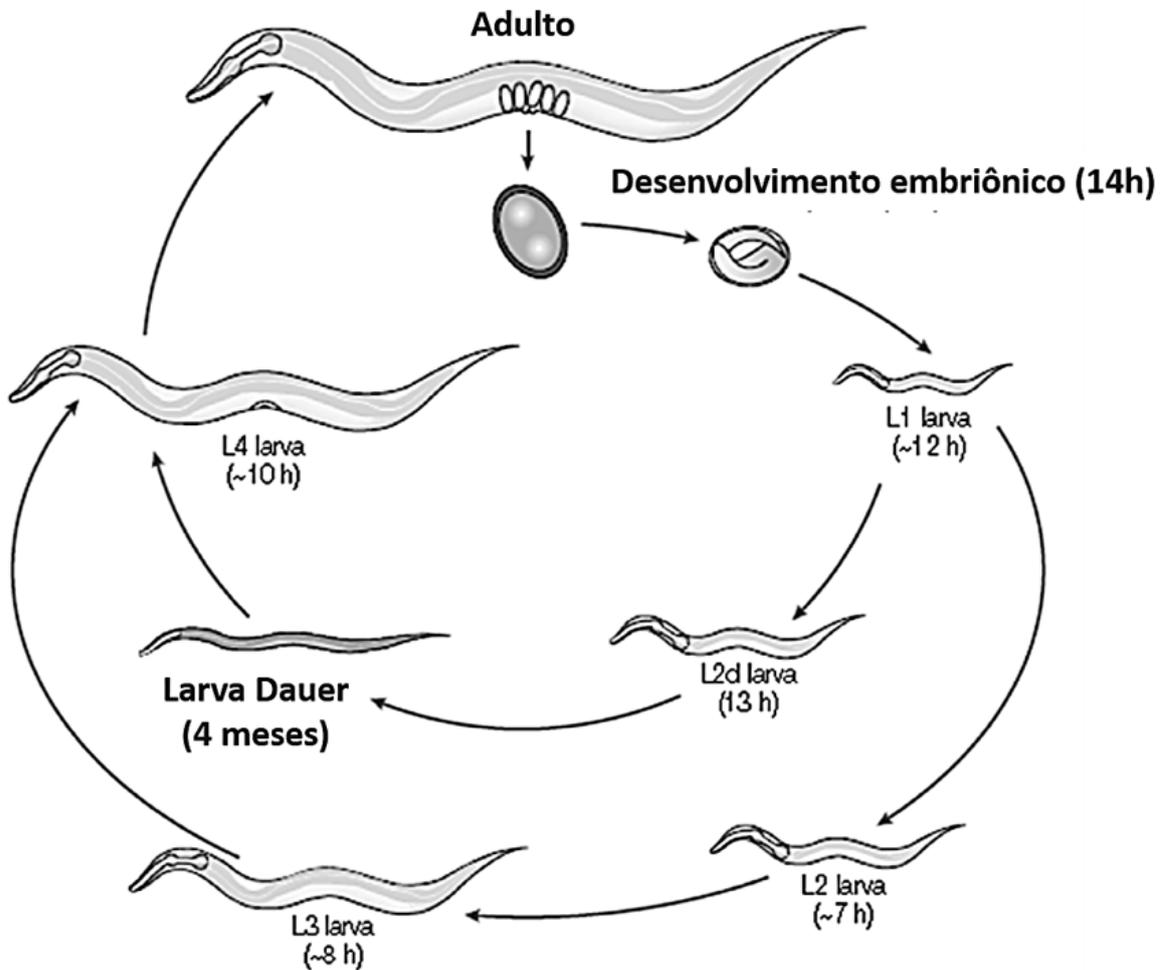
Levando em consideração tais informações, se conclui que algumas espécies de *Bacillus* possuem potencial para uso no controle de fungos e nematoides, por serem capazes de interferir no ciclo de vida, infecção e parasitismo destes patógenos. Além disso, algumas dessas bactérias promovem o desenvolvimento de plantas. Contudo, estudos mais aprofundados são necessários para elucidar os mecanismos envolvidos nessa interação.

### **O NEMATOIDE *Caenorhabditis elegans***

*Caenorhabditis elegans* é um nematoide de vida livre, habitante de solos úmidos, que usa oxigênio atmosférico e é bacteriófago. Foi introduzido como modelo experimental para estudo do desenvolvimento e neurobiologia de organismos multicelulares (BRENNER, 1974), e é utilizado como organismo teste para várias pesquisas (DONALD, 1997; SCHIERENBERG & WOOD, 1985).

O nematoide apresenta características ideais para o estudo do desenvolvimento; é hermafrodita e a reprodução é por autofertilização o que facilita a manutenção de mutações gênicas; possui ciclo de vida curto (~ 15 dias) (Figura 2) composto por quatro estádios juvenis e um adulto (BYERLY *et al.*, 1976); sob condições favoráveis (20° C), três dias após a

eclosão dos juvenis, o nematoide inicia a fase reprodutiva onde cada indivíduo gera cerca de 300 progênes. Além disso, apresenta um estágio de resistência ('dauer') que sobrevive sob condições ambientais desfavoráveis e a falta de alimento (WOOD, 1988). Isso permite que esses animais sejam mantidos em N líquido com 15% (v/v) de glicerol. Este armazenamento permite uma recuperação de 35 a 45% dos animais congelados mesmo após vários anos (BRENNER, 1974). Apresenta possibilidade de cultivo *in vitro* utilizando placas contendo ágar e *Escherichia coli* como alimento e possui ainda, tamanho pequeno o que facilita a manutenção de populações numerosas e análise sob microscópio eletrônico (ANKENY, 2001; RIDDLE *et al.*, 1997). Esse nematoide tem o corpo transparente o que permite a utilização de técnicas não invasivas de visualização de suas estruturas celulares e de transcritos marcados com proteínas fluorescentes, mesmo que expressos em uma única célula. O desenvolvimento celular é estereotipado e foi mapeado através da reconstrução de séries de microscopia eletrônica (WHITE *et al.*, 1982).



**FIGURA 2:** Ciclo de vida de *Caenorhabditis elegans*. Desenvolvimento em quatro estádios juvenis e uma forma de resistência (dauer larva) quando as condições de sobrevivência são desfavoráveis. O ciclo de vida dura cerca de 48 h a 22 °C ou 96 h a 15 °C. Os adultos vivem cerca de 15 dias e depositam até 350 ovos durante o ciclo. Fonte: Modificado de Jorgensen & Mango (2002).

Possui um genoma com cerca de 20 mil genes distribuídos em cinco pares de cromossomos autossômicos e um par de cromossomos sexuais no hermafrodita e apenas um cromossomo sexual no macho (HODGKIN, 2005). Esse nematoide foi o primeiro entre os organismos multicelulares a ter o genoma mapeado, conservando homologia de 60% a 80% com os mamíferos (THE *C. ELEGANS* SEQUENCING CONSORTIUM, 1998). A população é constituída de 99,9% de hermafroditas e 0,1% de machos gerados espontaneamente pela não disjunção dos cromossomos sexuais na meiose dos gametas. *C. elegans* é composto por 959

células no hermafrodita adulto e 1.031 no macho adulto que formam diferentes órgãos e tecidos. O sistema nervoso é o órgão mais complexo e compreende 302 neurônios e 56 células do tipo glia (BARGMANN, 1998; RIDDLE *et al.*, 1997). As características descritas, assim como os avanços no conhecimento da biologia dessa espécie, demonstraram alto grau de conectividade com outras áreas do conhecimento no mesmo organismo ou em mamíferos. Estes aspectos tornaram *C. elegans* um instrumento no aprofundamento do conhecimento de nematoides parasitas. A partir daí estudos antes inviáveis de serem realizados com nematoides parasitas devido a fatores éticos e práticos têm utilizado *C. elegans* como modelo (BRITTON & MURRAY, 2006). Este animal também pode ser usado como modelo em estudo de fitonematoides, uma vez que possui grande número de características comuns à maioria dos nematoides, como a divisão, reprodução, desenvolvimento de células e simplicidade de organização de tecidos. As informações genéticas, bioquímicas e anatômicas obtidas deste organismo podem ser aplicadas diretamente em outros nematoides (WARD, 1988). Testes *in vitro* possibilitaram a identificação de *B. thuringiensis* (CR-371) com efeito nematicida a *C. elegans* e estudos posteriores mostraram que esta estirpe também provocava redução nas galhas de *M. incognita* em tomateiro (ZUCKERMAN *et al.*, 1993).

## LITERATURA CITADA

- ABRAPA – Associação Brasileira dos Produtores de Algodão. Relatório de Gestão da Abrapa Bienio 2013 – 2014. Disponível na internet: [www.abrapa.com.br/Documents/relatorio\\_gestao-13-14.pdf](http://www.abrapa.com.br/Documents/relatorio_gestao-13-14.pdf). Acessado em: 12 jul 2015.
- AGRIOS, G.N. 2005. Plant pathology. 5<sup>th</sup> edition. Academic Press, New York.
- AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M. & BERGAMIN FILHO, A. 2011. Manual de Fitopatologia. Piracicaba: Agronômica Ceres. 1(4): 704 p.
- ANKENY, R.A. 2001. The natural history of *Caenorhabditis elegans* research. Nature Reviews Genetics, 2: 474-479.
- ARAÚJO, F.F. & MARCHESI, G.V.P. 2009. Uso de *Bacillus subtilis* no controle da meloidoginose e na promoção do crescimento do tomateiro. Ciência Rural, 39(5): 1558-1561.
- ARAÚJO, F.F.; SILVA, J.F.V. & ARAÚJO, A.S.F. 2002. Influência de *Bacillus subtilis* na eclosão, orientação e infecção de *Heterodera glycines* em soja. Ciência Rural, 32(2): 197-202.
- ARMSTRONG, G.M. & ARMSTRONG, J.K. 1978. A new race (race 6) of the cotton-wilt fusarium from Brazil. Plant Disease Reporter, 62(5): 421-423.
- ASSIGBETSE, K.B.; FERNANDEZ, D.; DUBOIS, M.P. & GEIGER, J.P. 1994. Differentiation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* races on cotton by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analyses. Phytopathology, 84(6): 622-626.
- ATKINSON, G.F. 1892. Some diseases of cotton.3. Frenching. Bull. Ala. Agric. Exp. Stn.41:19-29.
- BAAYEN, R.P.; O'DONNELL, K.; BONANTS, P.J.M.; CIGELNIK, E.; KROON, L.P.N.M.; ROEBROECK, E.J. A. & WAALWIJK, C. 2000. Gene genealogies and AFLP analyses in the *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and nonmonophyletic formae speciales causing wilt and rot disease. Phytopathology, 90(8): 891-900.

- BAKER, K.F. & COOK, R.J. 1974. Biological control of plant pathogens. W.F. Freeman, San Francisco.
- BARGMANN, C.L. 1998. Neurobiology of the *Caenorhabditis elegans* genome. *Science*, 282(5396): 2028-33.
- BATISTA JUNIOR, C.B.; ALBINO, U.B.; MARTINES, A.M.; SARIDAKIS, D.P.; MATSUMOTO, L.S.; AVANZI, M.A. & ANDRADE, G. 2002. Efeito fungistático de *Bacillus thuringiensis* e de outras bactérias sobre alguns fungos fitopatogênicos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 37(8): 1189-1194.
- BELTRÃO, N.E.M. & ARAÚJO, A.E. 2004. Algodão: o produtor pergunta, a Embrapa responde. Embrapa Informação Tecnológica. Brasília.
- BELTRÃO, N.E.M. 1999. O agronegócio do Algodão no Brasil. Embrapa CTT/EMBRAPA-CNPA. Brasília.
- BETTIOL, W. & GHINI, R. 1995. Controle Biológico. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos. Ceres. 3 ed. São Paulo. p. 717-727.
- BIBANCO, K.R.P.; NUNES, M.P.; CIA, E.; PIZZINATTO, M.A.; SCHUSTER, I. & MEHTA, Y.R. 2010. Identification of genetic variability among isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* of cotton. *Tropical Plant Pathology*, 35(4): 241-244.
- BORÉM, A. & FREIRE, E.C. 2014. Algodão do plantio à colheita. Ed, UFV. Viçosa.
- BRADBURY, J.F. 1986. Guide to plant pathogenic bacteria. CAB International. Aberystwyth.
- BRENNER, S. 1974. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 77(1): 71-94.
- BRITTON, C. & MURRAY, L. 2006. Using *Caenorhabditis elegans* for functional analysis of genes of parasitic nematodes. *International Journal for Parasitology*, 36: 651-659.

- BYERLY, L.; CASSADA, R.C. & RUSSELL, R.L. 1976. The life cycle of the nematode *Caenorhabditis elegans*: I. Wild-type growth and reproduction. *Developmental Biology*, 51(1): 23-33.
- CARDOZO, R.B. & ARAÚJO, F.F. 2011. Multiplicação de *Bacillus subtilis* em vinhaça e viabilidade no controle da meloidoginose, em cana-de-açúcar. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 15(12): 1283-1288.
- CARNEIRO, R.G.; SOUZA, I. & BELARMINO, L.C. 1998. Nematicidal activity of *Bacillus* spp. strains on juveniles of *Meloidogyne javanica*. *Nematologia Brasileira*, 22(1): 12-21.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; ALMEIDA, M.R.A. & CARNEIRO, R.G. 1996. Enzyme phenotypes of Brazilian isolates of *Meloidogyne* spp. *Fundamental and Applied Nematology*, 19: 555-560.
- CASTAGNONE-SERENO, P. 2006. Genetic variability and adaptive evolution in parthenogenetic root-knot nematodes. *Heredity*, 96: 282-289.
- CASTAGNONE-SERENO P.; DANCHIN E.G.; PERFUS-BARBEOCH L. & ABAD P. 2013. Diversity and evolution of root-knot nematodes, genus *Meloidogyne*: new insights from the genomic era. *Annual Review of Phytopathology* 51, 203-220. doi: .10.1146/annurev-phyto-082712-102300
- CHEN, C.; BAUSKE, E.M.; MUSSON, G.; RODRÍGUEZ-KÁBANA, R. & KLOEPPER, J.W. 1994. Biological Control of *Fusarium* wilt on Cotton by Use of Endophytic Bacteria. *Biological Control*, 5: 83-91.
- CHEN, Z.X. & DICKSON, D.W. 2004. 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*. Wallingford: CABI Publishing, Chap. 9: 1041-1062.
- CIA, E. & SALGADO, C.L. 2005. Doenças do algodoeiro (*Gossypium* spp.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. & RESENDE, J.A.M. (Ed). *Manual de Fitopatologia: doenças de plantas cultivadas*. São Paulo: Ceres. 2: 41-52.

- CIA, E. 1977. Ocorrência e conhecimento das doenças de algodoeiro annual *Gossypium hirsutum* L. no Brasil. *Summa Phytopatologica*, 3(3): 167-193.
- CIA, E.; FUZATTO, M.G; PIZZINATTO, M.A.; PETTINELLI JÚNIOR, A.; PAULO, E.M.; ZIMBACK, L.; SILVA, M.A.; BORTOLETTO, N & VASCONCELOS, A.S.A. 1999. Comportamento de novas cultivares e linhagens na presença de doenças que ocorrem na cotonicultura da região meridional do Brasil. In: II Congresso Brasileiro de Algodão, Ribeirão Preto. Anais. EMBRAPA/CNPA. p. 441-443.
- COIMBRA, J.L. & CAMPOS, V.P. 2005. Efeito de exsudatos de colônias e de filtrados de culturas de actinomicetos na eclosão, motilidade e mortalidade de juvenis do segundo estadio de *Meloidogyne javanica*. *Fitopatologia Brasileira*, 30(3): 232-238.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB. 2014. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. Acesso em: 15 jul. 2015.
- CURI, S.M. & BONA, A. 1972. Ocorrência do nematoide reniforme em culturas de algodão e maracujá no Estado de São Paulo. *O Biológico*, 38: 127-128.
- CURTIS, R.H.C.; ROBINSON, A.F. & PERRY, R.N. 2009. Hatch and host location. In: PERRY, R.N.; MOENS, M.; STARR, J.L. (Ed). *Root Knot Nematodes*. Wallingford, UK, CABI Publishing. p. 139-162.
- DAVIS, R.M.; COLYER, P.D.; ROTHROCK, C.S. & KOCHMAN, J.K. 2006. *Fusarium* wilt of cotton: diversity and implications for management. *Plant Disease*. 90(6): 692-703.
- DAWAR, S.; TARIQ, M. & ZAKI, M.J. 2008. Application of *Bacillus* species in control of *Meloidogyne javanica* (Treb) Chitwood on cowpea and mash bean. *Pakistan Journal of Botany*, 40(1): 439-444.
- DONALD, D.L. 1997. (Ed.). *C. elegans* II. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- EISENBACK, J.D. & TRIANTAPHYLLOU, H.H. 1991. Root-knot nematode: *Meloidogyne* spp. and races. In: NICKLE, W.R (Ed) *Manual of agricultural nematology*. Marcel Dekker, Inc, New York, 87-96.

- EISENBACK, J.D. 1983. Loss of resistance in tobacco cultivar 'NC95' by infection of *Meloidogyne arenaria* or *M. hapla*. *Journal of Nematology*, 15: 478.
- ESBENSHADE, P.R. & TRIANTAPHYLLOU, A.C. 1985. Use of enzyme phenotypes for identification of *Meloidogyne* species (Nematoda: Tylenchida). *Journal of Nematology*, 17: 6-20.
- FERNANDES, R.H.; LOPES, E.A.; VIEIRA, B.S. & BONTEMPO, A.F. 2013. Controle de *Meloidogyne javanica* na cultura do feijoeiro com isolados de *Bacillus* spp. *Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas*, 7(1): 76-81.
- FERNANDES, R.H.; VIEIRA, B.S.; FUGA, C.A.G. & LOPES, E.A. 2014. *Pochonia chlamydosporia* e *Bacillus subtilis* no controle de *Meloidogyne incognita* e *M. javanica* em mudas de tomateiro. *Bioscience Journal*, 30(1): 194-200.
- FERRAZ, L.C.C.B. 2001. As meloidogynoses da soja: passado, presente e futuro: In: FERRAZ, L.C.C.B.; ASMUS, G.L.; CARNEIRO, R.G.; MAZAFFERA, P. & SILVA, J.F.V. Reações parasito-hospedeiro nas meloidogynoses da soja. Embrapa. Londrina. 129 p.
- FERRAZ, S.; FREITAS, L.G.; LOPES, E.A. & DIAS-ARIEIRA, C.R. 2012. Manejo Sustentável de Fitonematoides. Ed. UFV. Viçosa.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). 2015. Statistics division. Disponível em: <http://faostat3.fao.org/compare/E>.
- FREIRE, E.F. 2007. Algodão no Cerrado do Brasil. Brasília: Associação Brasileira dos Produtores de Algodão. Gráfica e Editora Positiva. Brasília.
- FREITAS, L.G.; OLIVEIRA, R.A.L. & FERRAZ, S. 2009. Introdução à Nematologia. UFV. Viçosa.
- GORDON, T.R. & MARTYN, R.D. 1997. The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. *Annual Review of Phytopathology*. 35: 111-128.
- GOTO, M. 1990. Fundamentals of bacterial plant pathogens. Academic Press. San Diego.

- GOULART, A.M.C.; INOMOTO, M.M. & MONTEIRO, A.R. 1997. Hospedabilidade de oito cultivares de algodoeiro a *Pratylenchus brachyurus*. Nematologia Brasileira, 21: 111-118.
- GRIDI-PAPP. 1965. Botânica e genética. In: Cultura e adubação do algodoeiro. São Paulo: Instituto brasileiro de Potassa. 567 p.
- HILLOCKS, R.J. 1992. *Fusarium* wilt. In: HILLOCKS, R.J. (Ed.). Cotton diseases. Wallington: CAB International, Cap. 4, p. 127-160.
- HODGKIN, J. 2005. Karyotype, ploidy, and gene dosage. WormBook, 25: 1 – 9.
- HOWELL, C.R. 2003. Mechanisms Employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts, Plant Disease, 87(1): 4-10.
- HYER, A.H.; JORGENSON, E.C.; GARBER, R.H. & SMITH, S. 1974. Resistence to root-knot nematode in controlo f root-knot nematode-fusarium wilt disease complex in cotton. Crop Science, 19: 898-901.
- IAMAMOTO, M.M. 2005. Doenças foliares do algodoeiro. Funnep. 2ª Ed .. Jaboticabal.
- JONATHAN, E.I.; BARKER, K.R.; ABDEL-ALIM, F.F.; VRAIN, T.C. & DICKSON, D.W. 2000. Biological control of *Meloidogyne incognita* on tomato and banana with rhizobacteria, actinomycetes, and *Pasteuria penetrans*. Nematropica, 30(2): 231-240.
- JORGENSEN, E.M. & MANGO, S.E. 2002. The art and design of genetic screens: *Caenorhabditis elegans*. Nature Reviews Genetics, 3: 356-369.
- JUNQUEIRA, N.T.V & GASPAROTTO, L. 1991. Controle biológico de fungos estomáticos causadores de doenças foliares em seringueira. In: Controle biológico de doenças de plantas. BETTIOL, W. (Ed). Jaguariúna, CNPDA/Embrapa. p. 307-331.
- KATAN, T. & KATAN, J. 1988. Vegetative-compatibility grouping of *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* from tissue and the rhizosphere of cotton plants. Phytopathology, 78(6): 852-855.

- KAVITHA, J.; JONATHAN, E.I. & UMAMAHESWARI, R. 2007. Field application of *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* and *Trichoderma viride* for the control of *Meloidogyne incognita* in sugarbeet. *Journal of Biological Control*, 21(1): 211-215.
- KEMPSTER, V.N.; DAVIES, K.A. & SCOTT, E.S. 2001. Chemical and biological induction of resistance to the clover cyst nematode (*Heterodera trifolii*) in white clover (*Trifolium repens*). *Nematology*, 3: 35-43.
- KIM, D.H.; MARTYN, R.D. & MAGILL, C.W. 1993. Mitochondrial DNA (mtDNA) – Relatedness among *Formae speciales* of *Fusarium oxysporum* in the cucurbitaceae. *Phytopathology*, 83(1): 91-97.
- KRUG, H.P. 1936. *Fusarium* como causador da murcha do algodoeiro no Brasil. In: Reunião de Phytopatologistas do Brasil, 1., 1936, Rio de Janeiro. Annaes... Rio de Janeiro: Instituto de Biologia Vegetal. p. 319-321.
- LAWS, B. 2013. 50 plantas que mudaram o rumo da história. Rio de Janeiro: Sextante. 224 p.
- LEE, J.A. 1984. Cotton as a world crop. Chapter 1. In: KOHEL, R.J. 1984. Cotton. p. 1-25.
- LEE, J.A. 1987. Cotton breeding and genetics. In: FEER, W.R. (Ed). Principles of cultivar development. New York: Macmillan. 2: 126-160.
- LIAN L.H.; TIAN, B.Y.; XIONG, M.Z.; ZHU, M.Z.; XU, J. & ZHANG, K. Q. 2007. Proteases from *Bacillus*: A new insight into the mechanism of action for rhizobacterial suppression of nematode populations. *Letters in Applied Microbiology*, 45(3): 262-269.
- LIMA, L.H.C.; MARCO, J.L. DE & FELIX, C.R. 2000. Enzimas hidrolíticas envolvidas no controle biológico por microorganismos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed). Controle biológico. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, Cap. 8. p. 263-284.
- LORDELLO, L.G.E. 1981. Nematóides das plantas cultivadas. Nobel. São Paulo.
- LORI, G.; EDEL-HERMANN, V.; GAUTHERON, N. & ALABOUVETTE, C. 2004. Genetic diversity of pathogenic and nonpathogenic populations of *Fusarium oxysporum* isolated from carnation fields in Argentina. *Phytopathology*, 94(6): 661-668.

- LUMSDEN, R.D. & LOCKE, J.C. 1989. Biological control of damping-off caused by *Phytophthora ultimum* and *Rhizoctonia solani* in soilless mix. *Phytopathology*, 79: 361-66.
- LUNARDON, M.T. 2007. Análise da conjuntura agropecuária safra 2007/08 algodão. 2007. Secretaria da Agricultura e do Abastecimento. Disponível em: <<http://www.seab.pr.gov.br>>. Acesso em: 23 abril. 2015.
- LUZ, W.C. 1996. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas e bioproteção. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, 4: 1-49.
- MACHADO, V.; BERLITZ, D.L.; MATSUMURA, A.T.S.; SANTIN, R.C.M.; GUIMARÃES, A.; SILVA, M.E. & FIUZA, L.M. 2012. Bactérias como agentes de controle biológico de fitonematoides. *Oecologia Australis*, 16(2): 165-182.
- MANKAU, R. 1980. Biocontrol: fungi as nematode control agents. *Journal of Nematology*, 12(4): 244-252.
- MAZZUCHELLI, R.C.L. & ARAÚJO, F.F. 2011. Eficácia do controle de nematoides por *Bacillus subtilis* em duas variedades de cana-de-açúcar. *Colloquium Agrarie, Presidente Prudente*. 7: 51-58.
- MELO FILHO, G.A. & RICHETTI, A. 2003. Cadeia produtiva de algodão de Mato Grosso do Sul: Eficiência econômica e competitividade. EMBRAPA. Dourados.
- MELO, I.S. & VALARINI, P.J. 1995. Potencial de Rizobactérias no Controle de *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. em pepino (*Cucumis sativum* L.). *Scientia Agricola*, 52(2): 326-330.
- MOENS, M.; PERRY, R.N. & STARR, J.L. 2009. *Meloidogyne* species – a diverse group of novel and important plant parasites. In> R.N. PERRY, M. MOENS, & J.L. STARR (Ed.). *Root-knot nematodes*. CABI International. Wallingford. p. 1-17.
- MONTEIRO, A.R. & FERRAZ, L.C.C.B. 1987. Reação de quinze variedades de arroz a *Rotylenchulus reniformis*. *Nematologia Brasileira*, 11: 48-54.

- PAIVA, F.A.; ASMUS, G.L. & ARAÚJO, A.E. 2001. Doenças. In: Embrapa Agropecuária Oeste (Dourados, MS). Algodão: tecnologia de produção. Embrapa Agropecuária Oeste/Embrapa Algodão. Dourados. p. 245-267.
- PHAE, C. & SHODA, M. 1991. Investigation of optimal conditions for foam separation of iturin an antifungal peptide produced by *Bacillus subtilis*. Journal of Fermentation and Bioengineering, 71: 118-121.
- PUNJA, Z.K. & UTKHEDE, R.S. 2003. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. Trends in Biotechnology, 21: 400-407.
- RAKH R.R.; RAUT, L.S.; DALVI, S.M. & MANWAR, A.V. 2011. Biological control of *Sclerotium rolfsii*, causing stem rot of groundnut by *Pseudomonas cf. monteilii* 9. Recent Research in Science and Technology, 3(3): 26-34.
- RIDDLE, D.L.; BLUMENTHAL, T.; MEYER, B.J. & PRIESS, J.R. 1997. *C. elegans* II. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nova York.
- SCHIERENBERG, E. & WOOD, W.B. 1985. Control of cell-cycle timing in early embryos of *Caenorhabditis elegans*. Developmental Biology, 107(2): 337-354.
- SCHROTH, M.N. & HANCOCK, J.G. 1982. Disease suppressive soil and root colonizing bacteria. Science, 216(5453): 1376-1381.
- SHARMA, R.D. & GOMES, A.C. 1996. Effect of *Bacillus* spp. toxins on oviposition and juvenile hatching of *Heterodera glycines*. Nematologia Brasileira, 20(1): 53-62.
- SIDDIQUI, Z.A. & MAHMOOD, I. 1999. Role of bacteria in the management of plantparasitic nematodes: a review. Bioresource Technology, 69(2): 167-179.
- SMITH, S.N.; EBBELS, R.H.; GARBER, H. & KAPPELMAN-JR, J. 1981. *Fusarium* wild of cotton. In: NELSON, P.E.; TOUSSOUN, T.A.; COOK, R.F. (Ed). *Fusarium: disease, biology and taxonomy*. Pennsylvania: The Pennsylvania State University/University Park and London. p. 29-38.

- SOARES, P.L.M. & SANTOS, J.M. 2006. Utilização de fungos nematofágos no controle biológico de fitonematoides. In: BORTOLI, S.A.; BOIÇA JÚNIOR, A.L.; OLIVEIRA, J.E.M. Agentes de controle biológico: metodologia de criação, multiplicação e uso. Jaboticabal: FUNEP. p. 281-329.
- SOAVE, J. & MORAES, S.A. 1987. Medidas de controle das doenças transmitidas por sementes. Fundação Cargill. Campinas.
- STIRLING, G.R. 1991. Biological control of plant parasitic nematodes. CABI Publishing, Wallingford.
- STURZ, A.V. & NOWAK, J. 2000. Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops. *Applied Soil Ecology*, 15(2): 183-190.
- SUASSUNA, N.D. & COUTINHO, W.M. 2015. Manejo das principais doenças do algodoeiro no Cerrado brasileiro. In: FREIRE, E.F. 2015. Algodão no cerrado do Brasil. Brasília: Associação Brasileira dos Produtores de Algodão. Gráfica e Editora Positiva. Brasília.
- TAYLOR, A.L. & SASSER, J.N. 1978. Biology, Identification and Control of Root-Knot Nematodes (*Meloidogyne* species). North Carolina State University. Raleigh.
- TAYLOR, D.T. & SASSER, J.N. 1983. Biología, identificación y control de los nematodos de nódulo de la raíz (*Meloidogyne* species). North Carolina State University and USAID. Raleigh.
- THE *C. ELEGANS* SEQUENCING CONSORTIUM. 1998. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science*, 282: 2012-2018.
- TIAN, B.; YANG, J. & ZHANG, K.Q. 2007. Bacteria used in the biological control of plantparasitic nematodes: populations, mechanisms ofaction, and future prospects. *FEMS Microbiology Ecology*, 61(2): 197-213.

- VAZ, M.V.; CANEDO, E.J.; MACHADO, J.C.; VIEIRA, B.S. & LOPES, E.A. 2011. Controle biológico de *Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne incognita* com *Bacillus subtilis*. Perquirere, 1(8): 203-212.
- VEIGAS, A.P. 1935. A murcha do algodoeiro. Revista de Agricultura, 10(½): 49-51.
- VILLA, P.; ALFONSO, I.; RIVERO, M. J., & GONZÁLEZ, G. 2007. Evaluación de cepas de *Bacillus subtilis* bioantagonistas de hongos fitopatógenos del. Redalyc. XLI(1): 52-56.
- WARD, S. 1988. *Caenorhabditis elegans*: A model for parasitic nematodes In: The Biology of Parasitism, Alan R. Liss, Inc. p. 503-516.
- WHITE, J.G.; HORVITZ, H.R. & SULSTON, J.E. 1982. Neurone differentiation in cell lineage mutants of *Caenorhabditis elegans*. Nature, 297(5867): 584-587.
- WOOD, W.B. 1988. Introduction to *C. elegans* biology. In: WOOD, W.B. (Ed). The nematode *Caenorhabditis elegans*. New York: Cold Spring Harbor. p. 243-335.
- YUAN, J.; LI, B.; ZHANG, N.; WASEEM, R. & SHEN, Q. 2012. Production of bacillomycin- and macrolactin-type antibiotics by *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 for suppressing soilborne plant pathogens. J. Agric. Food Chem. 60: 2976-2981.
- ZAMBOLIM, L. 2010. Proteção de plantas: Manejo integrado de doenças de plantas.UFV. Viçosa.
- ZHANG, J.; HOWELL, C.R. & STARR, J.L. 1996. Suppression of *Fusarium* colonization of cotton roots and *Fusarium* wilt by seed treatments with *Gliocladium virens* and *Bacillus subtilis*. Biocontrol Sci. Technol., 6: 175-187.
- ZHAO, P.; QUAN, C.; WANG, Y.; WANG, J. & FAN, S. 2013. *Bacillus amyloliquefaciens* Q-426 as a potential biocontrol agent against *Fusarium oxysporum* f. sp. *spinaciae*. J. Basic Microbiol, 54(5): 448-456.
- ZUCKERMAN, B.M.; DICKLOW, M.B. & ACOSTA, N. 1993. A Strain of *Bacillus thuringiensis* for the Control of Plant-parasitic Nematodes. Biocontrol Science and Technology, 3(1): 41-46.

# CAPÍTULO 2

---

---

# UTILIZAÇÃO DE *Caenorhabditis elegans* COMO INDICADOR DE TOXICIDADE DE ESTIRPES DE *Bacillus thuringiensis* AO NEMATOIDE *Meloidogyne incognita* raças 3 e 4

## 1. RESUMO

O algodoeiro (*Gossypium hirsutum*) é acometido por várias doenças de importância econômica, dentre as quais a meloidoginose (*Meloidogyne incognita* raças 3 e 4). Entre os métodos de controle dessa doença, destacam-se as aplicações de nematicidas, a solarização, a aração profunda, a rotação de culturas e o uso de microrganismos antagonistas. Dentre as espécies do gênero *Bacillus*, existem estirpes que atuam como biorreguladores e antagonistas de vários fitopatógenos. Os testes para identificação dessas estirpes são prejudicados pela dificuldade de se obter grandes populações do patógeno e pelo tempo de execução dos testes *in vivo* que devem ser conduzidos por cerca de 90 dias. Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo comparar a toxicidade de estirpes de *B. thuringiensis* aos dois nematoides (verificando a possibilidade de empregar o *C. elegans* como indicador para a seleção de estirpes com potencial de biocontrole contra *M. incognita*). Para tanto, foi realizado um ensaio *in vitro* com oito estirpes de *B. thuringiensis* avaliando-se a atividade tóxica para *C. elegans* e para J2 de *M. incognita* em condições de laboratório e casa de vegetação. A maioria das estirpes tóxicas ao *C. elegans in vitro*, também foi tóxica ao *M. incognita*, sendo que 3 delas (S906, S1192, S2036) reduziram significativamente as populações dos dois nematoides. O efeito tóxico apresentado pelas estirpes de *B. thuringiensis* contra *C. elegans* foram similares aos apresentados pelos mesmos isolados contra *M. incognita in vivo*. Esses resultados sugerem que é plausível o uso do *C. elegans* como indicador de toxicidade para seleção de estirpes de *B. thuringiensis* tóxicas a *M. incognita*.

**Palavra-chave:** Biocontrole, fitonematoide, nematoide das galhas, rizobactérias.

# USE OF *Caenorhabditis elegans* AS A MODEL FOR THE DEVELOPMENT OF A METHOD FOR SELECTION OF *Bacillus* STRAINS TOXIC TO *Meloidogyne incognita* races 3 and 4

## 2. ABSTRACT

Cotton crop (*Gossypium hirsutum*) is affected by various diseases of economic importance, among them, the root galls caused by *Meloidogyne incognita* races 3 and 4 has such significance. Some methods of control of this disease are used, such as, the prevention of the entry of the pathogen in areas not yet infested, use resistant varieties, applications of nematicides, mainly by seed treatment, soil solarization, deep plowing, crop rotation with the addition of organic and inorganic wastes and use of micro-organisms antagonists. *Bacillus* are bioregulators and antagonists of several phytopathogens, but tests for identification of strains with biocontrol potential against parasitic nematodes are delayed by the difficulties of obtaining large populations of the pathogen in short time for installation of selection trials. Allied to this, the *in vivo* tests that must be performed are quite laborious and time-consuming, since the nematode-cycle lasts about 28 d and must be conducted carefully for about 90 d. Given this, the present work had as objective to evaluate the potential of *Caenorhabditis elegans* as a model organism for selection of strains of *Bacillus* spp. with biocontrol potential against *M. incognita*. For this, an *in vitro* assay was performed with eight strains of *B. thuringiensis*, evaluating the toxic activity for *C. elegans* and J2 of *M. incognita* under laboratory and greenhouse conditions. Most of the *Bacillus* that were toxic to *C. elegans in vitro*, were also toxic to *M. incognita*. Three *Bacillus* isolates (S966, S1192, S2036) significantly reduced the population of both nematodes *in vitro*. The effects of isolates of *Bacillus* against *C. elegans* were similar to those presented by the bacterial isolates on *M.*

*incognita in vivo*. These results suggest that it is plausible the use of *C. elegans* as a model in testing strains of *Bacillus* toxic to *M. incognita*.

**Keywords:** Biocontrol, plant nematode, root-knott nematode, rhizobacteria.



### 3. INTRODUÇÃO

O algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.), cultivado em mais de 60 países, ocupa uma área maior que 35 milhões de hectares e produzindo em torno de 25 milhões de toneladas de pluma ao ano e é uma das mais importantes *commodities* agrícolas no mundo (ABRAPA, 2015). Considerado um dos setores de maior importância econômica e social para o Brasil, a cotonicultura exige cada vez mais investimentos em tecnologias para que consiga responder a crescente demanda atual por algodão (FREIRE, 2015).

De acordo com Suassuna e Coutinho (2007), as condições edafo-climáticas das regiões produtoras, associadas aos sistemas de cultivo, muitas vezes envolvendo extensas de áreas e ao reduzido número de variedades cultivadas induzem o aparecimento de pragas e doenças. Nesse cenário, existem mais de 250 agentes patogênicos para cultura do algodão, mas a grande maioria é considerada praga secundária, por não causar danos econômicos (AMORIM *et al.*, 2011; IAMAMOTO, 2005; CIA & SALGADO, 2005; GOTO, 1990; BRADBURY, 1986). Em contraposição, a meloidoginose causada por *M. incognita* raças 3 e 4 tem assumido papel de destaque. Este nematoide pertence ao grupo dos endoparasitas sedentários. Após penetrar a raiz do hospedeiro o J2 se locomove através do córtex radicular chega ao cilindro vascular onde estabelece o sítio de alimentação, iniciando o processo de alimentação (MOENS *et al.*, 2009). No sítio de alimentação permanece nutrindo-se e passando por várias ecdises até a formação do adulto macho ou fêmea (EISENBACK & TRIANTAPHYLLOU, 1991; MOENS *et al.*, 2009). Tal característica lhe oferece vários benefícios, como a proteção contra intempéries e inimigos naturais, além de dificultar a adoção de métodos de controle eficientes. A alimentação rica disponível favorece a sua reprodução e uma única fêmea chega a produzir de 200 a 1.000 ovos (FREIRE, 2007). *Meloidogyne incognita* se destaca hoje como principal fitonematoide da cultura do algodão, acarretando em prejuízos que podem ultrapassar 40% em áreas com índices elevados de

infestação (FREIRE, 2015). Além do algodão, *M. incognita* é patogênico a uma ampla gama de hospedeiros, dificultando o uso de técnicas de manejo.

Dentre os métodos de controle mais utilizados, destacam-se a prevenção da entrada do patógeno em áreas ainda não infestadas, uso de variedades resistentes, aplicações de nematicidas no tratamento de sementes, solarização, aração profunda, rotação de culturas com incorporação de resíduos orgânicos e inorgânicos para melhoria das características físicas, químicas e biológicas do solo e uso de microrganismos antagonistas (FERRAZ *et al.*, 2012). Há ampla gama de bactérias rizosféricas com efeito antagônico a fungos e nematoides (STURZ & NOWAK, 2000; TIAN *et al.*, 2007; MACHADO *et al.*, 2012). Tais bactérias colonizam as raízes das plantas, podendo conferir a elas benefícios tais como: promoção de crescimento, disponibilização de nutrientes e hormônios vegetais, proteção contra patógenos e maior resistência a seca. Essas bactérias são também conhecidas como Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (RPCPs) (SCHROTH & HANCOCK 1982; STIRLING, 1991; SIDDIQUI & MAHMOOD, 1999).

As RPCPs podem atuar como agentes de controle biológico produzindo substâncias bactericidas, fungicidas ou micostáticas e nematicidas inibindo o crescimento e o desenvolvimento dos agentes patogênicos (LUZ, 1996), pela produção de antibióticos, toxinas e enzimas, interferindo no processo de reconhecimento planta-hospedeiro, induzindo resistência e/ou proporcionando o desenvolvimento saudável da planta (MANKAU, 1980; STIRLING, 1991; SIDDIQUI & MAHMOOD, 1999; TIAN *et al.*, 2007).

*Bacillus* são reconhecidamente bioreguladores e antagonistas naturais de vários fitopatógenos, além de promover o crescimento e induzir resistência em plantas (MAHDY *et al.*, 2001; VONDERWELL *et al.*, 2001; ONGENA & JACQUES, 2007; RUSSI, 2012). Essas bactérias são Gram-positivas, formadoras de esporos e algumas ainda possuem a capacidade de produzir cristais proteicos durante a sua fase de esporulação, cristais esses que podem ser

tóxicos a insetos das mais diversas ordens (BRAVO *et al.*, 2007; VAN FRANKENHUYZEN, 2009) e a nematoides, como é o caso das já descritas proteínas nematocidas Cry5B, Cry6A, Cry14A, Cry21A e Cry55A (WEI *et al.*, 2003; GUO *et al.*, 2008). Entretanto, há grande demanda por se identificar e selecionar estirpes bacterianas com elevada atividade de controle sobre *M. incognita* para viabilização do seu uso em programas de controle biológico. Os ensaios *in vitro* e *in vivo* com esse nematoide são prejudicados pelas dificuldades de se obter grandes populações em curto período de tempo.

Também, os testes *in vivo* que devem ser realizados para contraprova dos resultados obtidos nos *screenings* são bastante trabalhosos e demorados, pois o ciclo de *M. incognita* gira em torno de 28 dias e para ter segurança nas avaliações dos experimentos, estes devem ser conduzidos por aproximadamente 90 dias. Além disso, *M. incognita* não se alimenta fora da raiz da planta, dificultando o seu uso em ensaios *in vitro* de seleção. Assim, o uso de um organismo de mais fácil manejo seria justificável. Neste contexto, *Caenorhabditis elegans*, nematoide de vida livre, habitante de solos úmidos que usa oxigênio atmosférico e que se alimenta de bactérias, surge como uma alternativa plausível (BRENNER, 1974). Este nematoide é hoje utilizado como organismo modelo para os mais variados tipos de pesquisa (SCHIERENBERG & WOOD, 1985; DONALD, 1997). O presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de *Caenorhabditis elegans* como organismo indicador para seleção de estirpes de *Bacillus* spp., com potencial de biocontrole contra *M. incognita* raça 3 e 4.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. ESTIRPES DE *Bacillus thuringiensis***

As estirpes bacterianas utilizadas nestes ensaios foram S906, S1185, S1192, S2036, S2038, S2193, S2493 e S2496, pertencentes a Coleção de Bactérias de Invertebrados da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Essas bactérias foram cultivadas em erlenmeyer (500 mL) contendo 150 mL de meio Embrapa (MONNERAT *et al.*, 2007), em incubador rotativo a 150 RPM, a 28° C ( $\pm$  2° C) por 72 h. Ao final do cultivo a morfologia das estirpes foi analisada em Microscópio de contraste de fases para observação da presença do cristal protéico (MONNERAT *et al.*, 2001).

### **4.2. MANUTENÇÃO DA POPULAÇÃO DE *C. elegans***

A manutenção da colônia de *C. elegans* foi realizada de acordo com o protocolo de Stiernagle (2006) com modificações. Esse nematoide foi gentilmente cedido a Embrapa pelo Dr. Colin Berry da Universidade de Cardiff. A alimentação dos nematoides foi feita com a utilização da bactéria *E. coli*, estirpe OP50 multiplicada em agitador rotativo (150 RPM; 36°C; 12 h) em meio Luria-Bertani (LB) (SAMBROOK; FRITSH & MANIATIS, 1989). A cada dois dias 1 mL da suspensão bacteriana foi oferecida aos nematoides nas placas de cultivo. As colônias de *C. elegans* foram mantidas em incubadora (Marconi, mod. MA 403) na ausência de luz e a 21° C.

### **4.3. MANUTENÇÃO DA POPULAÇÃO DE *Meloidogyne incognita***

O inóculo inicial de *Meloidogyne incognita* raças 3 e 4 foi cedido pela Dra. Regina Carneiro do laboratório de fitonematoides da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Os nematoides foram multiplicados em tomateiro (*Solanum lycopersicum*, grupo Santa Cruz,

cv. Santa Clara) por 3 meses em casa de vegetação. Após esse período os ovos foram extraídos das plantas segundo método descrito por Hussey & Barker (1973), modificado por Boneti & Ferraz (1981). Após extração, os ovos passaram por um novo processo de limpeza para desinfecção superficial, desenvolvido a partir do descrito por Zuckerman & Brzeski (1966). Os ovos foram ressuspensos na solução de gluconato de clorexidina (0,12%) acrescido de antibióticos (10 µg/mL eritromicina; 2,5 g/L estreptomicina) por 30 min. Em seguida foram centrifugados (3 min, 360 G). Após esse processo, o sobrenadante foi descartado e os ovos presentes no pellet foram ressuspensos em água destilada esterilizada. O procedimento foi repetido 2 vezes. Em ambiente estéril os ovos foram colocados em funil de Baermann modificado (FLEGG, 1967) para eclosão e obtenção dos juvenis (J2). Os J2 foram coletados a cada 2 dias, em ambiente estéril, colocados em Becker (fechado com papel alumínio) e refrigerados ( $4^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$ ).

#### **4.4. SELEÇÃO DE ESTIRPES TÓXICAS A *C. elegans***

O bioensaio foi realizado em placas de Petri de Petri (90 X 15 mm) onde foram adicionados 7,5 mL da suspensão de *C. elegans* e 2,5 mL da suspensão bacteriana. Como testemunhas foram usados meio Embrapa puro, meio Embrapa acrescido de eritromicina, Furadan e solução salina 8,5%. As placas de Petri foram identificadas, datadas e suas bordas foram seladas com filme plástico, para evitar contaminações. O ensaio foi acondicionado em incubador no escuro a 21° C por 48 h. Após esse período, o número de nematoides foi avaliado. Para isso, 2 mL do conteúdo de cada placa foi coletado, diluído 30 vezes e com auxílio de câmara de Peters e microscópio óptico, foram realizadas as contagens dos indivíduos vivos na suspensão. Para cada placa foram realizadas três contagens e a média dessas contagens foi utilizada para análise nos testes estatísticos. O ensaio foi realizado em triplicata.

#### **4.5. SELEÇÃO DE ESTIRPES TÓXICAS A *M. incognita* raça 3 *in vitro***

A partir dos nematoides obtidos com o funil de Baermann, foi realizado o bioensaio, seguindo a mesma metodologia descrita para *C. elegans*.

#### **4.6. SELEÇÃO DE ESTIRPES TÓXICAS A *M. incognita* raça 3 *in vivo***

Este ensaio foi conduzido em casa de vegetação. Mudanças de tomate (*Solanum lycopersicum*, grupo Santa Cruz, cv. Santa Clara) produzidas em bandejas de isopor, uma semana após a emergência, foram transplantadas para vasos de 2 litros tendo como substrato o composto Bio-Plant e solo autoclavado em iguais proporções. Uma semana após o transplante, as mudas foram inoculadas com 5 mL da suspensão bacteriana (concentração de  $3 \times 10^7$  ufc/mL). Cinco dias após a primeira inoculação, foi realizada a inoculação dos nematoides. Para isso, uma suspensão contendo 10.000 ovos foi distribuída em três covas equidistantes, com aproximadamente 2 cm de profundidade. Imediatamente após a inoculação dos nematoides, as bactérias foram novamente inoculadas na mesma proporção do início do ensaio. As plantas foram mantidas em casa de vegetação por um período de três meses (22-28°C; URA de  $\pm 80\%$ ). As regas foram realizadas diariamente ao final da tarde e as adubações mensais utilizadas três gramas de NPK (04 – 14 – 08). Semanalmente foi realizado desbaste de folhas senescentes para evitar surgimento de pragas, as flores foram também retiradas para evitar a produção de frutos.

O ensaio foi avaliado após 3 meses. A parte aérea das plantas foi descartada e os vasos com o sistema radicular levados ao Laboratório de Nematologia onde foi realizada a extração dos ovos segundo método de Hussey & Barker (1973) modificado por Boneti & Ferraz, (1981). As suspensões de ovos foram homogêneas com o auxílio de pipeta de Pasteur e após a homogeneização 2 mL dessas suspensões foram transferidos para provetas (100 mL)

completando o volume para 60 mL com água. Três amostras de 1 mL de cada suspensão foi submetida a contagem em câmara de Peters e a média dessas serviu para o cálculo da concentração de ovos das amostras. Feito todo esse procedimento, calculou-se o fator de reprodução (OOSTENBRINK, 1966).

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado com quatro repetições por tratamento. Os dados obtidos a partir do cálculo de FR foram transformados em  $\sqrt{x}$ , para facilitar as análises estatísticas, submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Duncan ( $P \leq 0,05$ ) [Assistat versão 7.7 (SILVA & AZEVEDO, 2016)].

#### **4.7. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS ESTIRPES TÓXICAS**

As estirpes foram caracterizadas quanto a presença de genes *cry* de *B. thuringiensis*. O procedimento de extração de DNA das bactérias selecionadas para a realização da Reação em Cadeia da Polimerase foi feito segundo o descrito por BRAVO *et al.* (1998), na qual as bactérias foram cultivadas em meio EMBRAPA sólido (MONNERAT *et al.*, 2007) por 16h a temperatura de 28 a 30°C. Após este período, para cada amostra, o crescimento bacteriano da placa foi coletado com uma alça e transferido para um tubo de polietileno de 1,5 mL devidamente identificado e contendo 200 µL de água ultrapurificada estéril (Mili Q). As amostras foram então homogeneizadas em aparelho Vortex e congeladas a -80° C por 20 min e depois fervidas em banho-maria a 100° C por 10 min e, por fim, incubadas no gelo durante 2 min. O sobrenadante obtido foi utilizado para as reações. Diferentes oligonucleotídeos foram utilizados na reação de PCR, 5 µL do DNA de cada estirpe foram transferidos para um tubo de polietileno de 0,2 mL contendo 0,5 µM de cada oligonucleotídeo, 0,2 mM de dNTP, tampão de Taq 1X e 2,5 U de Taq DNA polimerase (5,0 U), totalizando um volume final de 30 µL. Foram utilizados oligonucleotídeos para a identificação dos seguintes genes: *cryI*,

*cry2, cry3, cry4, cry5, cry8, cry9, cry10, cry11, cry12, cry13, cry14, cry17, cry19, cry21, cry24, cry25, cry27, cry29, cry30, cry32, cry39, cry40, cyt1 e cyt2*. As condições de PCR foram realizadas para cada oligonucleotídeo segundo o descrito por CERON *et al.* (1994), CERON *et al.* (1995), BRAVO *et al.* (1998) e IBARRA *et al.* (2003). Para análise do resultado foram aplicados 25 µL do produto de PCR misturados a 5 µL de tampão de corrida 10X em gel de agarose a 1,5%. A corrida de eletroforese foi feita em tampão TBE 1X (Tris base; ácido bórico; EDTA 0,5 M – pH 8,0). Após a eletroforese, o gel foi corado com brometo de etídio a 1µg/mL por 20 min e descorado em água destilada por 15 min. O gel foi visualizado em transluminador sob luz UV e fotografado em foto-documentador (Eagle Eye, Stratagene).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### ENSAIO COM *C. elegans* in vitro e *M. ingognita* in vitro e in vivo

Das oito estirpes de *B. thuringiensis* utilizadas neste ensaio, seis mostraram-se tóxicas a *C. elegans*. As outras duas se igualaram a testemunha. A maior resposta foi a apresentada pela estirpe S906 com maior controle em relação à testemunha (solução salina), e redução de mais de 51% da população de nematoides, seguida da estirpe S2493 com um de controle de 41,8%. As demais estirpes causaram redução da população de nematoides variando de 14,7 a 25,6 % de controle.

A caracterização molecular das estirpes mostrou que 4 delas apresentaram genes *cry* conhecidos e 4 delas não apresentaram produtos de PCR esperados para a detecção de genes *cry*. Como todas apresentaram cristais proteicos quando observadas em microscopia de contraste de fases, é provável que outros genes estejam envolvidos na formação da proteína evidenciada pela presença dos cristais. A estirpe mais tóxica, a S906 foi uma das estirpes que apesar de apresentar cristal, não apresentou produtos esperados de PCR com os primers testados. Já a estirpe S2493, que ocasionou redução de 41,8% da população de nematoides, apresenta o gene *cry6*, que codifica a toxina Cry6 descrita como nematocida (BRAVO *et al.*, 2012; PALMA *et al.*, 2014) corroborando os resultados que obtivemos nesse ensaio. Silvera & Lengua (2015) testaram a atividade de Cry6 a nematoides gastrointestinais de ovelhas (*Nematodirus spathiger*), relatando controle de 44,7% e 45,6% sobre ovos e larvas, respectivamente. A estirpe S2038 apresentou o gene *cry11*, que codifica proteínas tóxicas a larvas de mosquitos (FERNÁNDEZ *et al.*, 2005), e que também foi recentemente relatado como tóxico a *Haemonchus contortus* (LARA *et al.*, 2016). As estirpes S2193 e S2496 não diferiram da testemunha, apresentaram genes *cry1*, *cry2* e *cry52* que codificam proteínas que não foram descritas como tóxicas a nematoides. As outras estirpes que apresentaram efeito

antagônico ao nematoide (S1192, S1185 e S2036), não apresentaram produtos de PCR para os genes testados, indicando que essas estirpes devem apresentar genes de toxinas diferentes dos conhecidos. O nematicida Carbofurano apresentou resultado estatisticamente superior aos demais tratamentos.

Os resultados dos testes *in vitro* com *M. incognita* (Tabela 1), mostraram todas as estirpes causaram alguma mortalidade, entre 4 e 41,1%, inferior ao obtido nos ensaios com *C. elegans*. Três estirpes, S2036, S1192 e S906, causaram mortalidade superior a testemunha, respectivamente de 41,1, 19,7 e 24,9%. Entretanto, como o cristal proteico é muito grande para ser ingerido pelo fitonematoide, impossibilitando sua ação tóxica, é possível que a toxicidade encontrada seja atribuída a outras substâncias produzidas, como enzimas, que podem estar agindo por contato com o nematoide (URWIN *et al.*, 1997).

No ensaio *in vivo*, em casa de vegetação, quatro estirpes (S2036, S1185, S1192 e S906) reduziram a população do nematoide, na faixa entre 17,81 a 46,79 %. Este fato foi evidenciado também pelo fator de reprodução (FR) que variou de 9,74 a 10,15 (Tabela 1).

As três estirpes tóxicas a *M. incognita in vitro*, foram tóxicas a *M. incognita in vivo* e a *C. elegans*. É importante destacar que os resultados obtidos no bioensaio com *M. incognita in vivo* foram mais semelhantes aos obtidos com *C. elegans* do que com *M. incognita in vitro*. Isso pode ser explicado pelo fato do *M. incognita in vitro* não se alimentar das toxinas Cry de *B. thuringiensis*. Em contraposição, trabalhos mostram que estirpes de *B. thuringiensis* podem colonizar plantas de forma sistêmica e facilitar a aquisição da toxina pelas pragas (MONNERAT *et al.*, 2009). De forma complementar, o *C. elegans*, por ser um nematoide de vida livre que se alimenta de bactérias, e por ter uma maior movimentação nas placas, tem aumentado o seu contato com as bactérias e proteínas dispersas no meio em que se encontra. Deviddas & Rehberger (1992) trabalharam com *M. incognita* e *C. elegans in vitro* também notaram maior sensibilidade do nematoide de vida livre aos compostos produzidos por *B.*

*thuringiensis* e atribuíram esse fato ao hábito alimentar do *C. elegans* o que o predispõe a um outro modo de ação das toxinas do Bt onde atuam em seu intestino e não apenas na epiderme.

Nos três ensaios pode-se observar que as estirpes tóxicas a *M. incognita* foram também tóxicas a *C. elegans* e que as que não foram tóxicas a *C. elegans* também não foram tóxicas a *M. incognita*. Algumas tóxicas a *C. elegans* não foram tóxicas a *M. incognita*. Por outro lado nenhuma estirpe que matou *M. incognita* tanto *in vivo* quanto *in vitro*, deixou de matar *C. elegans*.

Os resultados permitem inferir que *C. elegans* pode ser um indicador de toxicidade de estirpes de *B. thuringiensis* a nematoides e essa metodologia pode ser útil quando se deseja realizar um screening massal de coleções de *B. thuringiensis*.

**TABELA 1:** Número [transformados ( $\sqrt{x}$ )] de *Caenorhabditis elegans in vitro* e *Meloydogine incognita in vitro* e *in vivo* (NN), percentual de controle (PC) e genes presentes nas estirpes de *Bacillus thuringiensis*.

Tratamentos	Gene <i>cry</i>	Presença de cristal proteico	<i>C. elegans</i>		<i>M. incognita in vitro</i>		<i>M. incognita in vivo</i>	
			NN	redução %	NN	redução %	FR	redução %
Testemunha ME + eritromicina	-		81,9 a	----	13,7 ab	---	12,33 a*	0,0*
Testemunha ME	-		78,3 ab	----	14,3 a	---	----	---
Inóculo inicial	-		71,4 cd	----		---	---	---
Testemunha Solução salina	-		76,1 bc*	0,0*	13,5 ab*	0,0*	----	---
S2496	<i>cry52</i>	+	72,4 cd	9,5	12,8 ab	10,6	10,84 ab	22,69
S2193	<i>cry1Aa</i> , <i>cry1Ab</i> , <i>cry1Ad</i> , <i>cry1C</i> , <i>cry1D</i> , <i>cry1F</i> , <i>cry2Ab</i>	+	72,1 cd	10,2	13,1 ab	6,7	10,32 ab	30,02
S907	-	+	70,6 cd	13,6	12,8 ab	9,7	8,99 d	46,79
S2036	-	+	70,2 de	14,7	10,4 e	41,1	10,15 bc	32,21
S1185	-	+	68,1 de	19,5	13,3 ab	4,0	9,32 cd	44,82
S1192	-	+	67,3 de	21,6	12,1 cd	19,7	9,89 bc	35,64
S2038	<i>cry1I</i>	+	65,6 e	25,6	14,0 ab	0,0	11,14 ab	17,81
S2493	<i>cry6</i>	+	58,0 f	41,8	12,6 ab	13,8	10,88 ab	22,10
S906	-	+	53,2 f	51,1	11,7 de	24,9	9,74 bc	37,64
Carbofurano	-		42,7 g	68,7	0,0 f	100	Nr	nr

Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan ( $P \leq 0,05$ ). Os

dados originais foram transformados ( $\sqrt{x}$ ). \*Valor referência.

## 6. CONCLUSÕES

- Todas as estirpes que apresentaram ação de controle sobre o *M. incognita in vitro* também foram efetivas no controle do *C. elegans*;
- Nem todas as estirpes efetivas *in vitro* ao *C. elegans* apresentaram efeito sobre *M. incognita*;
- A maioria das estirpes que apresentaram atividade sobre o *M. incognita in vivo* reduzindo o seu fator de reprodução também surtiram efeito sobre o *C. elegans in vitro* mostrando ser este (*C. elegans*) um bom modelo para seleção de estirpes em testes preliminares para seleção de estirpes de *Bacillus* spp.

## 7. LITERATURA CITADA

- ABRAPA – Associação Brasileira dos Produtores de Algodão. Relatório de Gestão da Abrapa Bienio 2013 – 2014. Disponível na internet: [www.abrapa.com.br/Documents/relatorio\\_gestao-13-14.pdf](http://www.abrapa.com.br/Documents/relatorio_gestao-13-14.pdf). Acessado em: 12 jul 2015.
- AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M. & BERGAMIN FILHO, A. 2011. Manual de Fitopatologia. Piracicaba: Agronômica Ceres. 1(4): 704 p.
- BONETI, J.I.S. & FERRAZ, S. 1981. Modificação do método de Hussey e Barker para extração de ovos de *Meloidogyne incognita* de raízes de cafeeiros. Fitopatologia Brasileira, 6: 553.
- BRADBURY, J.F. 1986. Guide to plant pathogenic bacteria. CAB International. Aberystwyth.
- BRAVO, A.; SARABIA, S.; LOPEZ, L.; ABARCA, C.; ORTIZ, A.; ORTIZ, M.; LINA, L.; VILLALOBOS, F.J.; PEÑA, G.; NUÑEZ-VALDEZ, M.E.; SOBERÓN, M. & QUINTERO, R. 1998. Characterization of *cry* genes in a mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. Applied and environmental microbiology, 64: 4965-4972.
- BRAVO, A.; GILL, S.S. & SOBERON, M. 2007. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. Toxicon, 49: 423-435.
- BRAVO, A.; GÓMES, I.; PORTA, H.; GARCÍA-GÓMES, B.I.; RODRIGUEZ-ALMAZAN, C.; PARDO, L. & SOBERÓN, M. 2012. Evolution of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins insecticidal activity. Microbial Biotechnology, 6: 17-26.
- BRENNER, S. 1974. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. Genetics, 77(1): 71-94.
- CERON, J.; COVARRUBIAS, L.; QUINTERO, R.; ORTIZ, A.; ORTIZ, M.; ARANDA, E.; LINA, L. & BRAVO, A. 1994. PCR analysis of the *cryI* insecticidal crystal family

- genes from *Bacillus thuringiensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 60: 353-356.
- CERON, J.; ORTIZ, A.; QUINTERO, R.; GUERECA, L. & BRAVO, A. 1995. Specific PCR primers directed to identify cryI and cryIII genes within a *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 3826-3831.
- IBARRA, J.E.; RINCÓN, M.C. del; ORDÚZ, S.; NORIEGA, D.; BENNINTENE, G.; MONNERAT, R.; REGIS, L.; OLIVEIRA, C.M.F. de; LANZ, H.; RODRIGUEZ, M.H.; SÁNCHEZ, S.; PEÑA, G. & BRAVO, A. 2003. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Latin America with insecticidal activity against different mosquito species. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 5269-5274.
- CIA, E. & SALGADO, C.L. 2005. Doenças do algodoeiro (*Gossypium* spp.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. & RESENDE, J.A.M. (Ed). *Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas*. São Paulo, Editora Ceres, vol. 2: 41-52.
- DEVIDDAS, P. & REHBERGER, L.A. 1992. The effects of exotoxin (Thuringiensin) from *Bacillus thuringiensis* on *Meloidogyne incognita* and *Caenorhabditis elegans*. *Plant and Soil*, 145: 115-120.
- DONALD, D.L. 1997. *C. elegans* II. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- EISENBACK, J.D. & TRIANTAPHYLLOU, H.H. 1991. Root-knot nematode: *Meloidogyne* spp. and races. In: NICKLE, W.R (Ed.) *Manual of agricultural nematology*. Marcel Dekker, Inc., New York, USA. p. 191-192.
- FERNÁNDEZ, L.E.; PÉREZ, C.; SEGOVIA, L.; RODRÍGUEZ, M.H.; GILL, S.S.; BRAVO, A. & SOBERÓN M. 2005. Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* binds its receptor in *Aedes aegypti* mosquito larvae through loop  $\alpha$ -8 of domain II. *FEBS Lett.* 79: 3508-3514.

- FERRAZ, S.; FREITAS, L.G.; LOPES, E.A. & DIAS-ARIEIRA, C.R. 2012. Manejo Sustentável de Fitonematoides. Ed. UFV, Viçosa.
- FLEGG, J.J.M. 1967. Extraction of *Xithinema* and *Longidorus* species from soil by a modification of Cobb's decanting and sieving technique. *Annual Applied Biology*, 60: 429-437.
- FREIRE, E.F. 2007. Algodão no Cerrado do Brasil. Associação Brasileira dos Produtores de Algodão. Gráfica e Editora Positiva. Brasília.
- FREIRE, E.F. 2015. Algodão no Cerrado do Brasil. Associação Brasileira dos Produtores de Algodão. Gráfica e Editora Positiva. Brasília.
- GOTO, M. 1990. Fundamentals of bacterial plant pathogens. Academic Press. San Diego.
- GUO, S.X., LIU, M., PENG, D.H., JI, S.S., WANG, P.X., YU, Z.N. & SUN, M. 2008. New strategy for isolating novel nematicidal crystal protein genes from *Bacillus thuringiensis* strain YBT-518. *Applied and environmental microbiology*, 74: 6997-7001.
- HUSSEY, R.S. & BARKER, K.R. 1973. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne incognita* spp., including a new technique. *Plant Disease Reporter*, 57: 1025-1028.
- IAMAMOTO, M.M. 2005. Doenças Foliaves do Algodoeiro. Funnep. Ed 2°. Jaboticabal.
- LARA, A.P.S.S.; LORENZON, L.B.; VIANNA, A.M.; SANTOS, F.D.S.; PINTO, L.S.; BERNE, M.E.A. & LEITE, F.P.L. 2016. Larvicidal activity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* Cry11Aa toxin against *Haemonchus contortus*. *Parasitology*, 143(12): 1665-1671.
- LUZ, W.C. 1996. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas e bioproteção. Revisão Anual de Patologia de Plantas, 4: 1-49.

- MACHADO, V.; BERLITZ, D.L.; MATSUMURA, A.T.S.; SANTIN, R.C.M.; GUIMARÃES, A.; SILVA, M.E. & FIUZA, L.M. 2012. Bactérias como agentes de controle biológico de fitonematoides. *Oecologia Australis*, 16(2): 165-182.
- MAHDY, M.; HALLMANN, J. & SIKORA, R.A. 2001. Influence of plant species on the biological control activity of the antagonistic rhizobacterium *Rhizobium etli* strain G12 toward the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *Mededelingen Faculteit Landbouwwetenschappen Rijksuniversiteit Gent*, 66(2b): 655-662.
- MANKAU, R. 1980. Biocontrol: fungi as nematode control agents. *Journal of Nematology*, 12(4): 244-252.
- MOENS, M.; PERRY, R.N. & STARR, J.L. 2009. *Meloidogyne* species – a diverse group of novel and important plant parasites. In R.N. PERRY, M. MOENS, & J.L. STARR (Eds.), *Root-knot nematodes*. CABI International. Wallingford, pp.1-17..
- MONNERAT, R.G.; SILVA, S.F. & SILVA-WERNECK, J.O. 2001. Catálogo do banco de germoplasma de bactérias do gênero *Bacillus*. Brasília: Embrapa-Cenargen, 65p.
- MONNERAT, R.G.; BATISTA, A.C.; MEDEIROS, P.T.; MARTINS, E.; MELATTI, V.M.; PRAÇA, L.B.; DUMAS, V.; DEMO, C.; FALCÃO, R. & BERRY, C. 2007. Characterization of Brazilian *Bacillus thuringiensis* strains active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatalis*. *Biological Control*, 41: 291-295.
- MONNERAT, R.G.; SOARES, C.M.; GOMES, A.C.M.; JONES, G.; MARTINS, E.; PRAÇA, L. & BERRY, C. 2009. Translocation and insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* bacteria living inside of plants. *Microbial Biotechnology*, 2: 1560-1562.
- ONGENA, M. & JACQUES, P. 2007. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology*. 16(1): 115-125.

- OOSTENBRINK, M. 1966. Major characteristics of the relation between nematodes and plants. Mendelingen Landbouwhogeschool Wageningen, 66: 1-46.
- PALMA, L.; MUÑOZ, D.; BERRY, C.; MURILLO, J. & CABALLERO, P. 2014. *Bacillus thuringiensis* toxins: An overview of their biocidal activity. *Toxins*, 6: 3296-3325.
- RUSSI, J.D.C. 2012. Biocontrol studies of *Rotylenchulus reniformis* in cotton crops in Alabama. Thesis (PhD in Plant Pathology). Auburn University, Auburn, Alabama.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SCHIERENBERG, E. & WOOD, W.B. 1985. Control of cell-cycle timing in early embryos of *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology*. 107(2): 337-354.
- SCHROTH, M.N. & HANCOCK, J.G. 1982. Disease suppressive soil and root colonizing bacteria. *Science*, 216(5453): 1376-1381.
- SIDDIQUI, Z.A. & MAHMOOD, I. 1999. Role of bacteria in the management of plantparasitic nematodes: a review. *Bioresource Technology*, 69(2): 167-179.
- SILVA, F.A. & AZEVEDO, C.A.V. 2016. ASSISTAT. Software Assistência Estatística. Disponível em: <http://www.assistat.com/indexp.html> Acesso em: 12 março 2016.
- SILVERA, A.A.O. & LENGUA, F.R.M. 2015. Actividad letal *in vitro* del extracto proteico potal de *Bacillus thuringiensis* sobre huevos y larvas (L3) infectivas de *Nematodirus spathiger*. *Revistas de investigación UNMSM*, 26(3): 509-518.
- STIERNAGLE, T. 2006. Maintenance of *C. elegans*. *WormBook*. ed. The *C. elegans* Research Community, *WormBook*, 11 p. Disponível em: [http://www.wormbook.org/chapters/www\\_strainmaintain/strainmaintain.pdf](http://www.wormbook.org/chapters/www_strainmaintain/strainmaintain.pdf) Acesso em: 11 abril 2012.

- STIRLING, G.R. 1991. Biological control of plant parasitic nematodes. CABI Publishing, Wallingford.
- STURZ, A.V. & NOWAK, J. 2000. Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops. *Applied Soil Ecology*, 15(2): 183-190.
- SUASSUNA, N.D. & COUTINHO, W.M. 2007. Manejo das principais doenças do algodoeiro no cerrado brasileiro. In: FREIRE, E. C. (Ed.). *Algodão no cerrado do Brasil*, p. 479-521.
- TIAN, B.; YANG, J. & ZHANG, K.Q. 2007. Bacteria used in the biological control of plantparasitic nematodes: populations,mechanisms ofaction, and future prospects. *FEMS Microbiology Ecology*, New York. 61(2): 197-213.
- URWIN, P.E.; MOLLER, S.G.; LILLEY, C.J.; MCPHERSON, M.J. & ATKINSON, H.J. 1997. Continual green-fluorescent protein monitoring of cauliflower mosaic virus 35 S promoter activity in nematode-induced feeding cells in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 10: 394-400.
- VAN FRANKENHUYZEN, K. 2009. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *Journal of Invertebrate Pathology*, 101: 1-16.
- VONDERWELL, J.D.; ENEBAK, S.A. & SAMUELSON, L.J. 2001. Influence of two growth promoting rhizobacteria on loblolly pine root respiration and AIA activity. *Forest Science*, 47: 197-202.
- WEI, J.Z.; HALE, K.; CARTA, L.; PLATZER, E.; WONG, C.; FANG, S.C. & AROIAN, R.V. 2003. *Bacillus thuringiensis* crystal proteins that target nematodes. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 100: 2760-2765.
- ZUCKERMAN, B.M. & BRZESKI, M.W. 1966. Methods for the study of plant-parasitic nematodes in gnotobiotic root culture. *Nematologica*, 11: 453-466.

# CAPÍTULO 3

---

---

# MECANISMO DE AÇÃO E AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE PRODUTOS COM *Bacillus* NO CONTROLE DE *Meloidogyne incognita* raças 3 e 4 EM ALGODÃO EM CASA DE VEGETAÇÃO

## 1. RESUMO

A meloidoginose do algodoeiro causada por *Meloidogyne incognita* raças 3 e 4 é uma doença importante para o algodoeiro e pode causar prejuízos superiores a 40%. O objetivo desse trabalho foi testar a eficácia de produtos comerciais com *Bacillus* no controle de *M. incognita* raças 3 e 4 do algodoeiro em casa de vegetação. Além dos produtos biológicos foi utilizado Carbofurano e testemunha sem tratamento. Foram utilizadas plantas com e sem inoculação de nematoides. Após a aplicação dos produtos, as plantas foram avaliadas por 200 dias. Durante a condução do ensaio foram avaliados a altura das plantas, o peso de matéria fresca e seca da parte aérea, o peso de matéria fresca e seca da raiz e o fator de reprodução do nematoide. Houve melhor resposta inicial no crescimento das plantas tratadas com os agentes biológicos em comparação com as testemunhas tratadas com produto químico e sem tratamento. Os produtos com *Bacillus subtilis* (Rizos), *B. amyloliquefasciens* (NemaControl) e *B. subtilis* + *B. licheniformis* (Nemix) apresentaram melhores resultados em peso de matéria fresca de parte aérea quando comparados à testemunha. Em relação ao peso seco de parte aérea, os tratamentos com *B. methylotrophicus* (Onix) e *B. subtilis* foram superiores à testemunha, com destaque para o *B. methylotrophicus*. Na avaliação de peso fresco de raiz, apenas o tratamento com *B. methylotrophicus* proporcionou peso estatisticamente superior ao da testemunha. No quesito peso seco de raiz sem nematoide e fator de reprodução do nematoide, o tratamento com o *B. methylotrophicus* novamente se destacou dos demais tratamentos. A realização deste primeiro ensaio permitiu a seleção do produto Onix para condução dos ensaios subsequentes, a fim de entender o mecanismo de ação da bactéria no controle do nematoide. Para essa

avaliação foram adotados métodos que possibilitassem a visualização do fitopatógeno dentro da raiz, permitindo o acompanhamento da penetração dos nematoides na raiz e o seu desenvolvimento até o início da reprodução. Com o método de coloração com fucsina ácida foi possível verificar que houve uma redução na penetração do J2 nos primeiros dias para as plantas tratadas com a bactéria, mas essa diferença foi perdida no decorrer dos dias. Com a adoção do método de coloração com azul de toluidina foi possível observar, a partir da visualização das imagens, anormalidades nas células gigantes com formação de vacúolos, parede celular mais fina e fêmeas apresentando grandes vacúolos em seu interior. Assim há evidências que a utilização de produtos biológicos pode ser efetiva no controle de *M. incognita*, tornando-se mais uma ferramenta a ser utilizada no manejo desse importante patógeno da cultura do algodão.

**Palavra-chave:** Controle biológico, galha das raízes, meloidoginose, rizobactérias,.

# MECHANISM OF ACTION AND EVALUATION OF EFFICIENCY OF PRODUCTS WITH *Bacillus* TO CONTROL *Meloidogyne incognita* races 3 and 4 ON COTTON UNDER GREENHOUSE

## 2. ABSTRACT

The root-knot nematode (*Meloidogyne incognita* races 3 and 4) of cotton, is an important pathogen of cotton crop that can cause damage higher than 40%. The objective of this study was to test the efficiency of commercial products with *Bacillus* to control *M. incognita* races 3 and 4 of cotton under greenhouse. In addition to biological products, a treatment with Carbofuran and an untreated control were included. After the application of the products, the plants were evaluated for 200 days. During the assay were evaluated plant height, fresh and dry shoot weight, fresh and dry root weight and the nematode reproduction factor. There was a positive response during initial growth of plants treated with biological agents in comparison with the control plants treated with and without chemical product. The products with *B. subtilis* (Rizos), *B. amyloliquefasciens* (NemaControl) and *B. subtilis* + *B. lincheniformis* (Nemix) showed better results for fresh shoot weigh when compared to the control plants with nematode. With respect to dry shoot weight, the treatments with active ingredients of *B. methylotrophicus* (Onix) and *B. subtilis* it was higher than in control, especially when treated with *B. methylotrophicus*. As for fresh root weight, only the treatment with *B. methylotrophicus* provided weight statistically higher compared to the control. As far dry root weight is concerned, in plants without nematode, the treatment with *B. methylotrophicus* was better than the others treatments again. Same trend was observed for nematode reproduction factor. The first assay allowed us to select Onix to conduct the subsequent tests to understand the mechanism of action of the bacteria to control nematodes. For this evaluation it was adopted a method that enabled to visualize the pathogen inside the

root, allowing monitoring nematode penetration in the roots and its development until beginning of reproduction. With the method of staining with acid fuchsin it was possible to verify that penetration of J2 decreased in early days after inoculation in plants treated with bacteria, but this difference has been lost over the course of days. Through adoption of a method of toluidine blue was noticeable abnormalities on the giant cells with vacuoles and thinner cell wall, and females presenting large vacuoles inside. Therefore, there is evidence that the use of biological products can be effective to control *M. incognita*, becoming a tool to be used in the management of this important pathogen of cotton crop.

**Key words:** Biological control, root-knot nematode, rhizobacteria, root-gall.

### 3. INTRODUÇÃO

O algodoeiro é uma das espécies vegetais mais cultivadas no mundo ocupando cerca de 35 milhões de hectares. O Brasil, ocupando o quinto lugar entre os produtores mundiais e terceiro maior em exportação (ABRAPA, 2015; FAO, 2015). Segundo a CONAB (2016), na safra 2014/15 a região Centro-Oeste foi considerada a principal produtora nacional, gerando mais que o dobro do volume produzido na segunda maior região produtora que é a Nordeste. O maior volume da produção da região Centro-Oeste é proveniente do Mato Grosso. Na região Nordeste, o estado da Bahia é o que produz o maior montante. O setor movimenta grande capital financeiro, empregando muitas pessoas e gerando divisas para o País (ABRAPA, 2015). Este nicho do agronegócio só não é mais rentável, devido à existência de alguns fatores que limitam a produtividade da cultura.

Neste contexto, as doenças são de importância crucial, pois, em condições favoráveis ao seu desenvolvimento podem causar grandes prejuízos financeiros ao agricultor. Entre elas destaca-se a meloidoginose do algodoeiro, que tem como agente causal o *Meloidogyne incognita* raças 3 e 4. Esses nematoides são muito destrutivos para a cultura do algodão e podem em condições de alta infestação causar prejuízos superiores a 40% (ASMUS *et al.*, 2015). Os juvenis de segundo estágio (J2) são a forma infectiva do patógeno que penetram nas raízes do algodoeiro causando pequenas galhas com conseqüente atrofia geral das plantas. Um dos sintomas mais comuns causados por este patógeno na parte aérea é o surgimento da folha “carijó” caracterizada por uma clorose internerval nas folhas (SILVA *et al.*, 1997). Além dos danos causados por este patógeno isoladamente, ele pode interagir com o fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* causando o complexo Fusnem que em conjunto provoca danos ainda mais severos às plantas (JEFFERS & ROBERTS, 1993).

Para esta espécie de nematoide existem quatro raças fisiológicas descritas na literatura, mas apenas as raças 3 e 4 são parasitas do algodoeiro (SUASSUNA *et al.*, 2006). No Brasil a

raça 3 de *M. incognita* é a mais importante para a cultura (LORDELLO *et al.*, 1984; CARNEIRO *et al.*, 1990). Vários métodos são recomendados para o seu controle incluindo: exclusão, com a prevenção da entrada do patógeno em áreas onde este ainda não está presente; o uso de variedades resistentes; aplicações de nematicidas sintéticos, principalmente via tratamento de sementes; solarização; aração profunda com exposição do patógeno à ação dos raios UV; pousio; rotação de culturas com incorporação de resíduos orgânicos e inorgânicos; uso de microrganismos antagonistas, entre outros (BELTRÃO, 1999; CIA *et al.*, 1999). A agricultura atual está fundamentada basicamente no uso de agrotóxicos que, de um modo geral, são bastante eficientes e que na maioria das vezes é a única medida disponível de controle economicamente viável para garantir altas produtividades aos agricultores (KIMATI, 2011). Entretanto, a recomendação desses produtos para o controle de nematoides é limitada devido aos riscos de contaminação ambiental em virtude do tratamento de sementes e da classificação toxicológica (extremamente tóxicos) dos produtos usados que podem causar, efeitos adversos e catastróficos a saúde humana e do meio ambiente (RUANO *et al.*, 1997).

Neste sentido, a busca de medidas de controle menos agressivas, como o controle biológico despontam como excelentes alternativas para dirimir tais danos. Assim, bactérias do gênero *Bacillus* reconhecidamente bioreguladoras e antagonistas naturais de vários fitopatógenos (PETRAS & CASIDA, 1985) podem ser uma excelente alternativa. Atualmente, existem disponíveis no mercado um grande número de produtos a base dessas bactérias com recomendação no controle de inúmeras pragas e doenças e, dentre elas, as ocasionadas por fitonematoides. Entretanto, o efeito nematicida desses produtos tem sido bastante questionado pelos agricultores e estudos nessa área a fim de entender a interação entre estes organismos torna-se justificada. Portanto, o objetivo deste trabalho foi testar a eficiência de alguns produtos comerciais à base de *Bacillus* no controle de *M. incognita* na cultura do algodão, assim como os mecanismos de ação envolvidos nesse processo.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. PRODUÇÃO DO INÓCULO DE *Meloidogyne incognita*

A produção do inóculo inicial de *M. incognita* raças 3 e 4 foi realizada em tomateiros utilizando-se o mesmo método descrito no no capítulo 2 ítem 4.3.

### 4.2. PRODUTOS COMERCIAIS

Cinco produtos comerciais indicados para o controle de fitonematoides foram selecionados para realização do experimento (Tabela 1). As doses utilizadas foram as mesmas recomendadas pelos fabricantes.

**TABELA 1:** Produtos utilizados no experimento com seus respectivos princípios ativos e dosagens recomendadas pelos fabricantes.

Produto	Fabricante	Princípio ativo	UFC/mL	Dose
Onix	Farropilha	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	$1 \times 10^9$	1 mL / kg de semente
Rizos	Farropilha	<i>Bacillus subtilis</i>	$3 \times 10^9$	2 mL / kg de semente
NemaControl	Simbiose	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	$5 \times 10^9$	3 mL / kg de semente
Nemix	FMC	<i>B. subtilis</i> + <i>B. licheniformis</i>	$3,2 \times 10^{10}$	200 mL / ha
Furadan 350 SC	FMC	Carbofuran	---	5 L / ha

### 4.3. ENSAIO EM CASA DE VEGETAÇÃO

Para o ensaio realizado em casa de vegetação, sementes de algodão da variedade BRS 286 foram previamente tratadas com os produtos comerciais testados (Tabela 1), seguindo as recomendações sugeridas pelos fabricantes. Após o tratamento, as sementes foram plantadas

em vasos, de dois litros, de volume, preenchidos com uma mistura de solo autoclavado e substrato (Bio-Plant) na proporção de 1:1 (v/v). Foram usadas três sementes por vaso e 12 vasos por tratamento. Após a germinação foi realizado um desbaste mantendo-se apenas uma planta por vaso. Vinte dias após a germinação das plantas, foi realizada a inoculação da suspensão de ovos de *M. incognita* raças 3 e 4. Seis vasos de cada tratamento foram inoculados com aproximadamente 12 mil ovos/vaso.

As plantas foram conduzidas em casa de vegetação (22-38° C; UR ~ 80%) por 200 dias. As regas foram realizadas diariamente ao final da tarde e adubações mensais foram realizadas utilizando 3 g/planta de NPK (04 – 14 – 08). Durante o período de condução do ensaio houve a ocorrência de ácaro branco (*Polyphagotarsonemus latus* (Banks, 1904)) e rajado (*Tetranychus urticae* Kock) e para seu controle foram utilizados alternadamente os produtos: Abamectina (Abamectin Nortox), na dose de 300 mL/100 L água e o inseticida-acaricida Milbemectina (Milbeknok) na dose de 240 mL/100 L água. No total foram realizadas três aplicações de cada produto em alternância. Para o controle da infestação com mosca-branca (*Bemisia tabaci* (Gennadius, 1889)) foi aplicado Piriproxifem + Xileno (Tiger) na dose de 250 mL/100 L água, contra pulgão (*Aphis gossypii* Glover, 1877) aplicou-se Acetamiprid (Mospilan - 50 g/100 L água) e para o controle de ramulária (*Ramularia areola*) foi utilizado o fungicida Trifloxistrobina + Tebuconazol (Nativo - 300 mL/100 L água) em três aplicações semanais. Os tratos culturais, que incluíram a: retirada de folhas senescentes e flores também foram realizados a fim de evitar a ocorrência de outros patógenos e ampliar a condução do experimento, devido a não produção de frutos. Também foram realizadas mensalmente, medições da altura das plantas para acompanhamento do seu desenvolvimento.

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado com dez tratamentos, duas testemunhas e seis repetições por tratamento. A unidade experimental foi composta por um vaso contendo uma planta. Os dados obtidos em cada avaliação foram

submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa de estatística Assistat versão 7.7 (SILVA & AZEVEDO, 2016).

### **4.3.1. AVALIAÇÕES**

#### **4.3.1.1. ALTURA DAS PLANTAS**

O acompanhamento do crescimento das plantas inoculadas e não inoculadas com nematoides foi realizado mensalmente com auxílio de fita métrica. As medições foram realizadas em todas as plantas partindo da base (rente ao solo) até o ponteiro.

#### **4.3.1.2. MASSA FRESCA DA PARTE AÉREA**

Essa variável foi mensurada após 200 dias de condução do experimento (término do ensaio). Para tal, a parte aérea das plantas inoculadas e não inoculadas com nematoides foram, com auxílio de tesoura de poda, destacadas, acondicionadas em sacolas plásticas previamente identificadas e imediatamente levadas ao laboratório para pesagem em balança Semi Analítica Marte série AD.

#### **4.3.1.3. MASSA SECA DA PARTE AÉREA**

Após a pesagem da matéria fresca, a parte aérea dos diferentes tratamentos foi acondicionada em sacos de papel previamente identificados e levados para estufa a  $60 \pm 2^\circ\text{C}$  por um período de três dias. Após esse período de secagem, o material foi retirado da estufa e destinado à pesagem.

#### **4.3.1.4. MASSA FRESCA DAS RAÍZES**

Essa variável foi mensurada após o encerramento do ensaio. As raízes das plantas inoculadas e não inoculadas com nematoides foram cuidadosamente lavadas em água corrente, para retirada de solo e impurezas, enxugadas com papel toalha para eliminação do excesso de umidade e posteriormente pesadas em balança Semi Analítica Marte série AD.

#### **4.3.1.5. MASSA SECA DAS RAÍZES**

Com o objetivo de se obter o peso da matéria seca das raízes não inoculadas com nematoides, estas, após a pesagem da matéria fresca, foram acondicionadas em sacos de papel previamente identificados, e levados para estufa regulada para temperatura de  $60 \pm 2^\circ\text{C}$  por período de três dias. Após esse período de secagem, o material foi retirado da estufa e pesado normalmente.

#### **4.3.1.6. FATOR DE REPRODUÇÃO**

Para cálculo do fator de reprodução, os sistemas radiculares das plantas inoculadas com nematoide foram levados ao Laboratório de Nematologia da EMBRAPA – CENARGEN, onde, após pesagem da massa fresca foi feita a extração de ovos segundo método de Hussey & Barker (1973) com NaOCl (1%) modificado por Boneti & Ferraz, (1981). As raízes dos algodoeiros foram identificadas e lavadas com água corrente, cortadas em fragmentos de aproximadamente 2 cm, colocadas em liquidificador com NaOCl (1%) e trituradas por 40 segundos em alta rotação. Após esse processo, a suspensão foi passada em peneiras sobrepostas de 0,840, 0,150 e 0,025 mm para eliminação de fragmentos maiores de raiz.

O material (ovos e eventuais J2 mais resíduos de raízes) coletado na peneira de 0,025 mm foi lavado em água corrente para eliminação do excesso de hipoclorito. Após lavagem foi preparada uma suspensão de volume conhecido (150 mL) com esse material que foi posteriormente transferido para recipientes de vidro com tampa e armazenados sob refrigeração ( $4^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) até o momento de realização das contagens. Para isso, a suspensão de ovos a ser determinada, foi homogeneizada com o auxílio de uma pipeta de Pasteur e após a homogeneização dois mililitros dessa suspensão foram transferidos para proveta de 100 mL e completado seu volume para 60 mL com adição de água de torneira. Após a diluição na proporção de 1:30 essa suspensão foi transferida para um bequer de 200 mL de capacidade onde foi realizada uma nova homogeneização para contagem em câmara de Peters. Essa contagem foi realizada três vezes e a média dessas contagens serviu como base para o cálculo da concentração de ovos da amostra. Feito todo esse procedimento, calculou-se o fator de reprodução conforme descrito no capítulo anterior.

Os dados obtidos a partir de todos os ensaios realizados nessa etapa, foram submetidos à ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey a  $P \leq 0,01$ , utilizando-se o programa Assistat versão 7.7 (SILVA & AZEVEDO, 2016).

#### **4.4. HISTOPATOLOGIA COMPARADA ENTRE PLANTA COM E SEM BACTÉRIA**

Considerando os resultados do ensaio anterior, foi escolhido o produto ‘Onix’ com ação de controle sobre *M. incognita* em casa de vegetação para realização dessa etapa. O produto foi testado em uma variedade suscetível de algodão (Fibermax 966) suscetível a *M. incognita* e comparado com a testemunha não tratada. Para isso, as sementes, da variedade de algodão escolhida, foram microbiolizadas (recomendação do fabricante) com o produto

selecionado. Após esse procedimento, três sementes foram plantadas por vaso de isopor de 750 mL de capacidade, preenchidos com areia lavada e autoclavada. Após a germinação foi realizado um desbaste mantendo-se apenas uma planta por vaso. Vinte dias após a germinação das sementes, foi realizada a inoculação dos nematoides, sendo inoculados aproximadamente 5.000 juvenis J2 de *M. incognita* por planta, obtidos via funil de Baerman (descritos no capítulo 2, ítem 4.3.).

O ensaio foi conduzido por 45 dias após a inoculação dos nematoides (DAIN). Durante o período de condução, foram realizadas regas (água) a cada dois dias e as adubações foram realizadas quinzenalmente com NPK líquido (08 – 08 - 08) diluído em água (10 mL/L) sendo aplicados 30 mL dessa solução no substrato. Em dois momentos, durante a condução das plantas, houve a ocorrência do ácaro branco (*Polyphagotarsonemus latus*) e rajado (*Tetranychus urticae*) e seu controle foi realizado aplicando-se o inseticida-acaricida Milbemectina (Milbeknok - 240 mL/100 L água). As avaliações foram realizadas aos 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 18, 22, 28, 35, 40 e 45 DAIN, retirando-se quatro plantas tratadas com o produto biológico e outras quatro não tratadas, em cada um desses intervalos, até o 15º dia. A partir desse momento só foram retiradas apenas duas plantas por período de avaliação de acordo com a técnica descrita por Pergard *et al.* (2005).

#### **4.4.1. PREPARO DAS AMOSTRAS PARA CONTAGEM DA PENETRAÇÃO POR J2**

Concomitantemente com a preparação das amostras para microscopia ótica, as raízes das outras três plantas de cada tratamento amostrado, até o 15º dia, foram submetidas a coloração com fucsina ácida, para observação da penetração, quantificação e desenvolvimento dos juvenis, segundo metodologia descrita por Byrd *et al.* (1983). Para isso, as raízes foram

lavadas com água corrente e depois de higienizadas foram mergulhadas em 200 mL de solução aquosa de NaOCl (5,25%) por 4 min. Após tratamento com hipoclorito de sódio, as raízes foram lavadas em água corrente por 45 s e mantidas em um béquer com água de torneira por 15 min, para retirada o excesso de NaOCl. Em seguida, as raízes foram transferidas para um béquer de 40 mL de capacidade contendo água de torneira sendo acrescentados 2 mL de solução estoque de fuccina ácida (1,25 g fuccina ácida; 125 mL ácido acético glacial; 375 mL de água destilada). A solução e as raízes foram aquecidas no forno micro-ondas por 1,5 min. Depois de resfriadas, as raízes foram descoradas com água quente e transferidas para um béquer contendo 20 mL de glicerol (99%). Preparadas as amostras estas foram transferidas para placas de Petri para que fossem observadas sob microscópio estereoscópico e realizadas as contagens dos nematoides presentes no interior das raízes. Partes das raízes que mostraram a presença do nematoide foram colocadas em uma lâmina contendo uma gota de glicerol puro e levadas ao microscópio de luz Axiophot Zeiss, para serem examinadas e fotodocumentadas.

#### **4.4.2. ACOMPANHAMENTO DA POPULAÇÃO DE J2**

Com o intuito de acompanhar, ao longo do tempo, a população de J2 presente na areia utilizada no ensaio, estes substratos foram trabalhados para montagem de funil de Baermann modificado segundo método descrito por Flegg (1967). Para isso, os substratos foram colocados em baldes de 5 L de capacidade, preenchidos até a metade com água de torneira e agitados manualmente em sentido circular, a fim de desagregar os torrões e liberar os nematoides para a suspensão. Após a agitação, aguardou-se mais vinte segundos para que a areia suspensa na água decantasse. Passado esse período de espera, todo o volume de água do balde foi passado por peneira de 0,025 mm para coleta dos J2 contido no sobrenadante. Com

auxílio de uma pisseta, contendo água, esse material coletado na peneira de 0,025 mm, foi transferido para béquer e posteriormente utilizado para montagem dos funis de Baermann modificados (JENKINS, 1964). Os substratos das três repetições de todos os tratamentos até o 12º dia foram utilizados para esse ensaio. Os funis foram avaliados 24 h após suas montagens, onde foram feitas contagens dos J2 vivos presentes no sobrenadante. As contagens foram realizadas sob microscópio ótico com auxílio de câmara Peters conforme descrito no capítulo 2.

#### **4.4.3. FATOR DE REPRODUÇÃO DO ENSAIO DE HISTOPATOLOGIA**

Neste ensaio foram utilizadas 40 plantas com 65 dias de idade, sendo 20 tratadas e 20 não tratadas com a formulação a base de bactéria. As plantas foram produzidas e conduzidas juntamente com as do ensaio de histopatologia. Quanto às avaliações, estas foram realizadas no Laboratório de Nematologia da Embrapa – Cenargen. Para tal, as plantas conduzidas em casa de vegetação tiveram, no momento das avaliações, suas partes aéreas eliminadas e seu sistema radicular conduzido ao laboratório. No laboratório, os sistemas radiculares das 32 plantas foram lavados cuidadosamente com água de torneira e destinadas para instalação das unidades experimentais, compostas por quatro plantas, visto que, tratavam-se de plantas jovens com sistema radicular relativamente pequeno. Foram utilizadas cinco repetições por tratamento. Instaladas as unidades experimentais, as raízes assim obtidas foram cortadas e trituradas com solução de hipoclorito (1%) em liquidificador de alta rotação por 40 s. Em seguida foram passadas por conjunto de peneiras de 0,840, 0,150 e 0,025 mm, seguindo metodologia de Hussey & Barker (1973) contendo modificações. Após a extração os ovos foram contados em câmara de Peters e microscópio ótico.

#### **4.4.4. MÉTODO DE PERGARD *et al.* (2005) - COLORAÇÃO COM AZUL DE TOLUIDINA**

Para a realização desse ensaio, as plantas foram cuidadosamente extraídas do substrato para que as raízes não fossem danificadas. A parte aérea foi cortada e descartada. As raízes foram lavadas em água corrente. As extremidades das raízes, com cerca de 3mm de comprimento, com ou sem galhas, foram retiradas com auxílio de um bisturi e pinça fina, sob microscópio estereoscópico. Em seguida, os segmentos da raiz foram fixados em solução de glutaraldeído a 1% (v:v), formaldeído a 4% (v:v) e 100 mM de tampão fosfato (pH 7,2), à temperatura ambiente. Posteriormente, foram mantidos por 12h em agitador rotativo, para penetração da solução fixadora nas raízes.

Depois de fixadas, as extremidades das raízes foram lavadas duas vezes, por 30 minutos cada, com tampão fosfato de sódio 50 mM a pH 7,2. A seguir, as raízes foram desidratadas sob agitação em uma série etanólica crescente de 10 a 100%, com intervalos de 20 minutos entre as substituições das soluções; os banhos com a concentração de 100% foram repetidos duas vezes. As extremidades das raízes foram embebidas em resina Technovit 7100<sup>®</sup> a 4° C, de acordo com protocolo do fabricante. Após emblocadas as amostras das raízes em resina foram levadas ao ultramicrotomo para realização dos cortes e preparação das lâminas. Para isso, os cortes realizados foram acondicionados sobre uma gota de água destilada em lâminas de vidro. Preparados os cortes sobre a lâmina de vidro, estas foram encaminhadas para chapa regulada para temperatura de aproximadamente 50°C, para evaporação da água. Com as lâminas secas, estas foram coloridas com azul de toluidina (Anexo 1), para posterior visualização e fotodocumentação sob microscópio de luz Axiophot Zeiss.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### ALTURA DE PARTE AÉREA DAS PLANTAS

Aos 33 dias após emergência (DAE), notou-se maior crescimento das plantas nos tratamentos com os produtos ‘Onix e Nemix’ (Tabela 2). Os demais produtos biológicos testados não promoveram crescimento superior à testemunha, mas a média dos valores conseguidos foram superiores. O tratamento químico provocou fitotoxidez nas plantas tratadas, resultando em um retardamento em seu crescimento inicial. Resultados semelhantes foram obtidos por Khiyami *et al.* (2014), que ao trabalhar com *Bacillus* no tratamento de sementes, para controle de sete fungos do complexo de doenças de plântulas de algodão, ao testarem seu efeito fungicida, também registraram promoção de crescimento das plantas tratadas. Estes efeitos podem ser devido ao fato de algumas espécies deste gênero possuírem a capacidade de produzir compostos capazes de promover o crescimento em plantas (SWAIN & RAY, 2009; LÓPEZ-VALDEZ *et al.*, 2011).

**TABELA 2:** Efeito de formulações a base de *Bacillus* comerciais na altura do algodoeiro (‘BRS 286’) sem e com ataque de *Meloidogyne incognita* em casa de vegetação, aos 33 dias após a emergência.

<i>Bacillus</i>	Produto	Altura (cm)		
		<i>M. incognita</i>		Média
		Sem	Com	
<i>B. methylotrophicus</i>	Onix	37,7 a A*	38,0 a A	37,8 a
<i>B. subtilis</i>	Rizos	29,5 bc A	32,0 b A	30,8 b
<i>B. amyloliquefaciens</i>	NemaControl	26,7 cd B	30,7 bc A	28,7 b
<i>B. subtilis</i> + <i>B. licheniformis</i>	Nemix	32,3 ab A	31,3 bc A	31,8 b
-	Furadan	23,5 d A	24,7 d A	24,1 c
-	Testemunha	31,0 bc A	26,0 cd B	28,5 b

\*Valores seguidos pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

Araújo (2008) ao trabalhar com a cultura do milho e Freitas *et al.* (2003), trabalhando com alface, conseguiram a partir do uso de bactérias do gênero *Bacillus* resultados promissores em promoção de crescimento de plantas em tratamento de sementes. Estes resultados corroboram com os encontrados em nosso estudo.

**TABELA 3:** Efeito de formulações a base de *Bacillus* comerciais na altura do algodoeiro ('BRS 286') sem e com ataque de *Meloidogyne incognita* em casa de vegetação, aos 74 dias após a emergência.

<i>Bacillus</i>	Produto	Altura (cm)		
		<i>M. incognita</i>		Média
		Sem	Com	
<i>B. methylotrophicus</i>	Onix	59,7 aA	57,5 aA	58,6 a
<i>B. subtilis</i>	Rizos	39,0 aA	43,8 aA	41,4 bc
<i>B. amyloliquefaciens</i>	NemaControl	36,7 aA	38,5 aA	37,6 bcd
<i>B. subtilis</i> + <i>B. licheniformis</i>	Nemix	45,8 aA	46,5 aA	46,2 b
-	Furadan	32,7 aA	28,3 aA	30,5 d
-	Testemunha	39,5 aA	31,0 aA	35,3 cd

\*Valores seguidos pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

Nos tratamentos com *B. methylotrophicus* (Onix), *B. subtilis* (Rizos), *B. subtilis* + *B. licheniformis* (Nemix) e Carbofuran (Furadan) não houve inicialmente diferença estatística entre eles (Tabela 3). Esse fato pode ser consequência da ação nematicida dos produtos testados ou, para os tratamentos biológicos, consequência da promoção de crescimento (XIE *et al.*, 2014; GOSWAMI *et al.*, 2014; CLEMENTE *et al.*, 2016). Resultado contrário pode ser observado para os tratamentos: *B. amyloliquefaciens* (NemaControl) com resultado do produto biológico, com a presença do nematoide, apresentando valores de crescimento de

plantas superiores e Testemunha sem tratamento, onde a presença dos nematoides prejudicou o desenvolvimento inicial das plantas. Para este último caso, o fato pode ser explicado devido ao estabelecimento do parasitismo dos nematoides, com início da alimentação. Ainda na tabela 2 pode ser novamente observado o maior desenvolvimento inicial das plantas tratadas com o produto comercial Onix apresentando maior crescimento inicial das plantas e novamente um resultado negativo para o produto químico com redução no crescimento das plantas. Efeitos fitotóxicos de Carbofuran na cultura do algodão foram relatados por Jorgenson (1978).

Para a segunda avaliação do crescimento das plantas do ensaio (Tabela 3), é possível notar a superioridade dos resultados obtidos pela utilização do Onix, com altura de plantas superior aos demais tratamentos empregados. O produto Nemix também apresentou resultados superiores, conseguindo diferir estatisticamente da testemunha sem bactéria e do tratamento químico. Os demais tratamentos, não diferiram estatisticamente da testemunha, mas é importante destacar que o Rizos, também biológico, quando desafiado com o nematoide, apresentou diferença estatística da testemunha sem bactéria e do tratamento químico com resultado superior de altura de plantas.

**TABELA 4:** Efeito de formulações a base de *Bacillus* comerciais na altura do algodoeiro (‘BRS 286’) sem e com ataque de *Meloidogyne incognita* em casa de vegetação, aos 107 dias após a emergência.

<i>Bacillus</i>	Produto	Altura (cm)		
		<i>M. incognita</i>		Média
		Sem	Com	
<i>B. methylotrophicus</i>	Onix	90,8 aA	86,7 aA	88,8 a
<i>B. subtilis</i>	Rizos	58,0 bA	71,7 aA	64,8 bc
<i>B. amyloliquefaciens</i>	NemaControl	63,3 bA	67,7 aA	65,5 bc
<i>B. subtilis</i> + <i>B. licheniformis</i>	Nemix	71,0 abA	76,7 aA	73,8 b
-	Furadan	57,0 bA	46,2 bA	51,6 c
-	Testemunha	66,7 bA	46,8 bB	56,8 c

\*Valores seguidos pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

Aos 107 DAE os tratamentos com ‘Onix’ e ‘Nemix’ proporcionaram maior crescimento de planta em comparação com a testemunha (Tabela 4). Quanto a avaliação dos tratamentos com e sem nematoide, apenas a testemunha sem bactéria apresentou diferença estatística em relação a presença ou ausência do patógeno, com menor crescimento quando havia a presença do nematoide (Tabela 2). Quando os tratamentos são comparados dentro do mesmo grupo, o tratamento Onix sem o parasita mostrou-se superior aos demais. Já na comparação desses tratamentos nas parcelas infestadas com nematoides, mostrou que apenas o tratamento químico e a testemunha tiveram o crescimento das plantas prejudicado em comparação com os tratamentos biológicos, indicando que o agente de controle biológico pode incitar maior crescimento em plantas (FREITAS *et al.*, 2003; ARAÚJO, 2008; KHIYAMI *et al.*, 2014).

Aos 136 DAE, as maiores médias de altura foram expressas pelas plantas tratadas com os produtos Onix e Nemix (Tabela 5). A única diferença apresentada nesta avaliação foi para o produto NemaControl onde as plantas tratadas com este produto apresentaram média de

crescimento superior ao tratamento químico, mas não diferiu da testemunha sem tratamento. Podemos visualizar no grupo de plantas sem nematoides que não houve diferença estatística entre os tratamentos e a testemunha sem bactéria, mas houve superioridade do tratamento biológico Onix em relação ao tratamento químico. Para o grupo de plantas com nematoide todos os tratamentos biológicos foram superiores ao tratamento químico e a testemunha sem bactéria, reforçando a ideia da promoção de crescimento das plantas por alguns agentes de controle biológico. Para este teste também não houve interação entre os grupos de plantas com e sem inoculação de nematoide.

**TABELA 5:** Efeito de formulações a base de *Bacillus* comerciais na altura do algodoeiro (‘BRS 286’) sem e com ataque de *Meloidogyne incognita* em casa de vegetação, aos 136 dias após a emergência.

<i>Bacillus</i>	Produto	Altura (cm)		
		<i>M. incognita</i>		Média
		Sem	Com	
<i>B. methylotrophicus</i>	Onix	118,0 aA	118,8 aA	118,4 a
<i>B. subtilis</i>	Rizos	90,0 bA	104,7 aA	97,3 bcd
<i>B. amyloliquefaciens</i>	NemaControl	98,3 abA	107,7 aA	103,0 bc
<i>B. subtilis</i> + <i>B. licheniformis</i>	Nemix	103,3 abA	115,8 aA	109,6 ab
-	Furadan	89,8 bA	80,5 bA	85,2 d
-	Testemunha	102,3 abA	80,2 bB	91,3 cd

\*Valores seguidos pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

Ao final do experimento, antes da retirada das plantas para pesagem de massa fresca e seca da parte aérea e radicular, foi realizada uma última aferição da altura das plantas finalizando as análises de acompanhamento de altura. Com estes dados, a partir de análise estatística foi possível construir as tabelas acima, assim como realizado com os dados de altura de plantas coletados anteriormente. Aqui, é possível observar (Tabela 6), uma melhor

resposta de crescimento nas plantas tratadas com os produtos biológicos ‘NemaControl’ e ‘Nemix’. Os demais tratamentos não diferiram estatisticamente da testemunha. Nesta última análise observou (Tabela 6), que houve interação entre blocos, isso significa que a presença dos nematoides, em um dos blocos, surtiu efeito sobre a altura final das plantas do ensaio, as plantas tratadas com ‘Onix’ tanto no grupo sem nematoides quanto no grupo com nematoide não diferiram significativamente. Quando observamos os resultados obtidos com a testemunha podemos observar que as plantas sem nematoide, ao final do experimento apresentaram porte maior, diferindo estatisticamente dos resultados apresentados pelo grupo com nematoide. A partir dos resultados apresentados, podemos inferir que a inoculação das plantas com o produto biológico do tratamento com ‘Onix’ possibilitou um incremento na altura das plantas, mesmo com a presença do parasita.

**TABELA 6:** Efeito de formulações a base de *Bacillus* comerciais na altura do algodoeiro (‘BRS 286’) sem e com ataque de *Meloidogyne incognita* em casa de vegetação, aos 200 dias após a emergência.

<i>Bacillus</i>	Produto	Altura (cm)		
		<i>M. incognita</i>		Média
		Sem	Com	
<i>B. methylotrophicus</i>	Onix	170,2 abA	184,3 abA	177,3 bc
<i>B. subtilis</i>	Rizos	162,5 bB	187,8 abA	175,2 c
<i>B. amyloliquefaciens</i>	NemaControl	177,7 aB	201,2 aA	189,4 ab
<i>B. subtilis</i> + <i>B. licheniformis</i>	Nemix	182,7 aB	199,3 aA	191,0 a
-	Furadan	171,3 abA	175,3 bcA	173,3 c
-	Testemunha	178,3 abA	158,5 cB	168,4 c

\*Valores seguidos pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

Os tratamentos Rizos, NemaControle e Nemix induziram um maior crescimento final das plantas tratadas no grupo de plantas com nematoide, quando comparamos os resultados

dos mesmos tratamentos apresentados no grupo sem nematoide (Tabela 6). Esse crescimento das plantas no final, apesar de aparentemente positivo, não proporcionou ganhos reais as plantas como pode ser visualizado com as próximas análises, onde as plantas desses dois grupos não diferiram estatisticamente entre si, para o mesmo tratamento (Tabela 8), pelo contrário, o tratamento com o Nemix após secagem, apresentou maior massa nas plantas não parasitadas pelos nematoides, apesar da altura das plantas do grupo com nematoide ser superior.

### **MASSA FRESCA DE PARTE AÉREA**

Com os resultados obtidos (Tabela 7), é possível inferir que houve um maior crescimento das plantas tratadas com os produtos biológicos Rizos, NemaControle e Nemix, assim como um maior peso de matéria fresca para este mesmo lote de plantas. Novamente para o primeiro grupo analisado (plantas não inoculadas com nematoide) o produto Nemix promoveu um melhor crescimento das plantas na ultima avaliação e esse crescimento final foi confirmado pelo maior peso de matéria fresca alcançado pelas plantas tratadas com este produto. As plantas tratadas com Furadan e sem a infestação por nematoide apresentaram maior peso de matéria fresca quando comparadas com a testemunha (Tabela 7), mas este maior peso, observado ao final do experimento, deveu-se a um crescimento vegetativo das plantas com a produção de brotos terminais bastante tenros o que propiciou maior altura e peso de matéria fresca nas plantas. Araújo & Marchesi (2009), trabalhando com promoção de crescimento de plantas de tomate mediada por *B. subtilis*, também relataram um maior peso de matéria fresca das plantas tratadas com o a bactéria e produto químico em relação a testemunha.

**TABELA 7:** Efeito de formulações a base de *Bacillus* comerciais na massa fresca da parte aérea de algodoeiro (‘BRS 286’) sem e com *Meloidogyne incognita* em casa de vegetação, aos 200 dias após a emergência.

<i>Bacillus</i>	Produto	Massa (g)	
		<i>M. incognita</i>	
		Sem	Com
<i>B. methylophilus</i>	Onix	250,6 abA	231,5 bB
<i>B. subtilis</i>	Rizos	248,5 abB	268,7 aA
<i>B. amyloliquefaciens</i>	NemaControl	254,0 abA	267,6 aA
<i>B. subtilis</i> + <i>B. licheniformis</i>	Nemix	269,3 aA	281,6 aA
-	Furadan	262,2 aA	238,0 bB
-	Testemunha	238,6 bA	235,5 bA

\*Valores seguidos pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

### MASSA SECA DE PARTE AÉREA

Após secagem do material vegetal analisado anteriormente, obtivemos o peso seco da parte aérea, que melhor representa o real ganho de massa das plantas no experimento (Tabela 8). Para este parâmetro, novamente o produto biológico comercial Onix foi o que proporcionou melhor resultado dentro do grupo de plantas sem infestação com o nematoide, onde diferiu estatisticamente de quase todos os tratamentos dentro deste grupo, exceto do Nemix. Dentro do segundo grupo (com nematoide), novamente o Onix apresentou maior peso de matéria seca quando comparado aos outros tratamentos, mas não diferiu estatisticamente do Rizos apesar de apresentar peso de massa seca superior. É notório também que o Onix, o Rizos e o NemaControl, conseguiram manter praticamente o mesmo peso de parte aérea das plantas, mesmo com a presença do patógeno em suas raízes, sem diferença estatística entre o mesmo tratamento em grupos diferentes (sem e com nematoide). Com estes resultados é possível

inferir que a presença dos nematoides nessas plantas não causou redução significativa em sua produção de matéria seca quando as mesmas foram tratadas com estes produtos biológicos.

**TABELA 8:** Efeito de formulações a base de *Bacillus* comerciais na massa seca da parte aérea de algodoeiro ('BRS 286') sem e com *Meloidogyne incognita* em casa de vegetação, aos 200 dias após a emergência.

<i>Bacillus</i>	Produto	Massa (g)	
		<i>M. incognita</i>	
		Sem	Com
<i>B. methylotrophicus</i>	Onix	89,7 aA	87,0 aA
<i>B. subtilis</i>	Rizos	78,2 bcA	80,0 abA
<i>B. amyloliquefaciens</i>	NemaControl	79,6 bcA	72,8 bcA
<i>B. subtilis</i> + <i>B. licheniformis</i>	Nemix	85,0 abA	76,7 bcB
-	Furadan	75,6 cA	55,4 dB
-	Testemunha	78,2 bcA	70,7 cB

\*Valores seguidos pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

O pior resultado neste experimento foi o obtido pelo tratamento químico, visto que houve um fitotoxidez inicial das plantas com redução em seu crescimento. Essa fitotoxidez só foi superada próximo ao final do ensaio, onde as plantas retomaram o seu crescimento recuperando em altura e peso de massa fresca, mas não houve tempo para acúmulo de matéria seca na mesma magnitude registrada para os demais tratamentos. Com isso, ao passarem pelo processo de secagem, ao final do ensaio, essas plantas tiveram peso reduzido, pois seus ramos ainda estavam muito tenros. Essa reação de fitotoxidez das plantas poderia ter causado redução na produtividade caso essa estivesse sendo avaliada. Jorgenson (1978), avaliando a eficiência do carbofuram no controle de *M. incognita* na cultura do algodão registrou efeito fitotóxico nas plantas em razão da utilização do produto e esse efeito tóxico resultou ao final do ciclo da cultura em redução de produtividade das plantas quando o inóculo inicial do

nematoide foi baixo na área tratada. Analisando os dados encontrados, nota-se uma maior uniformidade no peso de matéria seca no grupo de plantas não infestado com os nematoides (Tabela 8), e a presença dos nematoides no segundo grupo, mais uma vez, causou desuniformidade nos dados, evidenciando as diferenças entre os tratamentos.

### **MASSA FRESCA DA RAIZ**

Assim como ocorreu em relação ao peso de massa fresca para a parte aérea das plantas, o produto biológico Onix, proporcionou massa fresca de raiz máxima em comparação aos demais tratamentos do ensaio, independente da presença do nematoide (Tabela 9). Os demais tratamentos nas plantas sem infestação com nematoides, não diferiram estatisticamente da testemunha. Já para o segundo grupo (com infestação dos nematoides), as plantas tratadas com o Onix novamente se mostraram superiores à testemunha. Os demais tratamentos biológicos não diferiram estatisticamente da testemunha, e o tratamento químico foi o que mostrou o peso de raiz mais reduzido, provavelmente devido à fitotoxidez provocada nos estádios iniciais de desenvolvimento das plantas. Quando se faz um paralelo entre plantas sem e com infestação de nematoides, para esse mesmo parâmetro (peso fresco de raiz), é possível notar um maior peso de matéria fresca de raiz no grupo com nematoide (Tabela 9).

Esse fato é explicado pela formação das galhas nas raízes das plantas parasitadas por *M. incognita* e a presença das galhas, confere maior peso às raízes. A única exceção para esse evento foi a observada no tratamento químico, mas isso se deveu a maior vulnerabilidade das plantas que ao serem atacadas pelo patógeno já estavam sofrendo pela fitotoxidez do produto químico provocando travamento inicial em seu desenvolvimento. É importante registrar também que as galhas formadas nas raízes das plantas tratadas com o produto químico

também foram menores. Além disso, seu sistema radicular foi também bastante reduzido, mas apesar de todo esse estresse sofrido pelas plantas, a reprodução dos nematoides não foi comprometida. Conforme será destacado adiante (Tabela 11). O peso da matéria fresca de raízes nas parcelas infectadas com nematoide e tratadas com Furadan foi o menor de todos os tratamentos.

**TABELA 9:** Efeito de formulações a base de *Bacillus* comerciais na massa fresca das raízes de algodoeiro ('BRS 286') sem e com *Meloidogyne incognita* em casa de vegetação, aos 200 dias após a emergência.

<i>Bacillus</i>	Produto	Massa (g)	
		<i>M. incognita</i>	
		Sem	Com
<i>B. methylotrophicus</i>	Onix	118,3 aB	148,8 aA
<i>B. subtilis</i>	Rizos	103,2 abcB	137,7 abA
<i>B. amyloliquefaciens</i>	NemaControl	107,3 abA	119,9 bA
<i>B. subtilis</i> + <i>B. licheniformis</i>	Nemix	96,4 bcB	123,5 bA
-	Furadan	85,9 cA	80,8 cA
-	Testemunha	91,1 bcB	118,3 bA

\*Valores seguidos pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

### MASSA SECA DA RAIZ

A análise do peso seco de raiz sem nematoide, só reforça o que já foi mostrado com a realização da pesagem das raízes frescas: maior ganho de matéria seca para as raízes das plantas tratadas com o Onix e menor ganho de peso das raízes onde foi realizado o tratamento químico. Para os demais tratamentos biológicos não houve diferença estatística em relação a testemunha sem tratamento (Tabela 10). É importante ressaltar que não foi realizada a

aferição do peso seco das raízes tratadas com nematoide, visto que, estas foram utilizadas para avaliação do fator de reprodução do patógeno que é uma análise destrutiva.

**TABELA 10:** Efeito de formulações a base de *Bacillus* comerciais na massa seca de raiz de algodoeiro (‘BRS 286’) sem *Meloidogyne incognita* em casa de vegetação, aos 200 dias após a emergência.

<i>Bacillus</i>	Produto	Massa (g)
<i>B. methylotrophicus</i>	Onix	20,0 a
<i>B. subtilis</i>	Rizos	13,7 bc
<i>B. amyloliquefaciens</i>	NemaControl	15,1 b
<i>B. subtilis</i> + <i>B. licheniformis</i>	Nemix	13,0 bc
-	Furadan	11,9 c
-	Testemunha	16,1 b

\*Valores seguidos pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

Trabalhando com *B. pumilus* no controle biológico da muchuca de *Fusarium* em tomateiro, Heidarzadeh & Baghaee-Ravari (2015) avaliaram além da ação direta da bactéria sobre o fungo, a promoção de crescimento de plantas, a produção de hormônios e sideroforos e a formação de biofilme na rizosfera das plantas tratadas. Como conclusão esses autores comprovaram que estas bactérias podem colonizar e sobreviver na rizosfera das plantas formando biofilme e são capazes de produzir auxinas e sideroforos com promoção do aumento em comprimento da raiz e parte aérea de 60 e 84%, respectivamente, além de reduzir a incidência da doença em testes *in vivo*. Os resultados apresentados neste trabalho corroboram com o presente onde também observou-se promoção de crescimento em plantas com a utilização de bactérias deste gênero.

## FATOR DE REPRODUÇÃO DO NEMATOIDE EM CASA DE VEGETAÇÃO

Para este ensaio, novamente observou-se um bom resultado alcançado pelo Onix com redução significativa na reprodução do patógeno. Os demais tratamentos biológicos não apresentaram controle estatisticamente diferente da testemunha, e ao contrário, alguns deles como o NemaControl e o Nemix favoreceram a reprodução do patógeno ao promover o crescimento das plantas sem efeito sobre os nematoides (Tabela 11). Neste mesmo ensaio, o tratamento químico assim como o ‘NemaControl’ promoveram aumento na população do patógeno em comparação aos demais tratamentos e apresentaram fator de reprodução 61,68% e 48,57% maior que a testemunha sem tratamento (Tabela 11). Alguns autores já haviam observado tais respostas em que as rizobactérias podem apresentar efeitos benéficos, prejudiciais ou neutros, dependendo da cultura, espécie de rizobactéria e isolado (LUZ, 1996; SCHIPPERS *et al.*, 1987; VAZ *et al.*, 2011; FERNANDES *et al.*, 2013).

**TABELA 11:** Efeito de formulações a base de *Bacillus* comerciais sobre o fator de reprodução de *Meloidogyne incognita* em algodoeiro (‘BRS 286’) em casa de vegetação, aos 180 dias após a inoculação dos nematoides.

<i>Bacillus</i>	Produto	Fator de reprodução
<i>B. methylotrophicus</i>	Onix	14,3 d
<i>B. subtilis</i>	Rizos	21,3 cd
<i>B. amyloliquefaciens</i>	NemaControl	42,0 a
<i>B. subtilis</i> + <i>B. licheniformis</i>	Nemix	37,7 ab
-	Furadan	46,1 a
-	Testemunha	28,3 bc

\*Valores seguidos pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

Já foi relatado para a cultura da cana de açúcar efeito parecido com o encontrado neste trabalho com algodão onde os autores utilizando carbofuran para controle de nematoide obtiveram um efeito nematicida inicial e por um período curto. Decorrido este prazo (aproximadamente 90 dias) o produto perdeu o efeito e os nematoides sobreviventes produziram um grande número de descendentes devido às raízes abundantes (SCHMITT *et al.*, 1983; SIPES & SCHMITT, 1998).

## **HISTOPATOLOGIA**

### **PENETRAÇÃO DE J2 NAS RAÍZES**

Avaliando a penetração de J2 nas raízes, podemos inferir que esse processo de penetração se inicia logo após a inoculação dos nematoides no solo, pois, já no primeiro dia de avaliação (2º DAI), foi possível visualizar vários indivíduos no interior das raízes (Figura 1). Essa penetração foi mais pronunciada na testemunha até o 6º DAI, isso pode indicar atividade antagônica inicial da bactéria testada sobre a penetração do nematoide. A partir do 8º DAI a situação se inverteu, havendo maior penetração nas raízes das plantas tratadas com o produto biológico, mas estatisticamente, essa inversão só é confirmada no 10º DAI. Neste estudo foi possível notar ainda uma atividade de penetração crescente com um auge no 8º DAI, mas essa atividade estendeu-se até o 10º DAI e a partir desse momento houve uma relativa estabilização na penetração de J2 para este ensaio nas condições em que foi instalado (Tabela 12). Resultados de penetração bastante semelhantes aos encontrados em nosso trabalho foram registrados por Campos *et al.* (2006), trabalhando com *M. javanica* e *Heterodera glycines*. Esses autores observaram penetração de nematoides (J2) até o décimo DAI assim como os nestes registros, mas as condições durante a condução dos ensaios foram

bastante diferentes das encontradas nestes testes, mesmo porque se trata de metodologias diferentes.

**TABELA 12:** Efeito de *B. methylotrophicus* sobre o número de juvenis de *M. incognita* que penetraram em raízes do algodoeiro (FM 966) até o 12º DAI.

<b>Tratamento</b>	<b>2º dia</b>	<b>4º dia</b>	<b>6º dia</b>	<b>8º dia</b>	<b>10º dia</b>	<b>12º dia</b>
<b><i>B. methylotrophicus</i></b>	9,0 aB	22,0 bA	88,7 aB	199,7 aA	261,0 aA	233,0 aA
<b>Testemunha</b>	33,3 aB	86,7 aAB	117,3 aAB	169,3 aA	161,3 bA	160,0 bA

\*Valores seguidos pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

### **ACOMPANHAMENTO DA POPULAÇÃO DE J2 NO SUBSTRATO**

Ao contrário à penetração, que cresceu da primeira avaliação no segundo DAI até a última no 12º DAI, a avaliação da população de nematoides recuperados do substrato, decresceu do segundo ao 12º DAI. Esse resultado já era esperado, uma vez que o J2 não se alimenta fora da raiz, isto é, durante o período que permanecem no solo a procura de um hospedeiro se nutre a partir do consumo das suas reservas, presentes no seu intestino, exaurindo essas reservas, e caso estes não entrem em diapausa, esses indivíduos perecerão (EVANS & PERRY, 2009).

Os resultados aqui apresentados (Tabela 13), corroboram com os obtidos por Campos *et al.* (2006) onde estes autores ainda no oitavo DAI conseguiram recuperar J2 de *M. javanica* quando em substrato contendo areia grossa. Neste trabalho conseguiu-se a recuperação de J2 até o 12º DAI, mas essa variação pode ter sido devido a fatores ambientais e até mesmo a metodologia utilizada na condução e avaliação dos ensaios. Evans & Perry (2009) discutem ainda que essa sobrevivência dos J2 no solo vai depender de uma série de fatores além do tipo de solo, sendo a temperatura, a umidade e a concentração de oxigênio no substrato muito

importantes na manutenção dessa sobrevivência. Esses autores afirmam ainda que a presença de hospedeiros reduz ainda mais esse intervalo, visto que se os juvenis notam sua presença se movimentam ainda mais, consumindo suas reservas.

**TABELA 13:** Número de juvenis de segundo estadio de *M. incognita* recuperados do substrato das plantas do ensaio de histopatologia até o 12° DAI (método do Funil de Baermann).

Tratamento		2° dia	4° dia	6° dia	8° dia	10° dia	12° dia
<i>B. methylotrophicus</i>	<b>M</b>	1553,4 aA	1167,4 aA	1035,5 aA	248,0 aB	117,3 aB	46,8 aB
	<b>PR</b>	<b>31</b>	<b>23,4</b>	<b>20,7</b>	<b>5,0</b>	<b>2,4</b>	<b>0,9</b>
Testemunha	<b>M</b>	1557,9 aA	1203,7 aA	1311,2 aA	426,4 aB	103,7 aB	93,0 aB
	<b>PR</b>	<b>31,2</b>	<b>24,1</b>	<b>26,2</b>	<b>8,5</b>	<b>2,1</b>	<b>1,9</b>

\*Valores seguidos pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ). \*\*M = média; \*\*\*PR = porcentagem recuperada

### FATOR DE REPRODUÇÃO DO ENSAIO DE HISTOPATOLOGIA

**TABELA 14:** Efeito de *B. methylotrophicus* sobre o fator de reprodução (FR) de *M. incognita* no algodoeiro (FM 966) no 45° DAI do ensaio de histopatologia.

Tratamento		1ª rep.	2ª rep.	3ª rep.	4ª rep.	5ª rep.
<i>B. methylotrophicus</i>	<b>FR</b>	1,20 bB	0,95 bB	2,58 aA	1,28 bB	0,95 bB
	<b>M de FR</b>	<b>1,39</b>				
Testemunha	<b>FR</b>	2,08 aA	1,73 aA	2,25 aA	1,83 aA	1,67 aA
	<b>M de FR</b>	<b>1,91</b>				

\*Valores seguidos pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ). \*\*M = média. \*\*\*rep. = repetição.

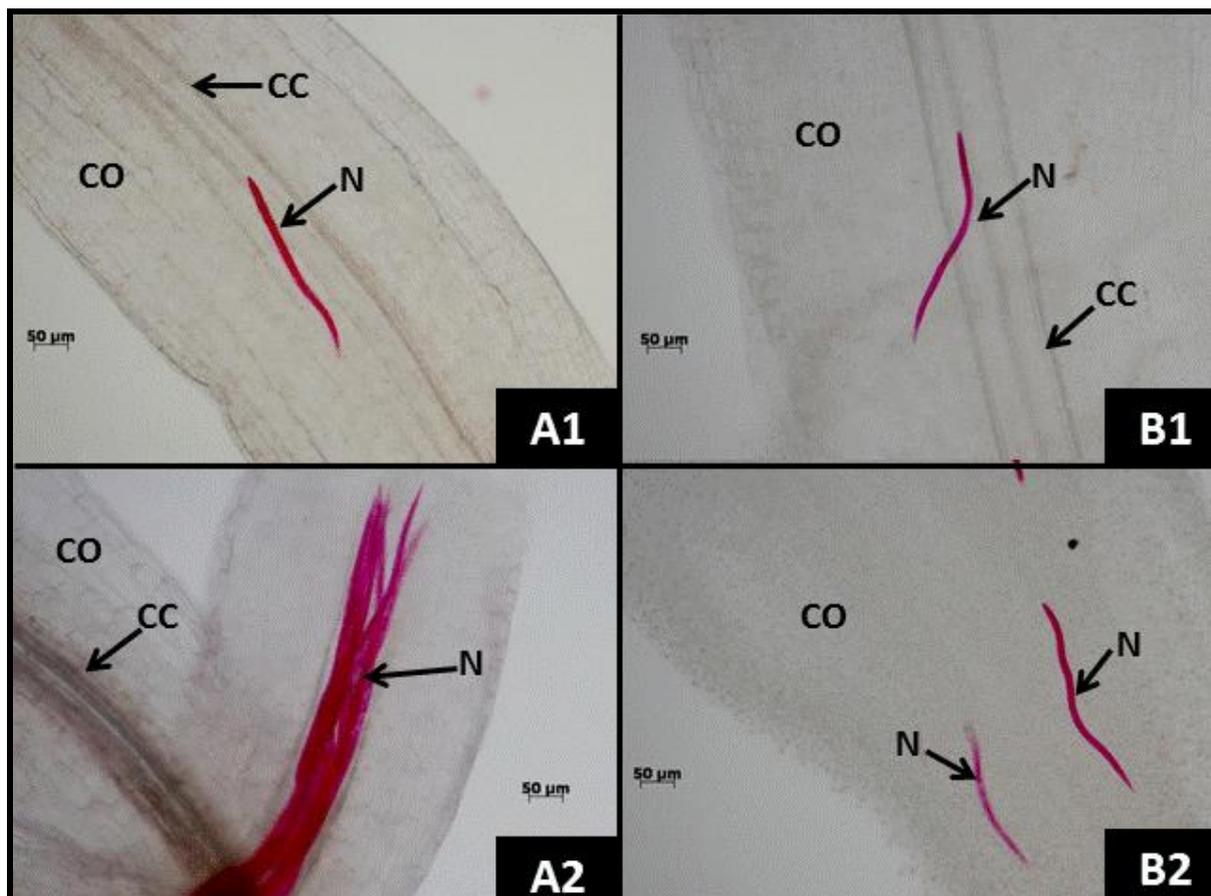
Feita a análise estatística dos dados (Tabela 14), não foi encontrada diferença estatística significativa entre os tratamentos, mas apesar desse resultado é possível notar, com a análise das médias gerais dos dois tratamentos (com bactéria = 1,39; sem bactéria = 1,91),

uma leve redução do fator de reprodução do nematoide quando as sementes foram tratadas com o agente de controle biológico.

### **MÉTODO DA FUCSINA ÁCIDA**

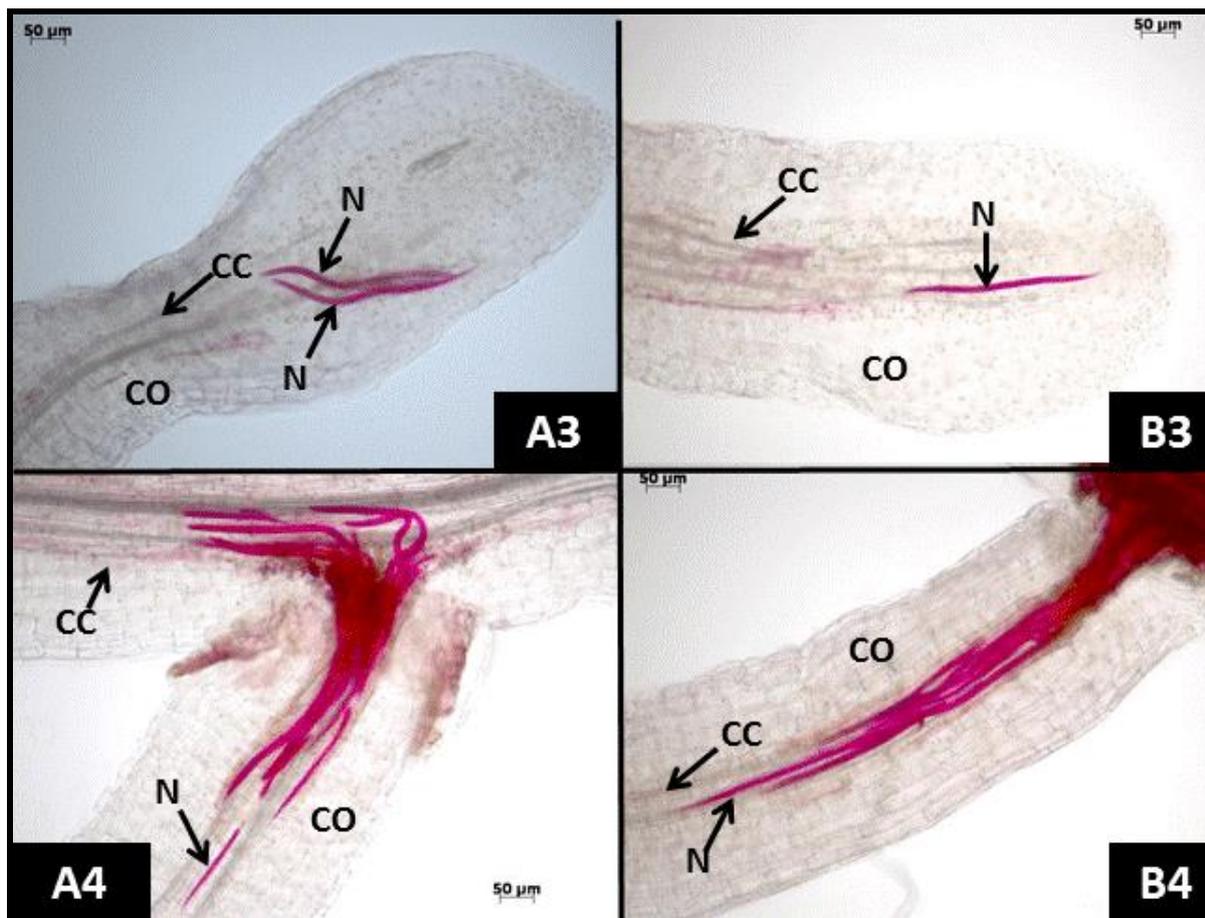
A avaliação das raízes coradas com fuccina ácida tornou possível a visualização e quantificação da penetração dos J2 de *M. incognita* nas raízes do algodoeiro (Figuras 1 - 7). Nesse processo, os J2 penetraram na região do meristema subapical das raízes em grupo formando verdadeiros feixes (Figura 1 A2) até atingiram a área vascular diferenciada, onde iniciaram a alimentação. As penetrações foram registradas já no segundo dia após a inoculação (DAI), onde, tanto a testemunha quanto no tratamento com bactéria foram registradas penetrações dos nematoides (Figura 1). Como fotodocumentado (Figuras 1 a 6), esse processo de penetração foi observado até o 12º DAI, podendo ser reforçado pelos resultados encontrados com o acompanhamento da população de J2 no substrato, onde até o 12º dia ainda foi possível recuperar juvenis viáveis no solo, a partir da utilização do funil de Baerman.

A movimentação de J2 no córtex das raízes em direção ao cilindro central causa desorganização celular (Figura 8 B1) e pode ser observada durante todo o período em que houve as penetrações. Já no 6º DAI (Figura 3) foi possível notar as mudanças morfológicas em alguns do nematoides dentro da raiz onde os mesmos aumentaram de diâmetro tornando-se salsichoides, indicativo de que já haviam iniciado a alimentação com o estabelecimento do seu sítio de infecção.



**FIGURA 1:** Raízes de algodão (FM 966) ao segundo dia de inoculação dos nematoides. As letras ‘A’ se referem a testemunha e ‘B’ ao tratamento com *Bacillus*. **A1**- seta apontando um J2 de coloração vermelha logo após penetração; **A2**- setas apontando um feixe de J2 no cilindro central da raiz; **B1**- juvenil de segundo estadio no interior da raiz e **B2**- setas indicando a presença de dois J2 logo após a penetração. **N** – Nematóide; **CO** - Córtex; **CC** – Cilindro Central.

No oitavo DAI já foi possível notar a formação das galhas, espessamento do calibre da raiz na altura da região de infecção, isso como consequência das atividades induzidas pelo parasita no interior da raiz, provocando desarranjo do cilindro central devido ao estabelecimento do seu sítio de alimentação com início da formação das células gigantes (Figura 4 A8).

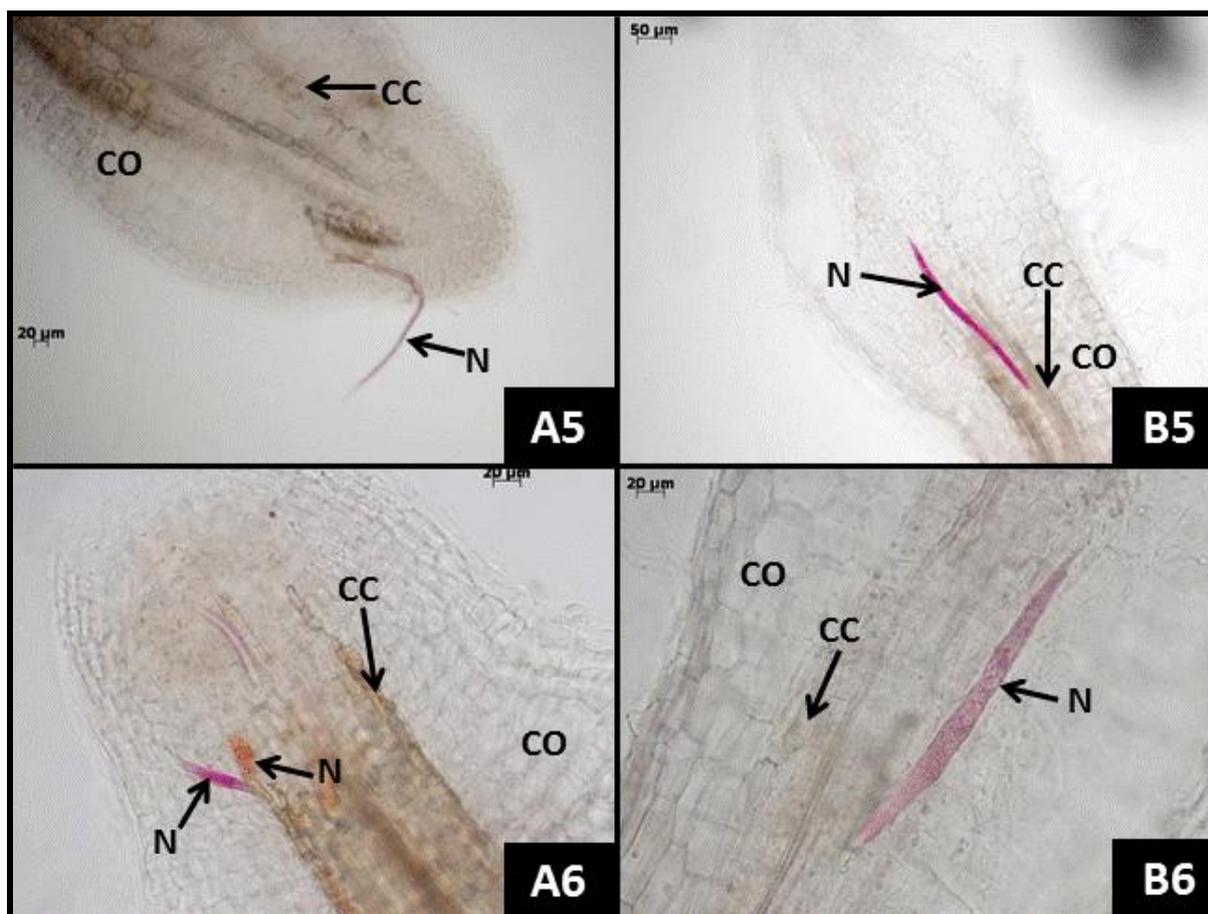


**FIGURA 2:** Raízes de algodão (FM 966) ao quarto dia de inoculação dos nematoides. As letras ‘A’ se referem a testemunha e ‘B’ ao tratamento com *Bacillus*. **A3-** seta apontando dois juvenis de segundo estadio logo após penetração; **A4-** setas apontando um feixe de J2 no interior da raiz; **B3-** J2 no interior da raiz logo após penetração e **B4-** seta indicando a presença de feixe de J2 no cilindro central da raiz. N – Nematóide; CO - Córtex; CC – Cilindro Central.

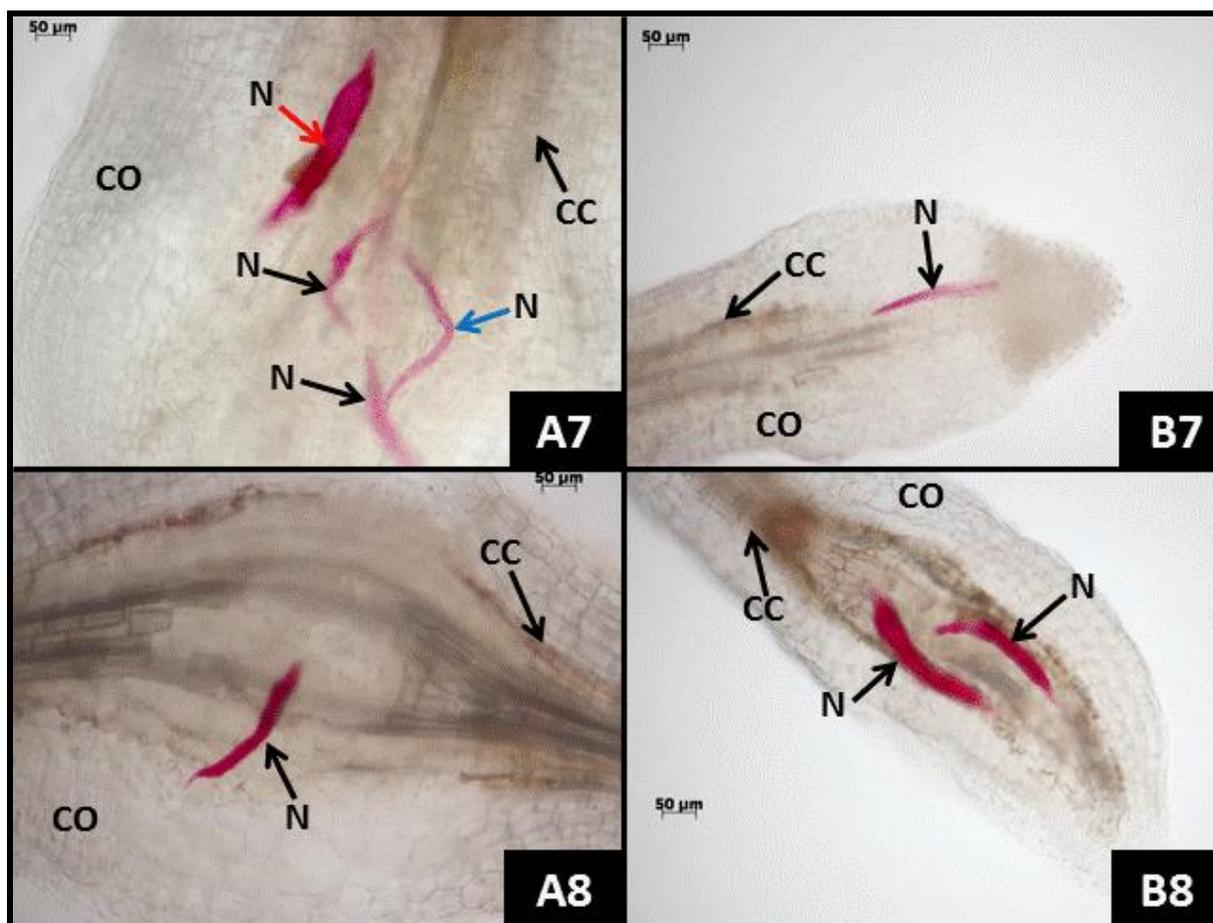
Esse acompanhamento a partir da utilização dessa metodologia com fuccina ácida possibilitou o acompanhamento da evolução da infecção até o 15º DAI onde iniciou o processo de lignificação dos tecidos radiculares em decorrência da sua maturação, dificultando a visualização e contagem dos nematoides, mas durante esse intervalo foi possível quantificar as penetrações de J2 constatando essa atividade até o 12º DAI nesse ensaio.

Apesar de ter havido uma proteção inicial com menor penetração de nematoides nas raízes tratadas com a bactéria, essa proteção não foi duradoura, pois só foi notada nos seis primeiros dias após a inoculação dos nematoides. A partir daí o processo se inverteu com

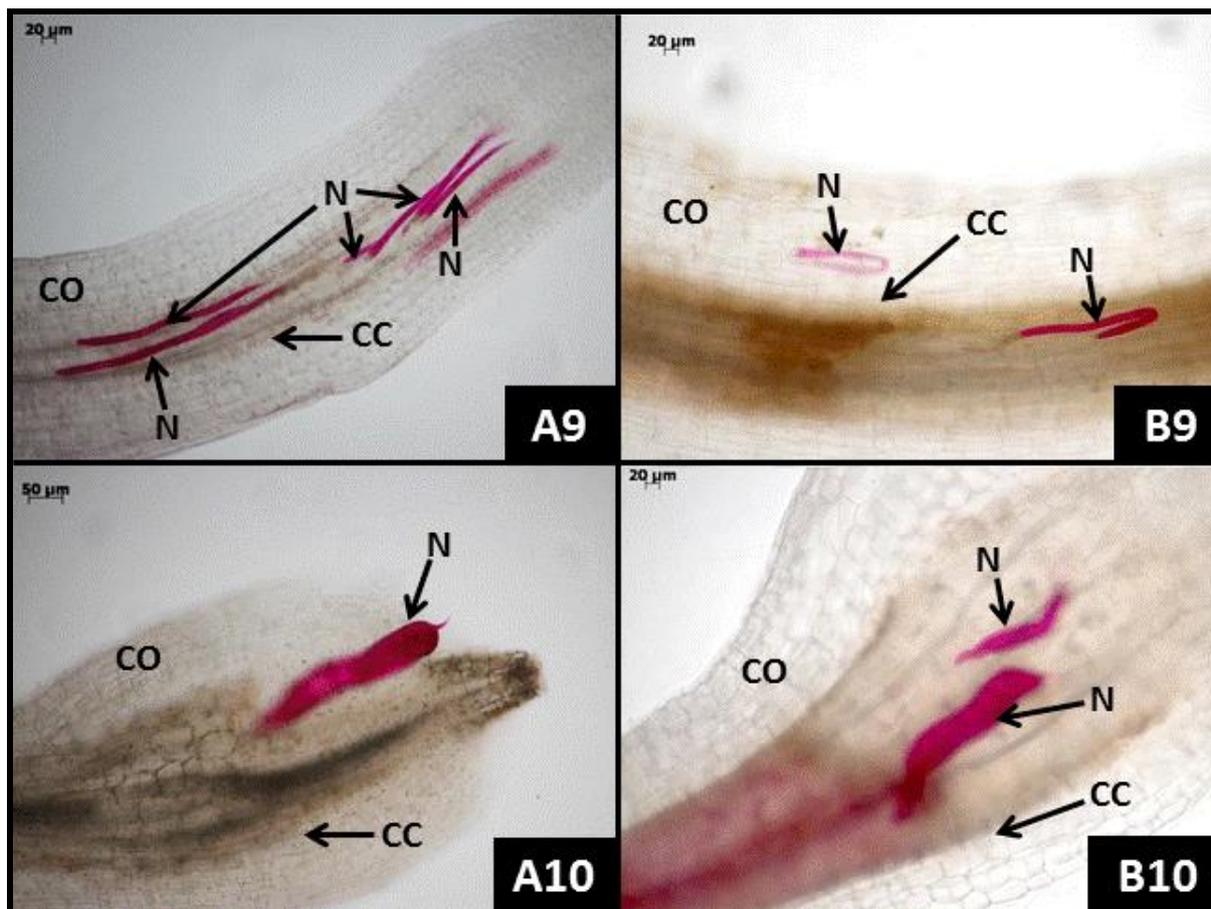
maior registro de entrada de J2 nas raízes tratadas (Tabela 13). Essa proteção pode não ter sido duradoura devido às condições de condução do experimento. O protocolo de condução das plantas para ensaio de histopatologia, prevê que as plantas sejam conduzidas em areia lavada autoclavada, como substrato, a fim de facilitar as lavagens posteriores das raízes para avaliação do experimento. A condução das plantas em substrato tão pobre pode ter comprometido o desenvolvimento das bactérias ‘antagônicas’, influenciado negativamente em seu desempenho, uma vez que a única fonte nutritiva disponível a esses organismos durante a condução do ensaio foram os exsudatos radiculares e segundo Jones (1998) esses exsudatos podem ser liberados em quantidades e composições diversas, a depender de fatores, como a espécie da planta, as condições de estresse às quais foram submetidas. Pilet *et al.* (1979), afirmam que o estágio de desenvolvimento da planta é também uma variante e Sandnes *et al.* (2005), afirmam ainda que o seu estado fisiológico também é fator determinante. A composição dos exsudatos liberados pelas plantas são capazes de influenciar a sua comunidade rizosférica (GRAYSTON *et al.*, 1998). Além do mais esses microrganismos podem apresentar algumas especificidades, inclusive em relação a cultivares de uma mesma espécie (CHANWAY *et al.*, 1988; SICILIANO *et al.*, 1998). Face ao exposto, essas variantes podem influenciar, de forma positiva ou negativa, no desenvolvimento bacteriano. Essa interferência quando negativa pode impedir o desenvolvimento satisfatório dessas bactérias na colonização da rizosfera, inviabilizando a manutenção de seu biofilme (STURZ & CHRISTIE, 2003). Além disso, solos arenosos, como utilizado neste ensaio, favorecem aos nematoides agravando seus danos (FREIRE, 2007). Esses fatores podem explicar o controle apenas inicial dos nematoides observados neste trabalho.



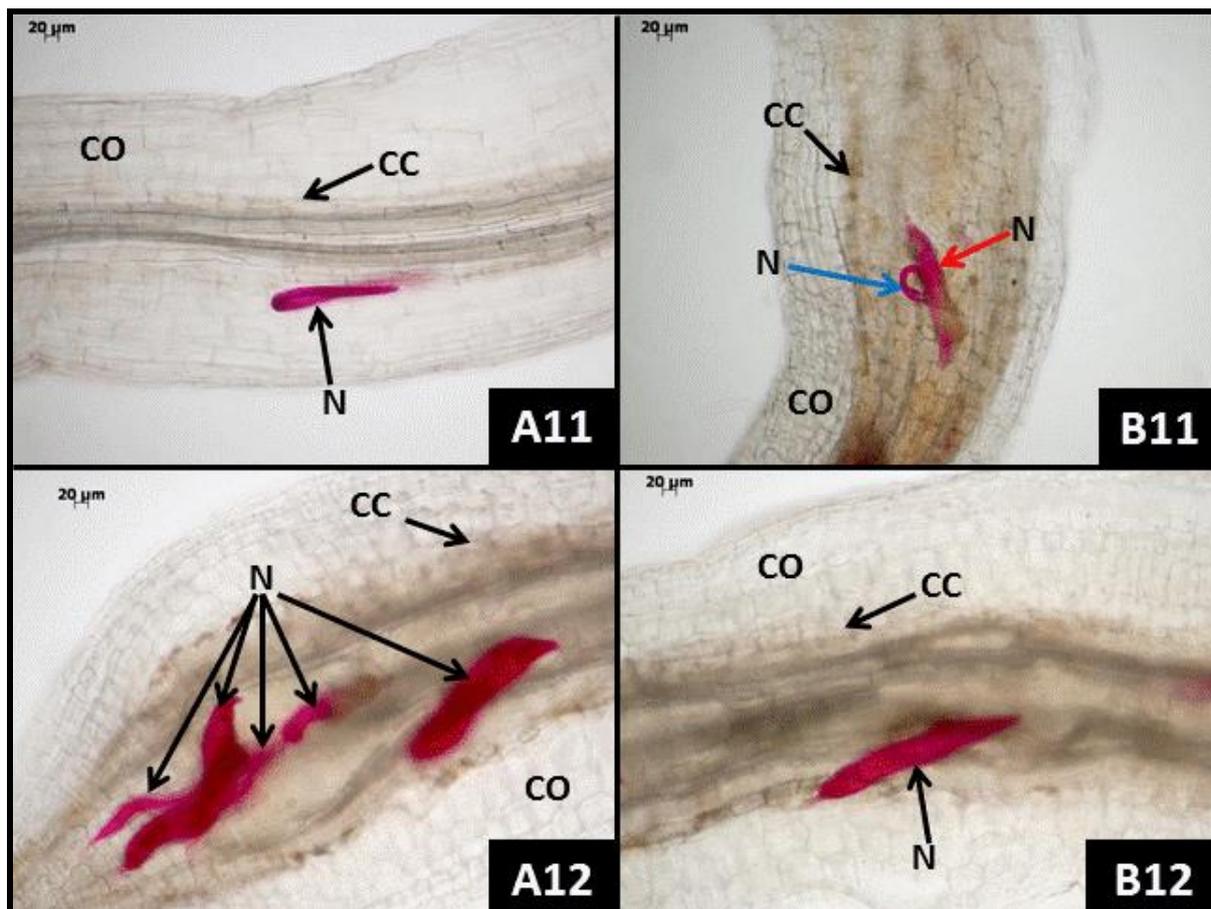
**FIGURA 3:** Raízes de algodão (FM 966) ao 6<sup>o</sup> dia após a inoculação. As letras ‘A’ se referem a testemunha e ‘B’ ao tratamento com *Bacillus*. **A5**- seta apontando J2 no momento da penetração na raiz; **A6**- setas apontando nematoide já em mudança na morfologia com formato mais salsichoide; **B5**- presença de J2 no interior da raiz e **B6**- seta indicando início de mudança de fase com espessamento da largura do nematoide. **N** – Nematóide; **CO** - Córtex; **CC** – Cilindro Central.



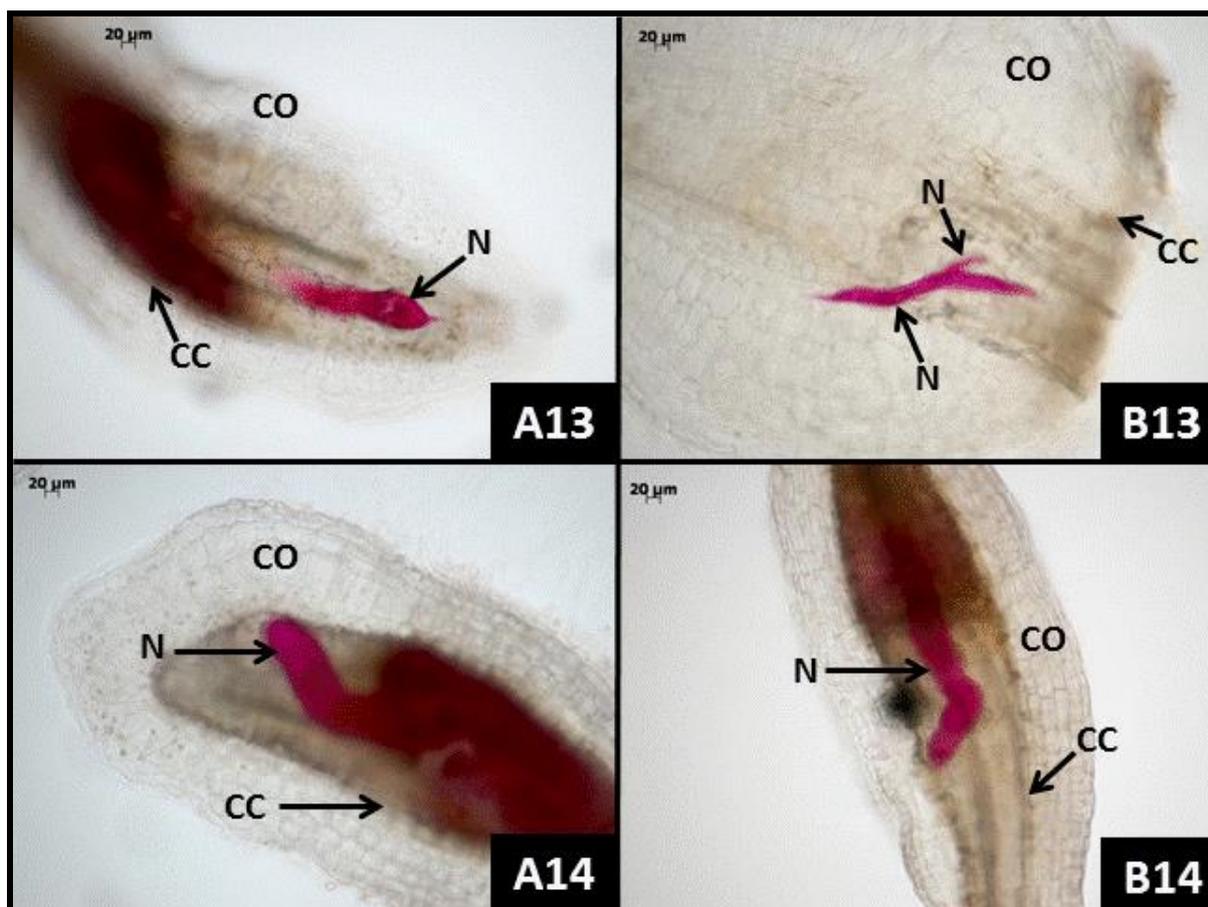
**FIGURA 4:** Raízes de algodão (FM 966) ao 8º dia após a inoculação. As letras ‘A’ se referem a testemunha e ‘B’ ao tratamento com *Bacillus*. **A7**- seta vermelha apontando juvenis em formato salsichoide e seta azul indicando um juvenil ainda em formato filiforme (J2); **A8**- setas apontando nematoide já em formato salsichoide. Pode-se notar ainda nesta imagem o desarranjo estrutural no cilindro central da raiz e espessamento da largura da raiz com início da formação da galha; **B7**- juvenil de segundo estadio logo após a penetração na raiz e **B8**- setas indicando nematoides em formato salsichoide (J3). **N** – Nematóide; **CO** - Córtex; **CC** – Cilindro Central.



**FIGURA 5:** Raízes de algodão (FM 966) ao 10<sup>o</sup> dia após a inoculação. As letras ‘A’ se referem a testemunha e ‘B’ ao tratamento com *Bacillus*. **A9**- feixes de J2 no cilindro central da raiz; **A10**- setas apontando nematoide já em formato salsichoide, provavelmente um J4. Pode-se notar ainda nesta imagem o início da formação da galha; **B9**- dois juvenis de segundo estadio no interior da raiz e **B10**- setas indicando nematoides em formato salsichoide (J3). N – Nematóide; CO - Córtex; CC – Cilindro Central.



**FIGURA 6:** Raízes de algodão (FM 966) ao 12<sup>o</sup> dia após a inoculação. As letras ‘A’ se referem a testemunha e ‘B’ ao tratamento com *Bacillus*. **A11**- seta apontando a presença de um J2 próximo ao cilindro central da raiz; **A12**- setas apontando vários nematoides formato salsichoide. Pode-se notar o espessamento da raiz com a formação da galha; **B11**- seta azul indicando a presença de um juvenil de segundo estágio, seta vermelha indicando um nematoide em formato salsichoide (J3) no interior da raiz e **B12**- seta indicando nematoides em formato salsichoide (J3). N – Nematóide; CO - Córtex; CC – Cilindro Central.



**FIGURA 7:** Raízes de algodão (FM 966) ao 15º dia após a inoculação onde já pode ser observado o início da lignificação representada pelas regiões escurecidas (marrons) presentes em (A13, A14 e B14). As letras ‘A’ se referem a testemunha e ‘B’ ao tratamento com *Bacillus*. **A13-** seta apontando a presença de um J4 na raiz; **A14-** seta apontando J3 com em seu sítio de alimentação no interior da raiz; **B13-** setas apontando nematoides em diferentes fases de desenvolvimento (J3) e **B14-** seta sinalizando J3 em seu sítio de infecção. **N** – Nematóide; **CO** - Córtex; **CC** – Cilindro Central.

### MÉTODO DE COLORAÇÃO COM AZUL DE TOLUIDINA

A confecção e avaliação de aproximadamente 16.000 cortes coloridos com azul de toluidina, em concordância com as avaliações realizadas com o método da fuccina ácida, também mostraram a capacidade de penetração, dos J2s de *M. incognita* raças 3 e 4, nas raízes das plantas de ambos tratamentos. Com essas observações microscópicas constatou-se a presença de alguns J2 e J3 na região do cilindro central da raiz; pode-se também observar um

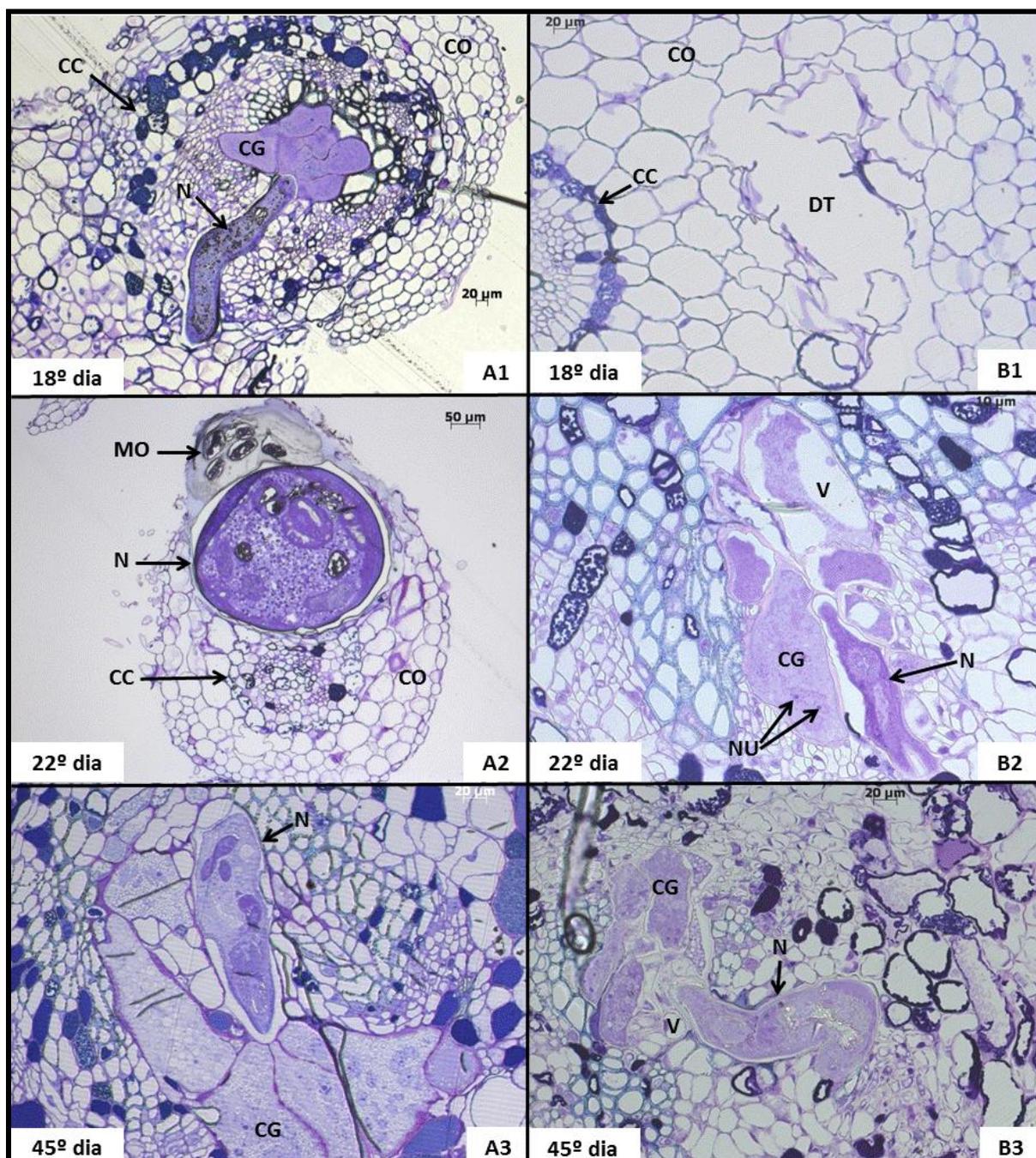
desarranjo estrutural nas células do córtex da raiz devido a movimentação do J2 (Figura 8 B1). A partir do 18º DAI foi possível observar células gigantes bem formadas no cilindro central das raízes da testemunha (Figura 8 A1). No 22º DAI já foi possível visualizar o início da formação de massas de ovos na testemunha com algumas posturas em seu interior. Além disso, o desenvolvimento da fêmea aliado ao início da postura causou danos mecânicos nos tecidos do parênquima vascular, acarretando rompimento do córtex da raiz com consequente exposição das massas de ovos no exterior das raízes (Figura 8 A2). Neste mesmo período ao analisarmos as imagens de cortes realizados com raízes de plantas tratadas é possível observar a presença de grandes vacúolos no interior de células gigantes, assim como, conteúdo pouco denso dessas células e a presença de parede celular mais delgada quando comparado a imagem da testemunha ao lado. Este fato com essas características apresentados no 22º DAI foi observado até o último dia de avaliação com presença de células gigantes com conteúdo bastante degradados com a presença de grandes vacúolos no seu interior além de apresentarem parede celular bastante delgada. É importante enfatizar que esses fenômenos não foram observados para todos os sítios de infecção analisados, mas foram sim exclusivos dos tratamentos com bactéria, isto é, as plantas testemunhas (sem bactéria) não apresentaram tais sinais (Figura 8).

Para as plantas de algodão tratadas, houve um atraso na penetração e desenvolvimento do J2 em relação a testemunha. Isso demonstra que houve uma proteção inicial das raízes para as plantas tratadas e uma provável resistência pós-infeccional, bloqueando ou dificultando o desenvolvimento dos nematoides após a penetração. Apesar da penetração ter sido semelhante entre os dois tratamentos, aparentemente, os J2 que penetraram nas raízes das plantas com tratamento (bactéria), em alguns sítios, não conseguiram se desenvolver normalmente.

Respostas de penetração e reações de hipersensibilidade semelhantes às descritas neste trabalho são observadas em estudos envolvendo variedades de plantas resistentes a

nematoides (McCLURE *et al.*, 1974; HUANG, 1986; CARNEIRO *et al.*, 2005; WUBBEN *et al.*, 2008; MOTA *et al.*, 2013; CABASAN *et al.* 2014; MHATRE *et al.* 2015).

Apesar de a variedade de algodão (FM 966), empregada para a realização desse trabalho, ser suscetível ao nematoide (*M. incognita* raças 3 e 4), é possível que a bactéria utilizada no tratamento tenha induzido algum tipo de resistência nas plantas, uma vez que já é descrita indução de resistência em plantas mediada por este gênero de bactéria (DIAS-ARIEIRA *et al.*, 2013). Hasky-Gunther *et al.* (1998), utilizando a metodologia da ‘raiz dividida’ conseguiram uma redução na reprodução de nematoides em até 58% no lado das raízes onde não foi aplicado a bactéria. Isso sugere a ocorrência de indução de resistência sistêmica mediada por *Bacillus sphaericus*. Utilizando a mesma metodologia descrita anteriormente, Siddiqui & Shaukat (2002), obtiveram redução de até 42% da população de *M. arenaria* mediada por *Pseudomonas aeruginosa* em tomateiro. Também Fabry *et al.* (2007), conseguiram uma redução em número de ovos de *M. javanica* em tomateiro de 38,8%, utilizando para tal, *Rhizobium etli* como agente de controle biológico, seguindo a mesma metodologia da raiz dividida utilizada nos ensaios anteriores. Estes trabalhos reforçam a possibilidade de indução da resistência de plantas a nematoides mediada por bactérias.



**FIGURA 8:** Secções de raízes de algodão (FM 966) coradas com azul de toluidina. As letras ‘A’ se referem a testemunha e ‘B’ ao tratamento com *Bacillus*. **A1**- secção confeccionada ao 18º DAI indicando nematoide saucichoide e células gigantes já formadas no interior do cilindro central da raiz; **A2**- secção de raiz ao 22º DAI mostrando fêmea de *M. incognita* adulta em início de postura e com massa de ovos também no início de formação; **A3**- secção de raiz ao 45º DAI apresentando nematoide e células gigantes bem formadas; **B1**- corte de raiz tratada apresentando região com tecido desestruturado; **B2**- secção de raiz com nematoide mal formado e células gigantes apresentando inúmeros vacúolos e início de degeneração e **B3**- corte de raiz corada com azul de toluidina ao 45º DAI com nematoide imaturo e sitio de alimentação mau formado com suas células gigantes apresentando grandes vacúolos. **CC** – Cilindro Central; **CG** – Célula Gigante; **CO** – Córtex; **DT** – Desestruturação dos Tecidos; **MO** – Massa de Ovos; **N** – Nematóide; **NU** – Nucléolo; **V** - Vacúolo.

## 6. CONCLUSÕES

- Bactérias do gênero *Bacillus* podem promover o crescimento de plantas de algodão;
- O formulado comercial que produziu melhores resultados em termos de promoção de crescimento de plantas, assim como de redução em aproximadamente 50% do fator de reprodução do *M. incognita* foi Onix, produto este que possui o *B. methylotrophicus* como princípio ativo;
- O nematicida Furadan causou redução no crescimento das plantas tratadas assim como aumento no fator de reprodução dos nematoides nas condições em que foram conduzidos os ensaios;
- O produto biológico comercial Onix, testado nos ensaios de histopatologia, promoveu uma proteção inicial das raízes de algodão com menor penetração dos J2 nos seis primeiros DAI;
- A utilização do Onix em tratamento de semente no ensaio de histopatologia não impediu que o nematoide completasse seu ciclo, mas para alguns pontos observados houve desenvolvimento anormal de sítio de infecção, com formação de células gigantes apresentando parede celular muito delgada e grandes vacúolos em seu citoplasma, além de provável atraso no ciclo do nematoide;
- As reações/fenômenos observados no ensaio de histopatologia podem indicar a indução de resistência das plantas mediada pelas bactérias estudadas. Isso sugere mais estudos nessa área para melhor compreensão dessa interação.

## 7. LITERATURA CITADA

- ABRAPA – Associação Brasileira dos Produtores de Algodão. Relatório de Gestão da Abrapa Bienio 2013 – 2014. Disponível na internet: [www.abrapa.com.br/Documents/relatorio\\_gestao-13-14.pdf](http://www.abrapa.com.br/Documents/relatorio_gestao-13-14.pdf). Consultado em: 12 jul 2015.
- ARAÚJO, F.F. 2008. Inoculação de sementes com *Bacillus subtilis*, formulado com farinha de ostras e desenvolvimento de milho, soja e algodão. *Ciência e Agrotecnologia*, 32(2): 456-462.
- ARAÚJO, F.F. & MARCHESI, G.V.P. 2009. Uso de *Bacillus subtilis* no controle de meloidoginose e na promoção de crescimento de tomateiro. *Ciência Rural*, 39: 1558-1561.
- ASMUS, G.L.; INOMOTO, M.M.; SILVA, R.A. & GALBIERI, R. 2015. Manejo de nematoides. In: FREIRE, E.F. 2015. Algodão no cerrado do Brasil. Brasília: Associação Brasileira dos Produtores de Algodão. Gráfica e Editora Positiva. Brasília.
- BELTRÃO, N.E.M. 1999. O agronegócio do algodão no Brasil. Brasília: Embrapa CTT/EMBRAPA-CNPA, 2: 55.
- BYRD, D.W.; KIRKPATRICK, T. & BARKER, K.R. 1983. An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. *Journal of Nematology*, 15: 142-143.
- CABASAN, M.T.N.; KUMAR, A.; BELLAFFIORE S. & DEWAELE, D. 2014. Histopathology of the rice root-knot nematode, *Meloidogyne graminicola*, on *Oryza sativa* and *O. glaberrima*. *Nematology*, 16(1): 73-81.
- CAMPOS, H.D.; CAMPOS, V.P. & POZZA, E.A. 2006. Efeito do tempo, substrato e temperatura na penetração de juvenis do segundo estadio de *Meloidogyne javanica* e *Heterodera glycines* em soja. *Summa Phytopathologica*, 32(2): 156-160.
- CARNEIRO, R.G.; ANTONIO, H.; BRITO, J.A. & ALTEIA, A.A.K. 1990. Identificação de espécies e raças fisiológicas de *Meloidogyne incognita* na região noroeste do estado do

- Paraná: resultados preliminares. In: Congresso Brasileiro de Nematologia, XIV, Londrina. Resumos, 4 p.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; NEVES, D.I.; FALCÃO, R.; PAES, N.S.; CIA, E. & SÁ, M.F.G. 2005. Resistencia de genótipos de algodoeiro a *Meloidogyne incognita* raça 3: reprodução e histopatologia. *Nematologia Brasileira*, 29(1): 1-10.
- CHANWAY, C.P.; NELSON, L.M. & HOLL, F.B. 1988. Cultivar-specific growth promotion of spring wheat (*Triticum aestivum* L.) by coexistent *Bacillus* species. *Canadian Journal of Microbiology*, 34: 925-929.
- CIA, E.; FUZATTO, M.G; PIZZINATTO, M.A.; PETTINELLI JÚNIOR, A.; PAULO, E.M.; ZIMBACK, L.; SILVA, M.A.; BORTOLETTO, N & VASCONCELOS, A.S.A. 1999. Comportamento de novas cultivares e linhagens na presença de doenças que ocorrem na cotonicultura da região meridional do Brasil. In: II Congresso Brasileiro de Algodão, Ribeirão Preto. Anais. EMBRAPA/CNPA. p. 441-443.
- CLEMENTE, J.M.; CARDOSO, C.R.; VIEIRA, B.S.; FLOR, I.M. & COSTA, R.L. 2016. Use of *Bacillus* spp. as growth promoter in carrot crop. *African Journal of Agricultural Research*, 11(35): 3355-3359.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). Acompanhamento da safra brasileira de grãos quarto levantamento - 01/2016. Disponível em: [http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16\\_01\\_12\\_14\\_17\\_16\\_boletim\\_graos\\_janeiro\\_2016.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_01_12_14_17_16_boletim_graos_janeiro_2016.pdf). Acesso em: 03 de fevereiro de 2016.
- DIAS-ARIEIRA, C.R.; SANTANA-GOMES, S.M.; PUERARI, H.H.; FONTANA, L.F.; RIBEIRO, L.M. & MATTEI, D. 2013. Induced resistance in the nematodes control. *African Journal of Agricultural Research*. 8(20): 2312-2318.
- EVANS, A.A.F. & PERRY, R.N. 2009. Survival Mechanisms. In. PERRY, R.N.; MOENS, M. & STARR, J.L. 2009. Root-knot Nematodes. CAB International, Wallingford, UK and Cambridge, USA. p. 201-222.

- FABRY, C.F.S.; FREITAS, L.G.; GODINHO, M.M.; NEVES, W.S. & FERRAZ, S. 2007. Resistência sistêmica a *Meloidogyne javanica* induzida por *Rhizobium etli* G12. *Nematologia Brasileira*, 31: 5-9.
- FAO . “The State of Food and Agriculture 2015: Social protection and agriculture: breaking the cycle of rural poverty”, FAO, Rome, <http://www.fao.org/3/a-i4910e.pdf>.
- FERNANDES, R.H.; LOPES, E.A.; VIEIRA, B.S. & BONTEMPO, A.F. 2013. Controle de *Meloidogyne javanica* na Cultura do Feijoeiro com Isolados de *Bacillus* spp. *Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas*, 7: 76-81.
- FLEGG, J.J.M. 1967. Extraction of *Xiphinema* and *Longidorus* species from soil by a modification of Cobb’s decanting and sieving technique. *Annual Applied Biology*, 60: 429-437.
- FREIRE, E.F. 2007. Algodão no cerrado do Brasil. Associação Brasileira dos Produtores de Algodão. Gráfica e Editora Positiva. Brasília.
- FREIRE, E.F. 2015. Algodão no cerrado do Brasil. Brasília: Associação Brasileira dos Produtores de Algodão. Gráfica e Editora Positiva. Brasília.
- FREITAS, S.S.; MELO, A.M.T. & DONZELI, V.P. 2003. Promoção do crescimento de alface por rizobactérias. *Revista Brasileira de Ciências do Solo*, 27: 61-70.
- GOSWAMI, D., DHANDHUKIA, P.; PATEL, P. & THAKKER, J.N. 2014. Screening of PGPR from saline desert of Kutch: Growth promotion in *Arachis hypogea* by *Bacillus licheniformis* A2. *Microbiological Research*, 169: 66-75.
- GRAYSTON, S.J.; WANG, S.; CAMPBELL, C.D. & EDWARDS, A.C. 1998. Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biology & Biochemistry*, 30: 369-378.

- HASKY-GÜNTHER, K.; HOFFMANN-HERGARTEN, S.; RICHARD, A. & SIKORA, R.A. 1998. Resistance against the potato cyst nematode *Globodera pallida* systemically induced by the rhizobacteria *Agrobacterium radiobacter* (G12) and *Bacillus sphaericus* (B43). *Fundamental & Applied Nematology*, 21: 511-517.
- HEIDARZADEHA, N. & BAGHAEI-RAVARI, S. 2015. Application of *Bacillus pumilus* as a potential biocontrol agent of Fusarium wilt of tomato. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 48: 841-849.
- HUANG, C.S.; DELLA VECCHIA, P.T. & FERREIRA, P.E. 1986. Varietal response and estimates of heritability of resistance to *Meloidogyne javanica* in carrots. *Journal of Nematology*, 34: 28-33.
- HUSSEY, R.S. & BARKER, K.R. 1973. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. *Plant Disease Reporter*, 57: 1025-1028.
- JEFFERS, D.P. & ROBERTS, P.A. 1993. Effect of plant date and host genotype on the root-knot-*Fusarium* wilt disease complex of cotton. *Phytopathology*, 83: 645-654.
- JENKINS, W.R. 1964. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant Disease Reporter*, 48: 692.
- JONES, D.L. 1998. Organic acids in the rhizosphere-a critical review. *Plant and Soil*, 205: 25-44.
- JORGENSEN, E.C. 1978. Granular nematicides as adjuncts to fumigants for control of cotton root-knot nematodes. *Journal of Nematology*, 11(2): 144-150.
- LÓPEZ-VALDEZ, F.; FERNÁNDEZ-LUQUENO, F.; CEBALLOS-RAMÍREZ, J.M.; MARSCH, R.; OLALDE-PORTUGAL, V. & DENDOOVEN, L. 2011. A strain of *Bacillus subtilis* stimulates sunflower growth (*Helianthus annuus* L.) temporarily. *Scientia Horticulturae*, 128(4): 499-505.

- LORDELLO, R.R.A.; LORDELO, A.I.L.; CIA, E. & FUZZATO, M.G. 1984. Avaliação da resistência de algodoeiro a nematoides de galhas. In: Congresso Paulista de Fitopatologia, VII, Botucatu. Resumos, 19 p.
- LUZ, W.C. 1996. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas e bioproteção. Revisão Anual de Patologia de Plantas, 4: 1-49.
- KHIYAMI, M.A.; OMAR, M.R.; KAMEL AHMED ABD-ELSALAM, K.A. & ALY, A.A.E. 2014. *Bacillus*-based biological control of cotton seedling disease complex. Journal of Plant Protection Research, 54(4): 340-348.
- KIMATI, H. 2011. Controle químico. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M. & BERGAMIN FILHO, A. Manual de Fitopatologia. Piracicaba: Agronômica Ceres. 1(4): 343-365.
- McCLURE, M.A.; ELLIS, K.C. & NIGH, E.L. 1974. Post-infection development and histopathology of *M. incognita* in resistant cotton. Journal of Nematology, 1: 21-26.
- MHATRE, P.H.; PANKAJ; MALIK, S.K.; KAUR, S.; SINGH, A.K.; MOHAN, S. & SIROHI, A. 2015. Histopathological changes and evaluation of resistance in Asian rice (*Oryza sativa* L.) against rice root-knot nematode, *Meloidogyne graminicola* Golden & Birch. Indian Journal of Genetics 75(1): 41-48.
- MOTA, F.C.; ALVES, G.C.S.; GIBAND, M.; GOMES, A.C.M.M.; SOUZA, F.R.; MATTOS, V.S.; BARBOSA, V.H.S.; BARBOSO, P.A.V.; NICOLE, M.; PEIXOTO, J.R.; ROCHA, M.R. & CARNEIRO, R.M.D.G. 2013. New sources of resistance to *Meloidogyne incognita* race 3 in wild cotton accessions and histological characterization of the defence mechanisms. Plant Pathology, 62: 1173-1183.
- PERGARD, A.; BRIZZARD, G.; FAZARI, A.; SOUCAZE, O.; ABAD, P. & DJAN-CAPAROLINO, C. 2005. Histopathological Characterization of resistance to different root-knot nematode species related to phenolics accumulation in *Capsicum annuum*. Phytopathology, 95(2): 158-165.

- PETRAS, S.F. & CASIDA, L.E.J. 1985. Survival of *Bacillus thuringiensis* spores in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 50: 1496-1501.
- PILET, P.E.; ELLIOTT, M.C. & MOLONEY, M.M. 1979. Endogenous and exogenous auxin in the control of root growth. *Planta*, 146: 405-408.
- RUANO, O.; CARNEIRO, R.G. BRITO, JÁ; SILVA, J.F. & JULIATTI, F.C. 1997. Algodão (*Gossypium hirsutum*) – Doenças causadas por nematoides. In: VALE, F.X.R.; ZAMBOLIM, L. (Ed) Controle de doenças de plantas – grandes culturas. Viçosa: Departamento de Fitopatologia 2: 583-603.
- SANDNES, A.; ELDHUSET, T.D. & WOLLEBÆK, G. 2005. Organic acids in root exudates and soil solution of Norway spruce and silver birch. *Soil Biology & Biochemistry*, 37: 259-269.
- SCHIPPERS, B.; BAKKER, A.W. & BAKKER, P.A.H.M. 1987. Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. *Annual Review of Phytopathology*, 25: 339-358.
- SCHMITT, D.P.; CORBIN, F.T. & NELSON, L.A. 1983. Population dynamics of *Heterodera glycines* and soybean response in soils treated with selected nematicides and herbicides. *Journal of Nematology*, 15: 432-47.
- SICILIANO, S.D.; THEORET, C.M.; DE FREITAS, J.R.; HUCL, P.J. & GERMIDA, J.J. 1998. Differences in the microbial communities associated with the roots of different cultivars of canola and wheat. *Canadian Journal Microbiology*, 44: 844-851.
- SIDDIQUI, I.A. & SHAUKAT, S.S. 2002. Rhizobacteria-mediated induction of systemic resistance (ISR) in tomato against *Meloidogyne javanica*. *Journal of Phytopathology*, 150: 469-473.

- SILVA, F.A. & AZEVEDO, C.A.V. 2016. ASSISTAT. Software Assistência Estatística. Disponível em: <http://www.assistat.com/indexp.html>. Acesso em: 12 mar. 2016.
- SILVA, N.M.; FUZATTO, M.G.; KONDO, J.L.; SABINO, J.C.; PETTINELLI JUNIOR, A. & GALLO, P.B. 1997. A adubação nitrogenada e o sintoma de nematoides no algodoeiro. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 21(4): 693-697.
- SIPES, B.S. & SCHMIT, D.P. 1998. Nematodes- pesticide interactions. 1998. In: BARTELS, J.M.; HATFIELD, J.M.; BAENZIGER, P.S & BIGHAM, J.M. Plant and nematode interactions. *Agronomy Monograph*, 36:173-186.
- STURZ, A.V. & CHRISTIE, B.R. 2003. Beneficial microbial allelopathies in the root zone: the management of soil quality and plant disease with rhizobacteria. *Soil & Tillage Research*, 72: 107-123.
- SUASSUNA, N.D.; CHITARRA, L.G.; ASMUS, G.L. & INOMOTO, M.M. 2006. Manejo de Doenças do Algodoeiro. EMBRAPA, Campina Grande (PB), p. 1- 24. (Circular Técnica 97).
- SWAIN, M.R. & RAY, R.C. 2009. Biocontrol and other beneficial activities of *Bacillus subtilis* isolated from cow dung microflora. *Microbiological Research*, 164(2): 121-130.
- VAZ, M.V.; CANEDO, E.J.; MACHADO, J.C.; VIEIRA, B.S. & LOPES, E.A. 2011. Controle biológico de *Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne incognita* com *Bacillus subtilis*. *Perquirere*, 8: 203-212.
- WUBBEN, M.J.; CALLAHAN, F.E.; HAYES, R.W. & JENKINS, J.N. 2008. Molecular characterization and temporal expression. Analyses indicate that the MIC (*Meloidogyne* induced cotton) gene Family representes a novel group of root-specific defense-related genes in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) *Planta*, 228: 111-123.

XIE, S.S.; WU, H.J.; ZANG, H.Y.; WU, L.M.; ZHU, Q.Q. & GAO, X.W. 2014. Plant growth promotion by spermidine-producing *Bacillus subtilis* OKB105. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 27: 655-663.

# CAPÍTULO 4

---

## SELEÇÃO DE ESTIRPES DE *Bacillus* sp. CONTRA *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*

### 1. RESUMO

A murcha caudada por *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* em algodoeiro é uma das principais doenças da cultura do algodão. O patógeno é de difícil controle, possuindo alta persistência no solo devido a sua capacidade de parasitar outras culturas, ser saprófita e capaz de produzir clamidósporos, o que permite a este, sobreviver no solo por longos períodos sem a presença do seu hospedeiro principal. Atualmente no controle desta doença se usa variedades com alguma resistência, sementes certificadas e fungicidas no tratamento de sementes. Assim, justifica-se o desenvolvimento de alternativas de controle aumentando assim, o número de recursos para o manejo dessa doença no campo. O controle biológico desponta como alternativa de controle. Bactérias do gênero *Bacillus* são bioreguladoras e antagonistas de vários fitopatógenos. Portanto, o objetivo deste trabalho foi o de selecionar estirpes de *Bacillus* tóxicas a *F. oxysporum* além de ajustar metodologias *in vitro* para a realização e avaliação dos testes de seleção. Com este trabalho foi possível determinar qual o melhor meio de cultura para os ensaios de confronto direto, propor uma escala de notas para facilitar as decisões de seleção com os testes de pareado, identificar dentre as estirpes selecionadas nos ensaios de confronto as que possuem a capacidade de produzir metabólitos voláteis e não voláteis tóxicos a *F. oxysporum* e testar estas estirpes selecionadas para o controle da doença durante a germinação das sementes em ensaios em casa de vegetação. Com este último teste foi possível notar um potencial efeito protetor de algumas estirpes de *Bacillus* durante a germinação das sementes de algodão.

**Palavra-chave:** Antagonismo, controle biológico, metabólitos-não-voláteis, metabólitos-voláteis, murcha de fusário, PGPRs, tratamento de semente.

## SELECTION OF *Bacillus* sp. STRAINS AGAINST *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum*

### 2. ABSTRACT

Fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* on cotton is considered a major disease of this crop. The pathogen is difficult to control, having high persistence in the soil due to its capacity to parasitize other crops, being saprophyte and able to produce chlamydospores which enable it to survive in the soil for long time without presence of the main host. The control of this pathogen is based on the use of varieties with some degree of resistance, use of certified seed and the use of fungicides for seed treatment. Once detected in the field, plant protection is based on the use of chemicals. In this context, it is justified the development of alternatives for the management of this pathogen in the field. Biological control stands out as a viable alternative for the control of this pathogen. *Bacillus* are known bioregulators and natural antagonists of various pathogens. Thus, the objective of this study was to select toxic strains of *Bacillus* to *F. oxysporum* and adjust a *in vitro* method for implementation and evaluation of the tests for selection. It was possible to determine the best culture medium for direct confrontation test, proposing a grading scale to facilitate the selection of the best strain with the paired test, identified among the strains selected in the confrontation assays, those that can produce volatile metabolites and non-volatile metabolites toxic to *F. oxysporum* and test these selected strains to the control of the disease during seed germination in greenhouse assays. With this last assay, it was noted a potential protective effect of some *Bacillus* strains during cotton seed germination.

**Key words:** antagonism, biological control, volatile metabolites, non-volatile metabolites, PGPR, seed treatment.

### 3. INTRODUÇÃO

O Brasil é o quinto maior produtor mundial de algodão com áreas de produção presentes em 15 Estados, mas, 85% da área plantada concentra-se nos estados de Mato Grosso e Bahia (LUNARDON, 2007; CONAB, 2015). Esse importante setor agrícola nacional, passou por importantes transformações nos últimos 20 anos e se configura hoje como um dos mais modernos da agricultura (BORÉM & FREIRE, 2014). O setor movimentou grande capital financeiro, empregando muitas pessoas e gerando divisas para o País. Portanto, é considerado um dos ramos da agricultura de maior importância econômica e social para o Brasil, exigindo cada vez mais investimentos em tecnologia. Nos últimos anos houve aumento em produtividade da cultura em razão dos avanços genéticos e melhorias do sistema de produção, mas essa produtividade não é ainda maior devido a ocorrência de pragas e doenças que acometem a cultura. Neste sentido, merece destaque o patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, que é altamente agressivo e possui potencial de causar grandes perdas de produtividade em áreas infestadas quando em condições favoráveis (BRADBURY, 1986; GOTO, 1990; DAVIS *et al.*, 1996, 2006; IAMAMOTO, 2005; CIA & SALGADO, 2005; AMORIM *et al.*, 2011).

A murcha-de-fusarium ou fusariose, é a principal doença do algodoeiro de ciclo anual e já se encontra disseminada em todas as regiões produtoras de algodão no mundo causando consideráveis perdas de produção. O primeiro relato desse patógeno causando danos à cotonicultura foi registrado em 1892 no Alabama, Estados Unidos (ATKINSON, 1892 citado por DAVIS *et al.*, 2006). No Brasil, seu primeiro relato ocorreu no município de Alagoinha, estado da Paraíba, em meados da década de 1930 (VEIGAS, 1935; KRUG, 1936). Já no final da década de 1950 a doença já se encontrava disseminada nas regiões produtoras do estado de São Paulo, onde foi responsável pela fase de decadência da cotonicultura paulista (CIA, 1977).

A doença é causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, que é uma espécie heteromórfica (KATAN & KATAN, 1988; KIM *et al.*, 1993; LORI *et al.*, 2004). Todas as espécies de algodão cultivadas são hospedeiras do fungo, mas pode haver variações quanto a patogenicidade, dependendo da cultivar em uso. Ao contrário da maioria das formas especializadas, essa pode apresentar outros hospedeiros alternativos, tais como espécies pertencentes às famílias Malvaceae, Solanaceae e Leguminosae (ARMSTRONG & ARMSTRONG, 1978; ASSIGBETSE *et al.*, 1994). Davis *et al.* (2006) relataram a ocorrência de oito raças desse patógeno no mundo e no Brasil apenas a raça seis deste patógeno foi relatada até o momento (ARMSTRONG & ARMSTRONG, 1978).

Ainda não existem cultivares imunes a murcha-de-fusarium, o que dificulta o seu controle. Entretanto, algumas medidas são de importância para se manejar esse patógeno no campo, como a de rotação de culturas e a adoção do princípio de exclusão, evitando a entrada do patógeno em áreas não contaminadas. Neste contexto, a utilização de sementes livres do patógeno (certificadas), assim como o tratamento químico de sementes são fundamentais para que se tenha sucesso no manejo (BELTRÃO, 1999; CIA *et al.*, 1999).

Constantemente, o controle químico de doenças de plantas é a única medida eficiente e viável para garantir as altas produtividades e qualidade de produção quando o patógeno já se encontra instalado no campo de produção. Variedades de plantas interessantes pelo bom desempenho agrônomo e pela preferência dos consumidores, geralmente aliam certa vulnerabilidade a agentes fitopatogênicos e a cultura do algodão não foge muito dessa realidade. Visto isso, o uso de produtos químicos sistêmicos ou de contato para controle de pragas (controle químico) é muito utilizado nessa cultura. Essa intervenção é realizada principalmente antes das plantas chegarem ao campo (tratamento de sementes), seguida por aplicações sucessivas com vários outros produtos e pode elevar em muito os custos de produção, devido ao grande volume de defensivos utilizados e aos altos preços desses

produtos. Assim, a necessidade de se encontrar alternativas economicamente mais vantajosas para o agricultor e menos agressivas ao meio ambiente torna-se uma realidade.

Dessa forma, uma das alternativas viáveis para resolver esse impasse é a busca por insumos agrícolas não poluentes. Nesse contexto, o controle biológico tem sido apontado como um método seguro para o manejo das doenças das plantas cultivadas (PUNJA & UTKHEDE, 2003), apresentando inúmeras vantagens em relação ao controle químico, pois com o uso de antagonistas (fungos, vírus, bactérias e outros) o controle biológico se mostra de fácil aplicação, tendo menor custo e não sendo danoso ao meio ambiente e ao homem (SOARES & SANTOS, 2006).

Dentre os inúmeros inimigos naturais identificados como agentes de controle biológico destaca-se uma ampla gama de bactérias da rizosfera com efeito antagônico a fitopatógenos (STURZ & NOWAK, 2000; TIAN *et al.*, 2007; MACHADO *et al.*, 2012). Estas bactérias possuem capacidade de sobrevivência na rizosfera, colonizando as raízes das plantas conferindo a elas, vários benefícios tais como: promoção de crescimento, disponibilização de nutrientes e hormônios vegetais, proteção contra patógenos e maior resistência a seca. Tais bactérias são também conhecidas como Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (RPCPs) (SCHROTH & HANCOCK 1982; STIRLING, 1991; SIDDIQUI & MAHMOOD, 1999).

As RPCPs podem atuar como agentes de controle biológico principalmente pela produção de substâncias bactericidas, fungicidas ou micostáticas inibindo o crescimento e o desenvolvimento dos agentes patogênicos (LUZ, 1996), pela produção de antibióticos, toxinas e enzimas, interferindo no processo de reconhecimento planta-hospedeiro, induzindo resistência e/ou proporcionando o desenvolvimento saudável da planta (MANKAU, 1980; STIRLING, 1991; SIDDIQUI & MAHMOOD, 1999; TIAN *et al.*, 2007). Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo selecionar, a partir dos materiais depositados na Coleção

de Bactérias Entomopatogênicas da EMBRAPA – CENARGEN, estirpes de *Bacillus* spp. tóxicas a *F. oxysporum* a partir de testes em condições de laboratório e em casa de vegetação.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. SELEÇÃO DE ESTIRPES DE *Bacillus* CONTRA *Fusarium oxysporum* f. *sp. vasinfectum*

#### 4.1.1. SELEÇÃO DE MEIO DE CULTURA PARA TESTES COM *Fusarium oxysporum*

*Fusarium oxysporum* f. *sp. vasinfectum* desenvolve-se adequadamente em Batata Dextrose Ágar (BDA). Todavia, esses testes tinham como objetivo não prejudicar os candidatos a agente de controle biológico em detrimento do patógeno que se pretendia controlar. Portanto, visto que, as bactérias que estavam sendo testadas não estavam respondendo muito bem ao BDA apresentando crescimento muito reduzido quando comparado a testemunhas da mesma estirpe crescidas no Meio Embrapa (ME), reconhecidamente eficiente ao cultivo de *Bacillus*. Vários são os trabalhos disponíveis na literatura que usaram o meio BDA como substrato no cultivo desses diferentes organismos. Com base nessas análises, buscou-se um meio de cultura que fosse favorável aos potenciais antagonistas sem, no entanto, prejudicar o patógeno, de modo que houvesse um equilíbrio próximo ao ideal para ambos.

Como já observado, o meio BDA, definitivamente não era o ideal para o crescimento das bactérias, visto que, poderia comprometer o seu desenvolvimento normal prejudicando o seu potencial competitivo com redução na produção de compostos secundários o que poderia mascarar o potencial dessas estirpes.

Para tanto, nesse trabalho foram testadas diferentes combinações dos meios de cultura utilizados no cultivo de ambos os microrganismos. As proporções testadas foram: BDA a

100%, BDA a 75% mais ME a 25%, BDA a 50% mais ME a 50%, BDA a 25% mais ME a 75%, BDA a 100% mais ME a 100% e ME a 100% (Tabela 3).

#### 4.1.2. PREPARO DAS PLACAS

Após autoclavagem dos meios de cultura, estes ainda quentes, foram levados para câmara de fluxo laminar onde foram vertidos em placas de Petri e após resfriamento (geleificação) foram vedadas com filme plástico, identificadas e armazenadas em estufa a 28°C ( $\pm$  2°C) por três dias para verificar contaminações.

**TABELA 1:** Quantidade (g) dos reagentes usados em 1L de água destilada em meios de cultura.

REAGENTES*	BDA Himedia	Caldo nutriente	Extrato de levedura	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Ágar	SM (mL)
<b>BDA 100%</b>	39,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>BDA 75% + ME 25%</b>	29,25	6,00	0,25	0,25	3,50	2,50
<b>BDA 50% + ME 50%</b>	19,50	4,00	0,50	0,50	7,00	5,00
<b>BDA 25% + ME 75%</b>	9,75	2,00	0,75	0,75	10,50	7,50
<b>BDA 100% + ME 100%</b>	39,00	8,00	1,00	1,00	0,00	10,00
<b>ME 100%</b>	0,00	8,00	1,00	1,00	14,00	10,00

\* pH 7,0 para todos os meios; CN = Caldo nutriente (Composição de 13,0 g do produto comercial = extrato de bife – 1,0 g; extrato de levedura – 2,0 g; peptona – 5,0 g; cloreto de sódio – 5,0 g); SM = Sais minerais (Composição = 10 g CaCO<sub>3</sub>, 10 g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 1 g FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 1 g MnSO<sub>4</sub>, 1 g ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 1 L água destilada).

As placas com os diferentes meios de cultura foram retiradas da estufa e verificado se havia presença de contaminações com conseqüente eliminação de placas contaminadas. As placas não contaminadas foram levadas para ambiente estéril onde se iniciou a instalação do ensaio, para este, foi utilizada a estirpe bacteriana S1375 que não estava apresentando bom desenvolvimento de colônia em meio BDA puro. Concomitante aos testes realizados com a bactéria foi testada também a capacidade do patógeno de colonizar os mesmos meios de cultura nas diferentes concentrações.

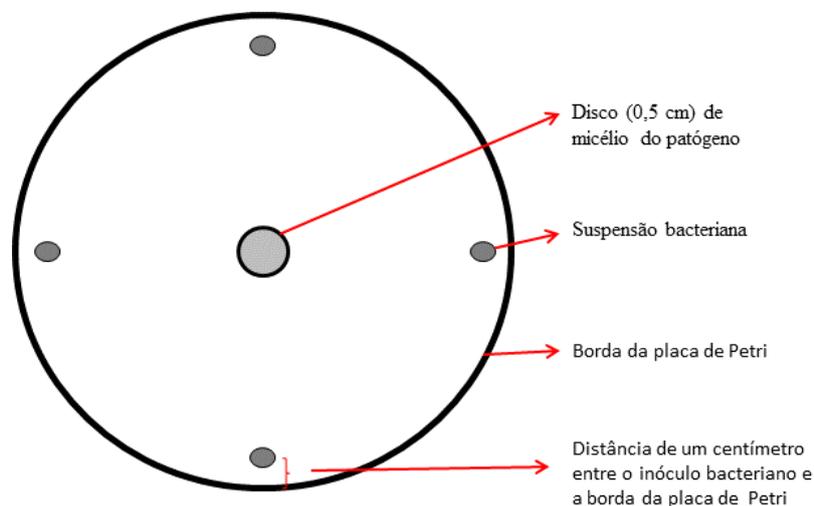
Os tratamentos utilizados para todas as combinações de reagentes dos meios de cultura foram: bactéria; fungo e fungo mais bactéria. Também foram testadas duas temperaturas de incubação (25°C; 28°C) que são ideais para o crescimento do fungo e da bactéria respectivamente. A deposição individual de ambos os organismos foi efetuada no centro da placa, disco de BDA de 0,5 cm contendo micélio do fungo ou 10 µL de suspensão bacteriana. Também foi realizada inoculação com ambos os organismos em mesma placa (Figura 1). As avaliações foram realizadas nove dias após a montagem dos ensaios.

#### **4.2. ANTAGONISMO DE *Bacillus* A *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum***

A avaliação do antagonismo de *Bacillus* a *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* foi realizada através do confronto direto, com a adoção do método de pareamento de culturas em placas de Petri, de acordo com Dennis & Webster (1971b) com adaptações. As estirpes bacterianas foram inoculadas em meio Embrapa líquido e após inoculação foram acondicionadas em incubador rotativo (150 rpm/minuto), na ausência de luz, sob temperatura de  $28^{\circ} \pm 2^{\circ}$  C por um período de 72 horas. O isolado do patógeno foi multiplicado inicialmente em placas contendo o meio de cultura BDA, acondicionadas em câmara de crescimento (Fanen, mod. 347), à  $25^{\circ} \pm 2^{\circ}$  C e fotofase de 12 horas, durante 9 dias. Discos de ágar (0,5 cm de diâmetro) contendo estrutura fúngica retirados da cultura pura do patógeno foram depositados na região central das placas contendo o meio anteriormente selecionado para esse teste (meio BDA + meio Embrapa) e o antagonista foi aplicado em quatro pontos da placa em alíquotas de 10 µL cada (Figura 1), de modo que ficassem equidistantes e a aproximadamente 1 cm da borda da placa de Petri. Após montagem do ensaio nas placas essas foram vedadas com filme plástico e encaminhadas imediatamente para incubador nas mesmas condições descritas para o crescimento do fungo. Como controle foram preparadas placas de

BDA + meio Embrapa, contendo o patógeno inoculado no centro da placa como na descrição para o bioensaio e ao invés de inocular suspensões bacterianas como nos tratamentos, foram aplicados apenas meio Embrapa líquido puro nas mesmas quantidades descritas para os tratamentos (10  $\mu$ L). Para cada tratamento incluindo testemunhas foram feitas quatro repetições. As avaliações foram realizadas utilizando-se escala de notas (na sequência), aos nove dias de cultivo, quando as colônias das placas testemunhas, contendo apenas o patógeno, cobriam totalmente a superfície do meio de cultura atingindo as extremidades das placas de Petri.

As estruturas das zonas de confronto entre os dois organismos foram analisadas em Microscópio Óptico (Olympus BX40), com aumento de 40X. Para tanto, lâminas contendo fragmentos dessas estruturas de confronto entre o fungo e a bactéria foram confeccionadas para observação da presença de plasmólise de hifas bem como alterações estruturais dessas hifas.

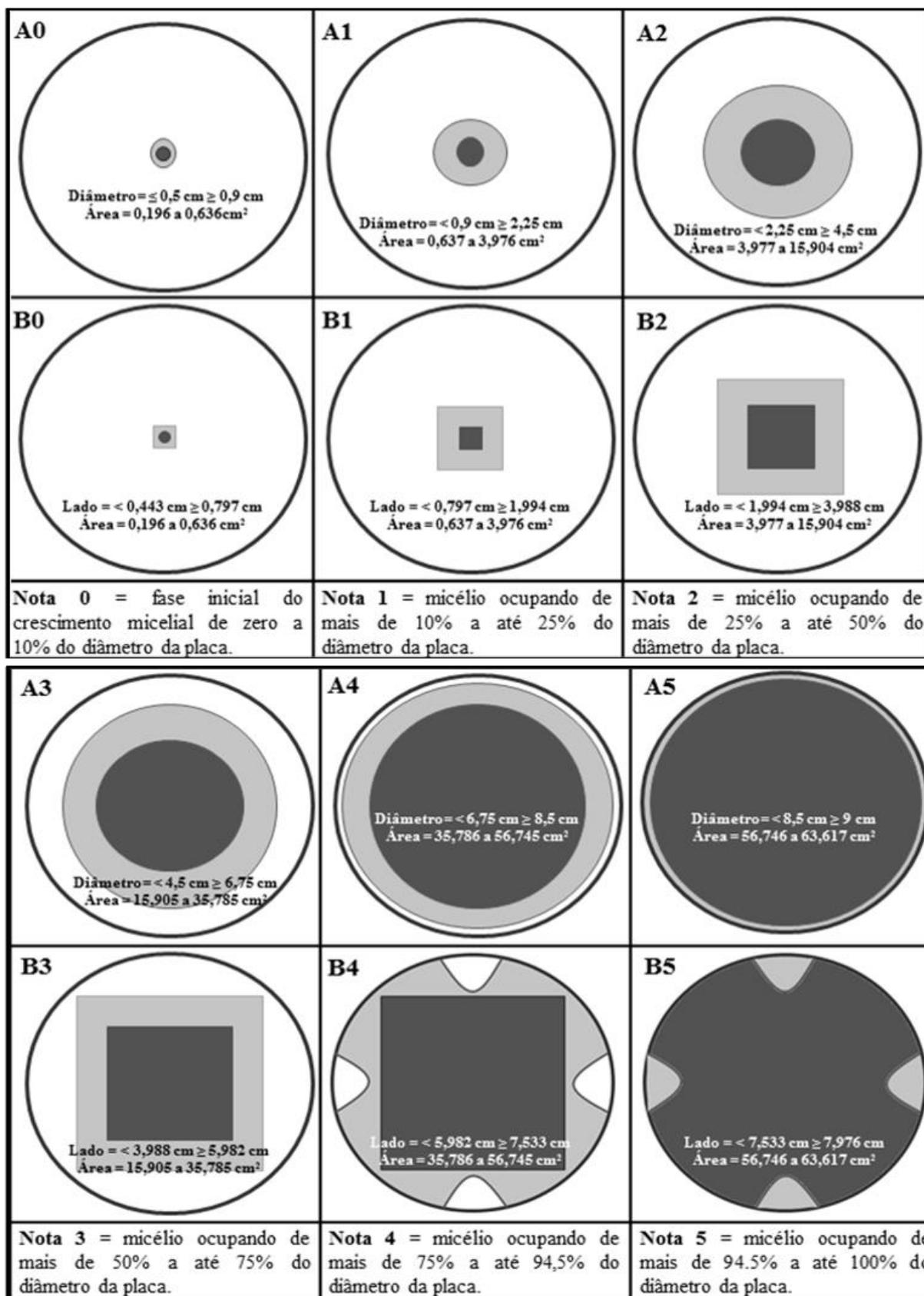


**FIGURA 1:** Teste pareado. Setas indicam a disposição de cada um dos componentes do ensaio. O disco de mio com o patógeno foi depositado no centro da placa e a suspensão bacteriana em quatro pontos laterais e equidistantes.

### **4.3. ESCALA DE AVALIAÇÃO DO ENSAIO DE COMPETIÇÃO**

Para avaliação do ensaio de competição foi proposta uma escala de notas ilustrada (Figura 2). Essa escala levou em consideração variáveis ocorrentes durante o desenvolvimento da colônia do patógeno na placa. Figuras identificadas com a letra “A” estão as colônias que não sofrem interferência do antagonista durante o período de realização do ensaio. Figuras identificadas com a letra “B” são a representação das colônias que sofreram interferência do antagonista, deformando o formato de sua colônia.

Com a utilização dessa escala, é possível atribuir seis diferentes notas durante as avaliações, sendo estas, variáveis do zero ao cinco facilitando assim uma posterior identificação de estirpes com bom ou mau potencial antagônico para as condições de laboratório em que foram conduzidas.



**FIGURA 2:** Crescimento das colônias fungicas em ensaio pareado. Figuras de A0 a A5 indicam crescimento fúngico sem interferência do antagonista. Figuras de B0 a B5 mostram o crescimento com interferência do antagonista.

#### 4.4. AVALIAÇÃO DO EFEITO DE METABÓLITOS NÃO VOLÁTEIS

Testes com os antagonistas foram também realizados para avaliação da inibição do crescimento do patógeno por metabólitos não voláteis, com base na metodologia descrita por Agrawal *et al.* (1977), com modificações. Isolados de *Bacillus* foram cultivados em frascos Erlenmeyer de 50 mL contendo 15 mL de meio Embrapa líquido (MONNERAT *et al.*, 2007). Foram utilizados 100 µL de inóculo da bactéria / frasco, retirados de culturas de *Bacillus* previamente desenvolvidas em meio Embrapa, com três dias de idade. A incubação foi realizada em agitador orbital (Lab-line incubator-shaker modelo NT 711), a 150 RPM, à 28° C, em ausência de luz. Após três dias, a parte líquida foi coletada por centrifugação em centrífuga Eppendorf 5804 R a 13416 G por 20 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante foi levado para ambiente estéril onde foi filtrado em membranas de celulose (0,45 µm). O “metabólito” assim esterilizado foi incorporado ao meio BDA autoclavado, acrescido 25% da quantidade normal de ágar, na proporção de 25% (v/v). Para cada estirpe de *Bacillus*, foram preparadas quatro placas com filtrado, totalizando 44 placas. As placas de Petri com o meio receberam ao centro, um disco de cultura do patógeno e foram em seguir incubadas a 25° C.

A testemunha consistiu de placas contendo meio BDA, acrescido de 25% da quantidade normal de ágar e incorporado 25% de meio Embrapa puro, inoculadas com discos dos patógenos. As medições do crescimento radial foram tomadas diariamente até o momento em que a colônia da testemunha tomou toda a superfície do meio.

Os dados obtidos foram submetidos à ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ), usando-se o programa Assistat versão 7.7 (SILVA & AZEVEDO, 2016).

#### 4.5. INTERAÇÃO DE *Fusarium oxysporum* E *Bacillus* SPP. AO MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA

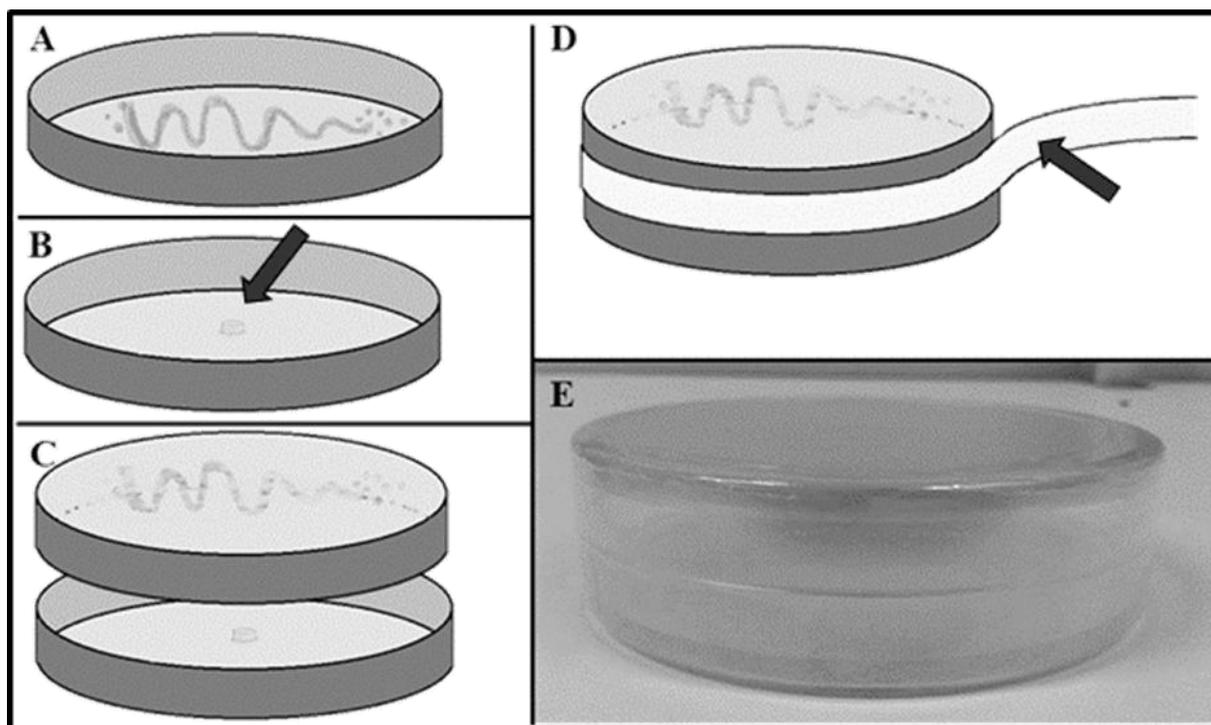
Para a obtenção de estudos mais detalhados da interação entre as estirpes de *Bacillus* e do patógeno, foi utilizada a técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV), onde amostras oriundas da região de confronto entre patógeno e antagonista foram tratadas para confecção das imagens. Para tanto, discos de meio de cultura (5 mm de diâmetro) provenientes de áreas do confronto entre as colônias de *Bacillus* e do patógeno (*F. oxysporum*) foram removidos e submetidos a metodologia descrita por Bossola & Russel (1998), adaptado por Alves (2004), a seguir: realizado tratamento com solução fixadora (glutaraldeído 2% e paraformaldeído 2%, em tampão cacodilato 0,05 M a pH 7,2) para fixação a 4 °C durante 24 horas, seguido de 4 lavagens com tampão cacodilato 0,05 M (pH 7,2) e pós-fixados durante 1 hora a 4 °C com tetróxido de ósmio (OsO<sub>4</sub>) 1% em tampão cacodilato 0,01 M (pH 7,2).

As amostras foram então lavadas três vezes com água destilada, e desidratadas em gradiente crescente de acetona (30, 50, 70, 80, 90 e duas vezes de 100%). Para secagem ao ponto crítico, utilizou-se dióxido de carbono no secador Elmitech Critical Point Drayer K850. Os suportes contendo o material foram metalizados com ouro, utilizando corrente de 25 mA, em atmosfera de ar de 1.10<sup>-2</sup> mbar durante 2'30". As imagens foram obtidas no Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília. As visualizações foram realizadas ao microscópio eletrônico JEOL JSM-700 1 F. Foram tomadas micrografias de alterações indicativas de toxicidade.

#### 4.6. AVALIAÇÃO DO EFEITO DE METABÓLITOS VOLÁTEIS

Para avaliação do efeito de metabólitos voláteis de *Bacillus* spp. a *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, foram realizados testes com método modificado de Dennis & Webster (1971a). Para montagem de cada unidade amostral do experimento, duas placas de Petri, uma contendo meio de cultura BDA recebeu disco de ágar (5 mm) retirado da colônia do patógeno e uma outra placa contendo meio de cultura Embrapa, foi inoculada com 40 µL de suspensão do antagonista e com auxílio de uma alça de Drigalsky foi espalhado sobre a superfície do meio. Após a inoculação, as bases contendo o antagonista e o patógeno foram sobrepostas e unidas com filme de PVC, para impedir o escape de metabólitos voláteis (Figura 3). As unidades experimentais, agora formadas por duas bases de placas, obrigatoriamente com a base inferior inoculada com o patógeno, foram mantidas nas mesmas condições de incubação. Como testemunha, foram sobrepostas uma base contendo o patógeno e outra contendo apenas meio Embrapa sem inoculação do antagonista. A avaliação do crescimento micelial foi diária até o momento onde a testemunha cubriu toda a superfície do meio.

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado com quatro repetições e as unidades experimentais constituíram de dois fundos de placa unidos com filme plástico, o experimento foi realizado duas vezes.



**FIGURA 3:** Unidade experimental do ensaio de metabólitos voláteis. **A-** placa contendo meio Embrapa inoculada com *Bacillus*; **B-** Placa contendo meio de cultura BDA inoculada com disco de micélio (diâmetro = 0,5 cm) do patógeno em seu centro, como indicado pela seta vermelha; **C-** Sobreposição dos fundos das placas, onde a placa superior com meio Embrapa inoculada com o antagonista e a placa inferior com meio BDA inoculada com o patógeno; **D-** Vedação das placas com filme plástico (seta vermelha), e; **E-** Representação de uma unidade experimental montada.

## 4.7. TESTES EM CASA DE VEGETAÇÃO

### 4.7.1. MULTIPLICAÇÃO DE *Fusarium* sp. EM ARROZ

A multiplicação do *Fusarium* para realização do experimento foi feita segundo metodologia adaptada de Serra & Silva (2005), onde 300 g de arroz parboilizado foram acondicionados em sacolas plásticas autoclaváveis, umedecidos com água destilada a 60% do peso (180 mL), para cada sacola. O substrato assim preparado foi autoclavado a 120 °C por 20 min e, após resfriamento, foi inoculado com cinco discos (0,5 cm) de BDA contendo micélio do patógeno. Foi utilizada colônia de *F. oxysporum* com 9 dias de incubação a  $25 \pm 2$  °C e fotofase de 12 h. As sacolas plásticas contendo o substrato inoculado foram também mantidas

a  $25 \pm 2$  °C e fotofase de 12 h, por 15 dias. A cada dois dias as embalagens foram movidas suavemente para homogeneização do micélio do fungo sobre o substrato de arroz.

#### **4.7.2. PRODUÇÃO DE SUSPENSÃO DE *Bacillus***

As bactérias selecionadas no cultivo pareado (S662, S685, S1301, S1600, S1809, S1823, S1875, S1967, S2535, S2536, S2538, GF266 e GF267), foram multiplicadas para realização de ensaio *in vivo* em casa de vegetação com algodoeiro. Os inóculos preservados em tirinhas de papel foram encaminhados para ambiente estéril onde foram colocados em erlenmeyer (150 mL) contendo 50 mL de meio Embrapa (MONNERAT *et al.*, 2007). Após inoculação nos erlenmeyer, estes foram encaminhados para incubador rotativo (150 rpm), a  $28 \pm 2$  °C na ausência de luz por 72 h. Após esse período de incubação estavam prontas as suspensões bacterianas para utilização no ensaio.

#### **4.7.3. TESTE DE GERMINAÇÃO DE ALGODÃO EM SUBSTRATO COM**

##### ***Fusarium***

Para este ensaio foram adquiridas bandejas plásticas com capacidade volumétrica de três litros nas dimensões de 30,3 cm (comprimento) x 22,1 cm (largura) x 7,5 cm (altura). Essas bandejas foram preenchidas com uma mistura de solo e substrato autoclavados. A esterilização do substrato foi realizada em autoclave vertical por um período de vinte minutos sob temperatura de 120° C e pressão de um Kgf/cm<sup>2</sup>. Realizada a autoclavagem o solo e substrato foram encaminhados para casa de vegetação onde foram misturados e acondicionados em reservatório até o momento da instalação do experimento.

#### **4.7.4. PREPARO DAS SEMENTES DE ALGODÃO PARA O ENSAIO**

Neste ensaio foi selecionada a variedade de algodão FM 966 que é suscetível a *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. Após seleção da variedade, as sementes fornecidas pelo IMA (Instituto Mato-grossense do Algodão) foram submetidas a desinfecção superficial com hipoclorito 1% / 1 minuto; álcool 70% / 1 minuto e duas vezes em água destilada / 1 minuto.

#### **4.7.5. ENSAIO EM CASA DE VEGETAÇÃO**

Os tratamentos que comporam o teste foram: (1) testemunha sem tratamento; (2) testemunha com *Fusarium* autoclavado; (3) testemunha com *Fusarium* ativo; (4) testemunha química (Derosal Plus) + *Fusarium*; (5) tratamentos com bactérias + *Fusarium*.

As sementes dos tratamentos que receberam o *Fusarium* ativo, foram para isso, após a desinfecção superficial pesadas e acrescidas a estas o mesmo peso em arroz parboilizado com *Fusarium* crescido. Após a adição do fungo, as sementes de algodão foram colocadas em uma bandeja onde foi realizada uma homogeneização para que ocorresse a cobertura da superfície das sementes de algodão com estruturas do patógeno.

Na casa de vegetação, as bandejas plásticas foram identificadas e dispostas sobre as bancadas. Após essa disposição (arrumação) das bandejas, estas foram preenchidas com uma camada de aproximadamente quatro centímetros do substrato. Sobre essa camada as sementes tratadas e não tratadas com o patógeno foram dispostas em quatro fileiras (três fileiras de seis sementes e uma fileira de sete sementes). Colocadas as sementes sobre a superfície do solo, estas foram inoculadas com os tratamentos biológicos onde sobre cada semente foi inoculado 250 µL da suspensão bacteriana correspondente a identificação da bandeja. Para o tratamento químico, este foi realizado antes da inoculação do patógeno seguindo a dosagem recomendada pelo fabricante. Após a disposição das sementes em cada uma das bandejas e realizadas as

inoculações com seus tratamentos correspondentes, foi colocado sobre estas mais uma camada de substrato de aproximadamente três centímetros cobrindo as sementes. Feito o plantio, foi realizada a primeira irrigação do ensaio (Anexo 2).

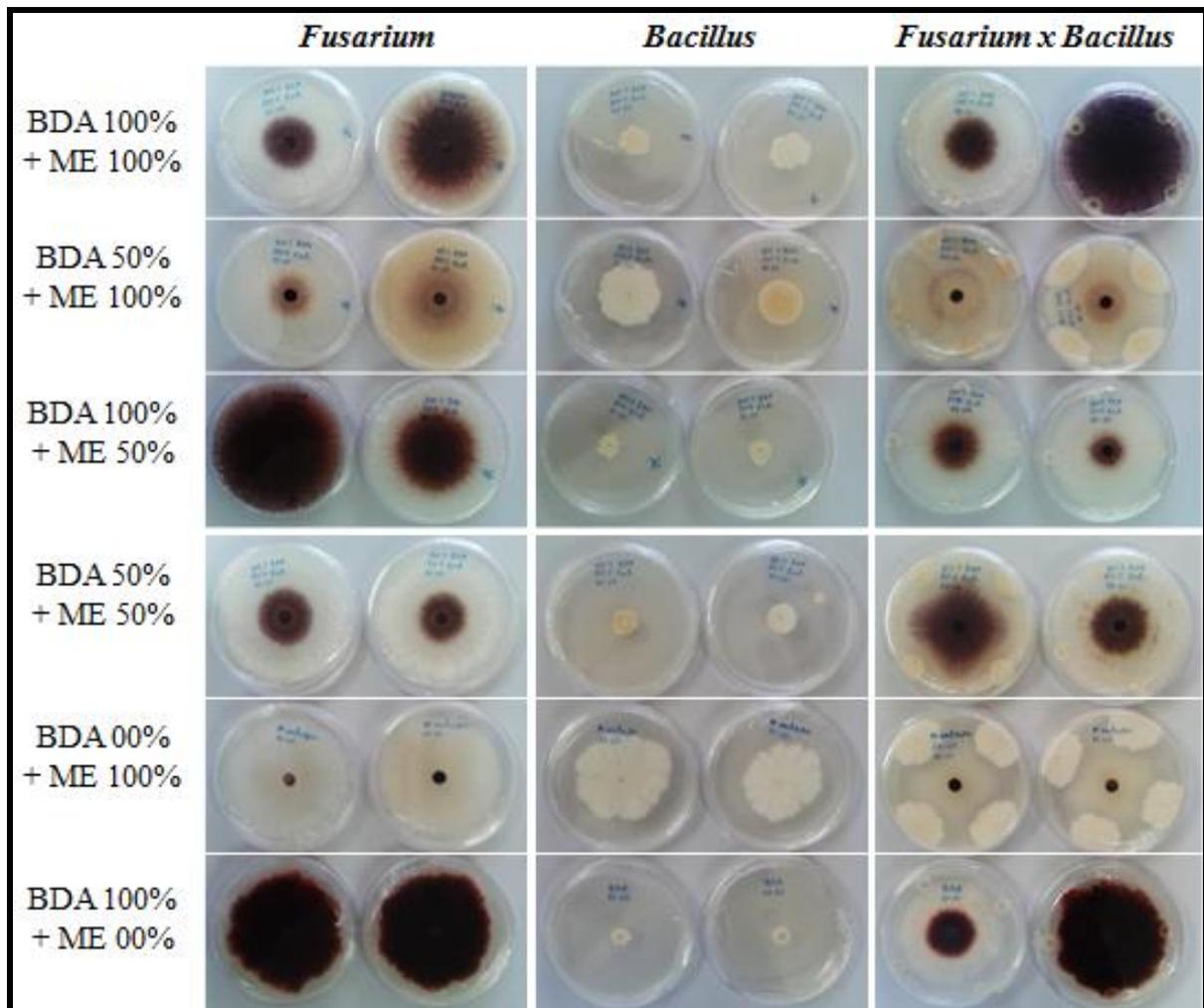
Este experimento foi conduzido por trinta dias onde após o início da germinação foram realizadas avaliações inicialmente diárias até o trigésimo dia. Foi avaliado nesse experimento o número de plantas sadias e doentes germinadas e o número de tombamento (morte de plantas após germinação). As irrigações foram realizadas a cada dois dias e não houve a necessidade de aplicação de produtos fitossanitários durante a condução deste experimento.

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado com cinco repetições por tratamento. As unidades experimentais foram compostas por bandeja contendo 25 sementes. Os dados obtidos a partir da avaliação de todos os tratamentos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa de estatística Assistat versão 7.7 (SILVA & AZEVEDO, 2016).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### SELEÇÃO DE MEIO DE CULTURA PARA TESTES COM *Fusarium oxysporum*

Com a realização deste ensaio se notou variações do crescimento dos dois organismos devido as diferentes concentrações dos meios de cultura utilizados. Quando a concentração do meio de cultura foi ideal para determinado organismo, maior foi o seu desenvolvimento.



**FIGURA 4:** Avaliação de crescimento das colônias de *Fusarium oxysporum* e *Bacillus* sp. em combinações de meios de cultura com diferentes concentrações de reagentes.

E como pode ser visualizado nas imagens, a melhor proporção de reagentes utilizada, de forma que não houvesse vantagem de um em detrimento do outro, foi a 100% x 100%, proporcionando um crescimento balanceado sem prejudicar ou favorecer nenhum organismo.

### **ESCALA DE AVALIAÇÃO DO ENSAIO DE COMPETIÇÃO**

A escala de avaliação proposta neste trabalho apresenta grandes vantagens com o seu uso, facilitando a seleção e descarte de estirpes testadas com maior segurança com base nos parâmetros e condições de avaliação. Com os testes de confronto direto entre o patógeno e antagonista só é possível identificar ação direta de um organismo sobre o outro nas condições de laboratório. Se houver outro mecanismo de ação que possa estar envolvido nessa interação, como por exemplo, indução de resistência no hospedeiro ou competição por nutrientes não encontrados no meio de cultura, estes não poderão ser identificados apenas com a utilização deste teste. Portanto quando se realiza uma seleção a partir de testes de pareamento, como o apresentado aqui, é possível que algumas estirpes ou isolados testados sejam descartados, mesmo possuindo algum promissor mecanismo de ação não identificado. Mas há a necessidade de se fazer uma seleção prévia, para que possamos partir de um ponto consistente e a utilização dessa técnica (pareamento) nos possibilita isso. Apesar das limitações, é a que permite seleções com agrupamento de um maior número de mecanismos de ação de agentes de biocontrole em laboratório. Outras técnicas podem ser mais eficientes como os testes *in vivo*, mas além de serem mais caras, difíceis de conduzir e demandar maiores estruturas e espaço, exigem mais tempo em sua execução tornando inviável sua utilização em ensaios iniciais de seleção.

Várias são as escalas de notas encontradas na literatura, mas para avaliação deste ensaio, da forma como foi montado, esta escala proposta foi a mais apropriada para as

avaliações. Uma vantagem dessa escala é a facilidade de classificar uma estirpe, pois, com os dois padrões apresentados o avaliador fica menos sujeito a erros e os resultados ficarão mais precisos.

Quanto ao critério escolhido para classificação das colônias, porcentual do diâmetro da placa de Petri, este foi adotado, pois possibilita maior facilidade na diferenciação das notas dificultando erros de leitura. Além do mais, quando se transforma estes dados de diâmetro em área (cm<sup>2</sup>) (Tabela 2), observa-se que as diferenças se tornaram ainda maiores dando mais consistência aos resultados. Mas se ao invés de se escalonar diâmetro o fizéssemos com a área nas mesmas proporções as diferenças visuais seriam quase imperceptíveis de uma nota a outra, induzindo o avaliador ao erro.

**TABELA 2:** Valores das notas da escala proposta em porcentagem do diâmetro total, comprimento do diâmetro em centímetros, área da colônia em centímetros quadrados, porcentagem máxima ocupada pela colônia para cada uma das notas e valores dos intervalos entre as notas em centímetros quadrados de área e porcentagem da área total.

Notas	Diâmetro da colônia (%)	Diâmetro da colônia (cm)	Área da colônia (cm <sup>2</sup> )	Área da colônia (%)	Área do intervalo da nota (cm <sup>2</sup> )	Área do intervalo da nota (%)
0	10	0,9	0,636	1	0,636	1
1	25	2,25	3,976	6,25	3,340	5,25
2	50	4,5	15,904	25	11,928	18,75
3	75	6,75	35,785	56,251	19,881	31,25
4	94,5	8,5	56,745	89,198	20,960	32,947
5	100	9	63,617	100	6,872	10,802

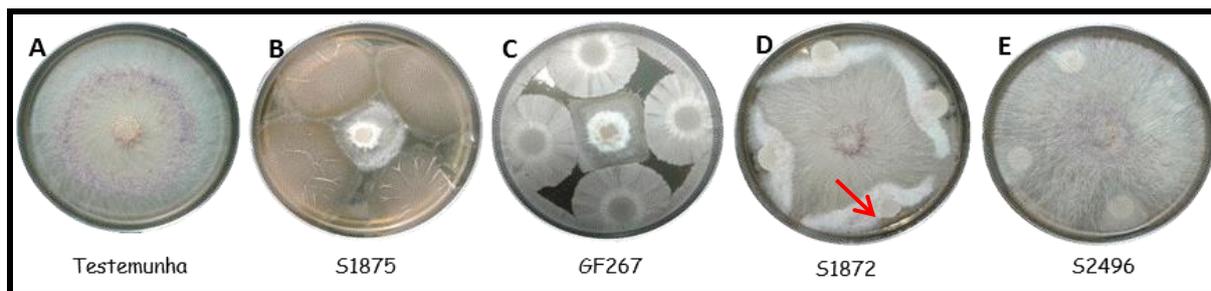
**AVALIAÇÃO DO ANTAGONISMO DE *Bacillus* spp. CONTRA *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* EM CULTIVO PAREADO**

Neste ensaio, foi avaliado o potencial antagônico de 178 estirpes de *Bacillus* sp. contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* de acordo com a escala de notas proposta no trabalho. E a título de exemplo, os resultados (Figura 2) possibilitam um melhor entendimento de como foram realizadas as leituras onde as estirpes que alcançaram notas variando de zero a dois foram selecionadas para ensaios posteriores. Partindo desse princípio, foram selecionadas 13 estirpes com bom potencial de controle *in vitro*.

Nenhuma estirpe apresentou nota 0; 2 apresentaram nota 1; 10 tiveram nota 2; 26 apresentaram nota 3; 24 obtiveram nota 4 e o restante das estirpes (115) não apresentaram atividade antagônica ao patógeno (Tabela 3).

**TABELA 3:** Porcentagem de estirpes de *Bacillus* inseridas nas notas da escala sugerida no trabalho (178 estirpes avaliadas).

<b>Notas</b>	<b>% de isolados encontrados</b>
<b>0</b>	0,00
<b>1</b>	1,12
<b>2</b>	5,62
<b>3</b>	14,61
<b>4</b>	13,48
<b>5</b>	64,61

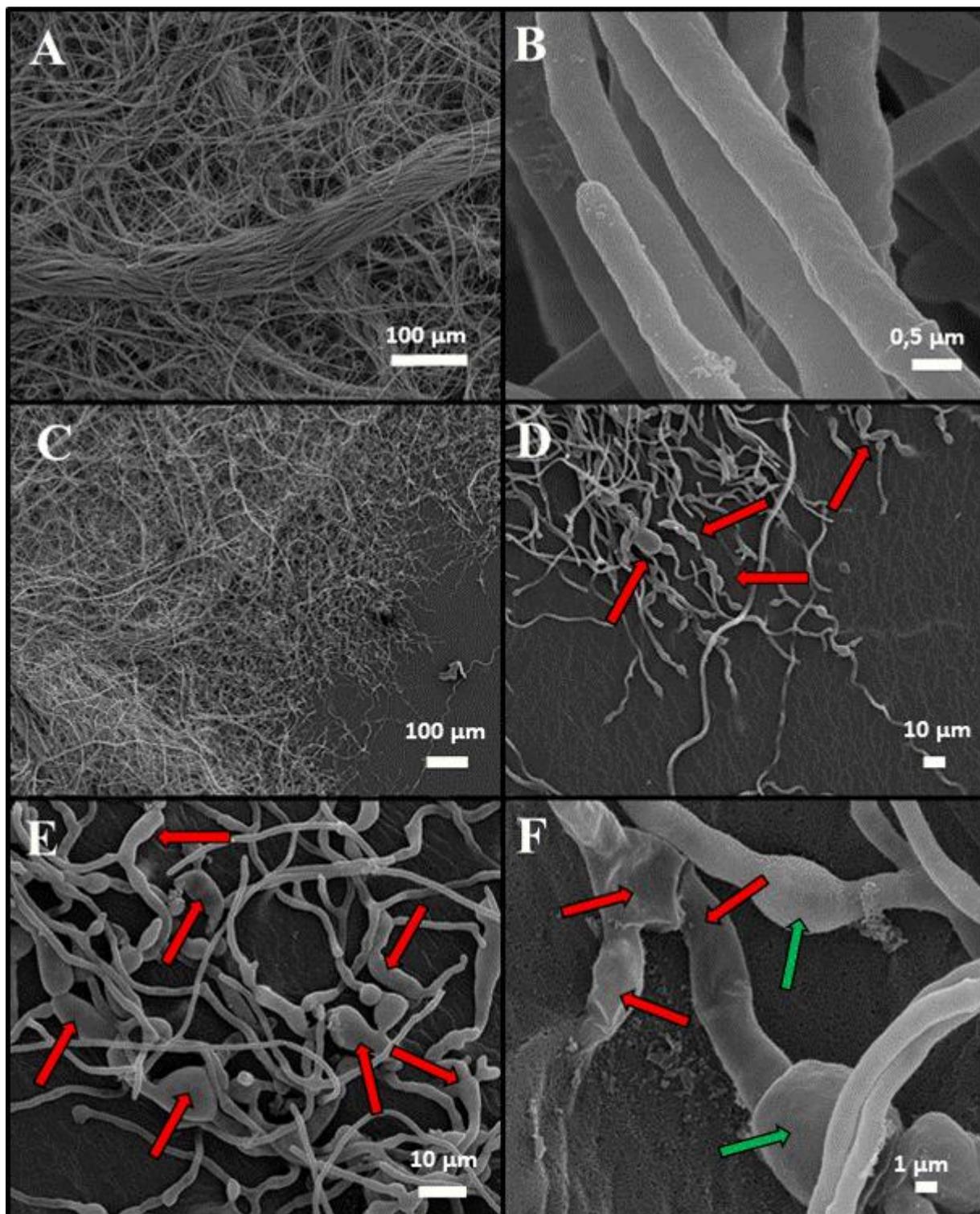


**FIGURA 5:** Exemplos de seleção de placas com pareado. A – Testemunha apenas com *Fusarium*; B e C – exemplos de placas com estirpes selecionadas, nota 1 e 2 respectivamente; D – exemplo de estirpe descartada, com pouca ação de controle sobre o fungo, mas com formação de área de confronto diferenciada (seta vermelha), nota 5 e E – exemplo de estirpe também descartada que não apresentou efeito direto sobre o patógeno, nota 5.

Em 2005 Chaurasia *et al.* trabalhando com estirpes de *B. subtilis* isoladas da rizosfera de plantas conseguiram controlar o crescimento micelial de seis espécies de fungos dentre eles quatro patógenos de plantas, *Alternaria alternata*, *Cladosporium oxysporum*, *Fusarium oxysporum*, *Paecilomyces lilacinus*. Nos testes em condições de laboratório foi possível notar esse efeito em cultivo pareado e em ensaios posteriores de metabólitos voláteis e solúveis em água esses autores concluíram que os efeitos tóxicos dos metabólitos voláteis foram superiores causando maiores danos ao patógeno com alterações, deformações em micélio e conídios.

Gupta & Vakhlu (2015), utilizando as mesmas técnicas empregadas neste trabalho, buscaram por agentes de biocontrole contra *F. oxysporum* em açafrão (*Crocus sativus*). Para isso, isolaram 400 estirpes bacterianas de área produtora desse condimento. Posteriormente, estes autores realizaram ensaios *in vitro* (pareado e metabólitos solúveis) para selecionar estirpes antagônicas para o teste subsequente *in vivo*. Com esses primeiros ensaios foi possível selecionar a bactéria *B. amyloliquefaciens* que apresentou efeito antagônico a *F. oxysporum* e os testes em casa de vegetação confirmaram esse potencial do organismo selecionado.

Com a realização das observações ao microscópio eletrônico de varredura (MEV) das áreas de confronto entre patógeno e antagonista foi possível visualizar deformações de hifas do patógeno, com a conglobação, hidrólise e morte de hifas devido a atuação tóxica dos metabólitos do antagonista ao patógeno (Figura 6). Isto comprova o efeito tóxico dos isolados de *Bacillus* sobre o *Fusarium oxysporum*. Estes resultados do efeito tóxico de *Bacillus* sobre *Fusarium* corroboram com os obtidos por Gong *et al.* (2015), onde estes autores trabalharam com três classes de lipopeptídeos cíclicos, produzidos por *Bacillus amyloliquefaciens* e verificaram seu efeito sobre o patógeno *Fusarium graminearum*. Como resultado estes autores obtiveram dois compostos isolados a partir da cromatografia líquida reversa de alto desempenho e espectrometria de massa por ionização por electropulverização. Estes produtos obtidos, quando testados sobre o patógeno em condições de laboratório apresentaram efeito tóxico ao mesmo, onde foram observadas com auxílio de técnicas de microscopia alterações morfológicas graves em conídios e distorções substanciais em hifas assim como visto em nosso ensaio.



**FIGURA 6:** Imagens em MEV. **A**– vista panorâmica de colônia testemunha de *F. oxysporum*; **B** – imagem de hifa normal de *F. oxysporum* retirada da testemunha; **C**– vista panorâmica de área de confronto entre o fungo e antagonista; **D**– imagem de área de confronto do fungo com zona de atuação dos metabólitos solúveis da bactéria (GF266) apresentando vários pontos de deformação de hisfas do patógeno indicados pelas setas vermelhas; **E**– Setas indicando conglobação de hisfas do *Fusarium* com superfícies irregulares, largura expandida ao contato com região de interferência da bactéria e **F** – Setas vermelhas indicando hidrólise de hisfas do patógeno e setas verdes indicando hisfas com larguras expandidas.

## AVALIAÇÃO DO EFEITO INIBIDOR DE METABÓLITOS NÃO VOLÁTEIS PRODUZIDOS POR *Bacillus* spp.

**TABELA 4:** Efeito de metabólitos não voláteis de *Bacillus* sobre a área (cm<sup>2</sup>) da colônia de *Fusarium*.

Avaliações metabólitos não voláteis realizadas de 24 em 24 horas (Área - cm <sup>2</sup> )									
Estirpe	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	5 <sup>a</sup>	6 <sup>a</sup>	7 <sup>a</sup>	8 <sup>a</sup>	9 <sup>a</sup>
GF266	0,4 aF	1,3 aF	5,2 aF	11,7 abcE	20,5 abcD	29,5 bcC	41,1 bB	53,1 aA	56,8 aA
<b>GF267</b>	0,4 aG	1,4 aG	5,5 aFG	11,0 abcF	17,8 bcdE	25,1 cdD	<b>33,7 cC</b>	<b>42,8 bB</b>	52,4 abA
S662	0,4 aG	1,6 aFG	6,5 aF	13,0 abE	22,1 abD	31,2 bcC	41,8 bB	51,4 aA	56,8 aA
S685	0,4 aG	1,5 aFG	6,5 aF	13,5 abE	22,8 abD	32,8 abC	43,4 bB	52,8 aA	56,8 aA
<b>S1301</b>	0,4 aG	1,4 aG	4,5 aFG	8,7 abcF	14,7 cdE	<b>21,9 deD</b>	<b>29,1 cdC</b>	<b>38,4 bcB</b>	<b>49,4 ba</b>
S1600	0,4 aG	1,7 aFG	6,9 aF	14,1 abE	23,4 abD	34,5 abC	45,1 bB	56,8 aA	56,8 aA
S1809	0,4 aG	1,7 aFG	6,8 aF	13,9 abE	23,2 abD	32,3 abC	42,1 bB	52,2 aA	56,8 aA
<b>S1823</b>	0,4 aG	1,0 aFG	4,0 aFG	6,6 cF	<b>13,5 dE</b>	<b>22,8 deD</b>	<b>32,8 cC</b>	<b>43,4 bB</b>	52,8 abA
S1875	0,4 aG	1,6 aFG	6,6 aF	13,9 abE	23,9 abD	34,5 abC	46,5 abB	55,8 aA	56,8 aA
<b>S1967</b>	0,4 aG	1,5 aG	5,3 aFG	9,2 abcEF	<b>14,0 dDE</b>	<b>19,3 deD</b>	<b>25,7 dC</b>	<b>33,7 cdB</b>	<b>41,3 cA</b>
<b>S2535</b>	0,4 aG	1,1 aG	4,2 aFG	8,2 bcEF	<b>13,0 dDE</b>	<b>18,3 eD</b>	<b>24,9 dC</b>	<b>31,4 dB</b>	<b>38,0 cA</b>
<b>S2536</b>	0,4 aG	1,1 aG	4,2 aFG	8,0 bcEF	<b>13,3 dE</b>	<b>19,6 deD</b>	<b>25,8 dC</b>	<b>32,2 dB</b>	<b>39,5 cA</b>
S2538	0,4 aF	1,7 aEF	7,1 aE	14,8 aD	25,7 aC	38,2 aB	52,2 aA	56,8 aA	56,8 aA
<b>Test.</b>	0,4 aF	1,5 aF	5,9 aF	12,2 abcE	20,9 abcD	30,2 bcC	41,8 bB	53,0 aA	56,8 aA

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade.

Comparações dentro da mesma coluna, letras minúsculas; comparações dentro da mesma linha, letras maiúsculas. Coeficiente de variação 11,56.

Com a análise dos resultados apresentados acima (Tabela 4), é possível inferir que algumas estirpes GF267, S1301, S1823, S1967, S2535 e S2536 apresentaram efeito tóxico sobre o desenvolvimento da colônia do patógeno em algum momento da condução do ensaio. Esse efeito foi notado a partir do 5º dia de avaliação onde foram observadas diferenças estatísticas significativas entre o crescimento da colônia normal do patógeno (testemunha) comparada a colônias de alguns tratamentos. Foi observado também que esse efeito se apresentou mais frequente entre o 7º e 8º dia após o início das avaliações, com um maior número de tratamentos com efeito no crescimento do patógeno, mas só se manteve até o final do ensaio para quatro estirpes, S1301, S1967, S2535 e S2536. Estas, ao final do experimento proporcionaram controle de 12,92%, 27,31%, 33,06% e 30,43% respectivamente.

Com os resultados expostos, merecem destaque o metabólito das estirpes S1967, S2535 e S2536 que exerceram efeito redutor no desenvolvimento do patógeno de 27,31% a até 33,06%. Isso implica na existência de algum composto solúvel em água, produzido por estas estirpes de *Bacillus*, que exercem efeito sobre *Fusarium*, impedindo seu desenvolvimento normal quando comparado com a testemunha.

O resultado do experimento sugere mais estudos sobre essa interação, pois há evidência da produção de algum composto produzido por *Bacillus* que possui ação sobre o desenvolvimento da colônia de *Fusarium oxysporum* e a quantificação e identificação desse composto produzido pode auxiliar na busca de novas ferramentas para controle do patógeno.

Em 2007, Romero e colaboradores, trabalhando com *Bacillus subtilis* para controle de *Podosphaera fusca* em melão, na tentativa de elucidar o mecanismo de ação desse antagonista, conseguiram identificar a ação tóxica do sobrenadante produzido pela bactéria sobre o patógeno, dessa forma os pesquisadores isolaram e identificaram os compostos (antibióticos) presentes no sobrenadante responsáveis pela ação tóxica e a partir dessa identificação realizaram o silenciamento do gene responsável pela produção desse antibiótico

conseguindo assim interromper sua produção pela bactéria acarretando então em um não controle do patógeno quando foi utilizada essa bactéria mutante. Assim, esses autores concluíram que estes polipeptídeos bloqueados possuem importante papel no antagonismo de *B. subtilis* sobre *P. fusca*. Este trabalho nos mostra a importância dos metabólitos secundários sobre as relações patógeno antagonista.

Crane e colaboradores (2013) conheciam o efeito inibidor de *B. amyloliquefaciens* sobre *Fusarium* do trigo em condições de laboratório e os autores atribuíam esse efeito aos metabólitos secundários (antibióticos) produzidos pela bactéria, pois quando esse mesmo tratamento foi aplicado em condições de campo o antagonista não foi capaz de controlar o patógeno mesmo estando presente no solo. Os autores acompanharam a concentração do antibiótico produzido pela bactéria e confirmaram que este só persistia no solo por no máximo três dias onde a partir desse intervalo de tempo sua concentração era praticamente nula, inviabilizando o controle do patógeno. Com o estudo os pesquisadores concluíram que realmente é a presença da iturina e a manutenção dessa concentração em níveis mais altos é fundamental para o controle da doença durante o período de infecção do patógeno.

Com o intuito de elucidar a ação de *Bacillus* sp., Patel e colaboradores (2011) estudaram a ação de alguns compostos secundários produzidos por este organismo sobre a permeabilidade da membrana fúngica e concluíram que alguns destes compostos secundários exercem influência direta sobre a permeabilidade da membrana fúngica promovendo a abertura de poros na membrana dos fungos que acarretam em extravasamento do conteúdo celular de suas hifas. Em nossos ensaios efeito similar foi observado nas hifas de *F. oxysporum* (Figura 6 F).

Abed e colaboradores (2016), na busca por rizobactérias antagonistas a *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* em grão-de-bico, fizeram uma seleção prévia *in vitro* a partir de 140 estirpes

bacterianas identificando aquelas que possuíam algum potencial de biocontrole. Após as seleções prévias outros testes foram realizados e o de metabólitos solúveis em água forneceu resultados bastante promissores com a identificação de uma bactéria (*B. aneurinilyticus*) que inibia em até 77% o desenvolvimento do micélio do patógeno. Isso demonstra o potencial desses organismos com a produção de compostos secundários. Estes resultados demonstram ainda a produção de compostos extracelulares pelas bactérias que são ativos no controle de fitopatógenos corroborando com os resultados encontrados neste estudo.

Dunlap e colaboradores (2011) trabalhando na identificação de polipeptídeos em três estirpes de *B. subtilis* reconhecidamente antagônicas a *Gibberella zeae* conseguiram constatar a produção de compostos antifúngicos, identificando os pertencentes às famílias inturina e fengicina durante a sua fase estacionária de crescimento. Para isso, os pesquisadores utilizaram espectroscopia de massa, isolando e identificando estes compostos com posteriores ensaios comprovando sua ação tóxica sobre o fungo.

## AVALIAÇÃO DO EFEITO INIBIDOR DE METABÓLITOS VOLÁTEIS PRODUZIDOS POR *Bacillus* spp.

**TABALA 5:** Efeito de metabólitos voláteis de *Bacillus* sobre a área (cm<sup>2</sup>) da colônia de *Fusarium*.

Avaliações metabólitos voláteis realizadas de 24 em 24 horas (Valores da área em centímetros quadrados)										
Estirpe	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	5 <sup>a</sup>	6 <sup>a</sup>	7 <sup>a</sup>	8 <sup>a</sup>	9 <sup>a</sup>	10 <sup>a</sup>
<b>GF266</b>	0,4 aI	1,5 aHI	5,0 aGH	8,0 abFG	<b>10,1</b> bcF	<b>19,6</b> bcdeE	<b>28,0</b> fghD	37,7 efgC	45,9 bcB	56,4 aA
<b>GF267</b>	0,4 aI	1,9 aHI	5,5 aGH	8,4 abFG	<b>10,6</b> bcF	<b>20,2</b> bcdeE	<b>28,2</b> efghD	37,5 efgC	46,2 bB	54,0 abA
<b>S662</b>	0,4 aH	1,6 aGH	4,7 aFG	<b>6,9</b> bEF	<b>10,0</b> bcE	22,4 abcD	34,6 abC	45,3 aB	56,8 aA	56,8 aA
<b>S685</b>	0,4 aG	1,8 aG	5,6 aF	8,4 abEF	<b>10,5</b> bcE	21,9 abcdeD	32,8 abcdC	42,9 abcB	53,3 aA	56,8 aA
<b>S1301</b>	0,4 aG	1,6 aG	4,0 aFG	<b>6,8</b> bEF	<b>9,8</b> bcE	23,3 abD	33,9 abcC	44,4 abcB	56,8 aA	56,8 aA
<b>S1600</b>	0,4 aG	1,8 aG	4,1 aFG	<b>6,3</b> bEF	<b>9,6</b> bcE	20,9 abcdeD	32,1 bcdeC	42,5 abcdB	54,3 aA	56,8 aA
<b>S1809</b>	0,4 aI	1,5 aHI	4,5 aGH	8,0 abFG	<b>8,7</b> cF	<b>19,2</b> cdeE	30,1 cdefD	40,7 cdefC	48,1 bB	55,7 aA
<b>S1823</b>	0,4 aI	1,6 aHI	5,1 aGH	8,3 abFG	<b>10,6</b> bcF	<b>17,9</b> eE	<b>26,0</b> ghD	<b>34,4</b> gC	<b>42,0</b> cdB	<b>50,2</b> bcA
<b>S1875</b>	0,4 aH	1,6 aGH	4,6 aFG	8,0 abEF	<b>11,8</b> bcE	22,4 abcD	33,6 abcC	44,2 abcB	54,6 aA	55,8 aA
<b>S1967</b>	0,4 aH	1,7 aGH	4,6 aFG	<b>7,9</b> bEF	<b>11,5</b> bcE	22,2 abcdD	36,7 aC	45,1 abB	56,8 aA	56,8 aA
<b>S2535</b>	0,4 aH	1,9 aH	5,9 aG	8,7 abFG	<b>10,7</b> bcF	<b>19,0</b> cdeE	28,9 defgD	<b>36,9</b> fgC	44,1 bcdB	53,0 abA
<b>S2536</b>	0,4 aI	1,6 aHI	5,0 aGH	8,3 abFG	<b>11,2</b> bcF	<b>18,3</b> deE	<b>24,7</b> hD	<b>34,7</b> gC	<b>40,9</b> dB	<b>48,0</b> cA
<b>S2538</b>	0,4 aH	1,9 aH	5,8 aG	9,9 abF	<b>12,7</b> bF	<b>20,0</b> bcdeE	30,5 cdefD	38,9 defC	45,3 bcB	53,6 abA
<b>Test.</b>	0,4 aI	1,8 aI	5,7 aH	12,0 aG	17,9 aF	24,6 aE	32,4 bcdD	41,3 bcdeC	47,6 bB	56,8 aA

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade.

Comparações dentro da mesma coluna, letras minúsculas; comparações dentro da mesma linha, letras maiúsculas. Coeficiente de variação 7,57.

Os resultados obtidos com a detecção de metabólitos voláteis com ação antagonica a *Fusarium* (Tabela 5), comprovam a produção destes pelas estirpes de *Bacillus* testadas. Ainda analisando os resultados anteriores (Tabela 5), as interferências provocadas pela atividade destes voláteis começaram a ser notadas no quarto dia de condução de ensaio, quando provocaram redução na velocidade de crescimento da colônia do fungo. Acompanhando este progresso, nota-se também que no quinto dia de avaliações, todos os tratamentos diferiram estatisticamente da testemunha com redução do desenvolvimento da colônia do patógeno, este fato leva a pensar que a causa dessa ação tenha sido a competição por oxigênio, uma vez que neste período foi notado o auge do crescimento das colônias de *Bacillus* nas condições apresentadas. Outra hipótese para explicar isso, seria devido a maior atividade da bactéria no meio com conseqüente aumento na produção de metabólitos secundários.

No sexto dia alguns tratamentos perdem o efeito inibidor, talvez por terem exaurido os nutrientes do meio onde se encontravam. Este fato fez com que as bactérias cessassem ou reduzissem o seu desenvolvimento acarretando assim, uma não produção ou redução da produção de voláteis com conseqüente retomada de crescimento do patógeno. Esta retomada de crescimento do patógeno, com a redução da atividade do *Bacillus*, pode indicar que a limitação ou disputa por oxigênio pode não ter sido a causa do controle no quinto dia, visto que, se trata aqui de um ensaio conduzido com unidades hermeticamente fechadas a troca de gases não seria possível. Com isso, é mais provável que as bactérias tenham interrompido a produção destes metabólitos com a paralisação do seu crescimento, e este fato possibilitou ao fungo uma retomada no seu crescimento onde este provavelmente tenha voltado a metabolizar os compostos voláteis desde o início produzidos pelas bactérias, mas em quantidades menores ou em concentração ainda não suficiente para causar danos ao fungo, como provavelmente vinha fazendo antes do surgimento desse pico no quinto dia. Passado esse período de estresse,

a bactéria reduziu ou parou a produção do volátil, o fungo voltou a metaboliza-lo e o seu crescimento foi retomado equiparando-se ao da testemunha.

Duas estirpes, S1823 e S2536 mantiveram seu efeito antagônico sobre o fungo desde o quinto dia até o último dia de condução do ensaio com controle de 11,51% e 15,51% respectivamente. Esse fato aponta a presença deste mecanismo para estas estirpes, mecanismo este, que somado a outros como a produção de metabólitos solúveis em água, mostrado no ensaio anterior para estas duas estirpes, pode conferir a estas maior eficiência no controle do fitopatógeno trabalhado.

Na tentativa de identificar rizobactérias com potencial de biocontrole sobre *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, Abed e colaboradores (2016) realizaram diversos testes. Dentre estes testes estava o de metabólitos voláteis onde estes autores conseguiram uma redução no crescimento do patógeno superior a 70% comparado a testemunha utilizando *B. firmus*. Isso indica o potencial que estes organismos apresentam com a produção destes compostos e confirma a produção destes voláteis ativos no controle de fitopatógenos o que corrobora com os resultados apresentados em nosso trabalho.

Acredita-se que o potencial de metabólitos voláteis seja devido à maior facilidade de sua difusão no ambiente solo, por meio de poros ou filmes d'água, conseguindo de maneira eficiente atingir patógenos deste ambiente (Lobo Júnior & Abreu, 2000).

Zhang e colaboradores (2013) isolaram e identificaram diversos compostos voláteis produzidos por *Bacillus atrophaeus* com atividade antifúngica. Tais compostos identificados como, álcoois, fenóis, aminas, amidas e alcanos estes foram testados sobre *Botrytis cinerea* reduzindo seu crescimento micelial.

Arrebola *et al.* (2010), analisando o efeito de metabólitos voláteis de *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens* no controle biológico de fungos do gênero *Penicillium* em pós colheira de frutos, conseguiram uma inibição de mais de 73% no crescimento micelial destes

patógenos por voláteis produzidos por *B. amyloliquefaciens*. Neste mesmo trabalho esses autores constataram que apesar do *B. subtilis* produzir bem mais compostos (21 tipos) que o *B. amyloliquefaciens* (8 tipos), este último foi mais eficiente no controle do patógeno, provavelmente pela maior produção de cetonas. Os autores observaram ainda que há um aumento gradativo da concentração dos compostos com o passar dos dias e que para estes antagonistas a maior produção foi no décimo dia de cultivo.

### **TESTES EM CASA DE VEGETAÇÃO**

Com a realização deste ensaio de germinação (Tabela 6), 11 tratamentos e a testemunha negativa (sem tratamento) apresentaram resultados estatisticamente superiores à testemunha positiva (apenas com *Fusarium*). Este resultado fornece uma amostra do poder destrutivo deste patógeno, quando presente nas sementes do algodão, inviabilizando a germinação das sementes e tendo como consequência quebra de *stand*, neste caso superior a 70%. Um evento semelhante a este poderia inviabilizar a produção se fosse verificada em área comercial de algodão.

Os tratamentos biológicos, utilizados neste estudo, não diferiram estatisticamente do tratamento químico, mas seus resultados foram superiores a testemunha. Isso sugere a necessidade de ampliar os estudos nessa área a fim de viabilizar a utilização dessa modalidade de controle aliada a outros métodos, no tratamento de sementes, aumentando a eficiência de controle, pois a adoção de apenas um método não é aconselhável principalmente se houver outras ferramentas que possam ser agregadas para obtenção de resultados mais satisfatórios.

Durante a condução do ensaio, foi notado que apesar do tratamento biológico propiciar uma melhor germinação das plantas, estas por sua vez, quando comparadas ao tratamento químico apresentaram maior número de lesões foliares. Isso pode ser explicado pelo fato de

que estas plantas tiveram mais dificuldade de se livrar do tegumento (casca) da semente tendo em vista que na maioria das vezes, elas se mantiveram aderidas aos cotilédones das plantas após sua emergência. Como estes tegumentos estavam cotaminados com estruturas do patógeno em sua superfície, este maior período de contato entre o patógeno e o hospedeiro pode ter favorecido o surgimento de lesões. Portanto, com o tratamento biológico, a ação danosa do patógeno foi retardada, permitindo maior germinação das plantas, mas ainda assim, houve danos posteriores a essas, sugerindo mais pesquisas, como por exemplo, a associação de controle químico e biológico para aumentar sua eficiência. Este fato, não desmerece o resultado positivo aqui apresentado pelo controle biológico, mas sugere sua utilização como mais uma ferramenta e não como única forma de controle.

Comparando os resultados aqui encontrados com os obtidos anteriormente com metabólitos voláteis e não voláteis, podemos inferir que nem sempre a produção de compostos secundários significa certeza de controle do patógeno, pois o objetivo principal destes testes é o de verificar a possível formação destes compostos pelo candidato a agente de biocontrole e o fato de este microrganismo está produzindo estes compostos *in vitro* não significa necessariamente que os mesmos serão produzidos em condições de campo. Nessa mesma linha de raciocínio, se pode ter uma estirpe que não seja capaz de produzir tais metabólitos *in vitro*, mas quando em condições naturais de campo são capazes de fazê-los.

Quanto às seleções prévias realizadas com os ensaios de competição, estes permitiram selecionar algumas estirpes eficientes, pois no ensaio de confronto direto não trabalhou-se apenas com mecanismos isolados como vistos nos ensaios anteriores, mas com um conjunto de mecanismos que associados podem promover resultados eficientes de controle do patógeno permitindo ter maior chance de sucesso no momento de seleção de estirpes para testes posteriores. Isso pode ser evidenciado neste ensaio de germinação, onde a partir de isolados

pré-selecionados nestes testes obteve-se alguns que apresentaram efeito tóxico ao patógeno estudado, minimizando danos às plantas.

**TABELA 6:** Germinação de sementes (número de plantas) de algodão tratadas com *Bacillus* para controle de *Fusarium* em casa de vegetação.

<b>Estirpe</b>	<b><i>Bacillus</i></b>	<b>14° dia de avaliação</b>
<b>Test sem patógeno e bactéria</b>	---	21,00 a
<b>S685</b>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	15,20 b
<b>S662</b>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	14,40 bc
<b>GF267</b>		13,20 bcd
<b>S1600</b>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	13,00 bcd
<b>S1809</b>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	12,40 bcde
<b>Carbendazim + Tiram</b>	----	12,40 bcde
<b>S2536</b>	<i>Paenibacillus alvei</i>	12,20 bcde
<b>S1301</b>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	11,60 cdef
<b>S1967</b>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	11,20 cdef
<b>GF266</b>		10,80 def
<b>S2538</b>	<i>Bacillus megaterium</i>	10,60 def
<b>S1823</b>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	9,80 defg
<b>S2535</b>	<i>Bacillus lentus</i>	9,40 efg
<b>S1875</b>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	8,20 fg
<b>Test fusário ativo</b>	----	6,60 g

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade. Coeficiente de variação 13,03.

Trabalhando com diferentes estirpes de *Bacillus* para controle de um complexo fúngico causador de doenças em plântulas de algodão, Khiyami *et al.* (2014) constataram a interação entre os organismos, onde uma bactéria que exerce bom efeito antagônico a um determinado fungo pode não o exercer para outro ou até mesmo para um isolado diferente dentro de uma mesma espécie de fungo. Este entendimento pode ser estendido aos agentes de biocontrole onde dentro de uma mesma espécie pode haver isolado muito eficientes no controle de um determinado patógeno e outros que não exercem nenhuma ação antagônica. Neste mesmo trabalho também foi percebida a ação protetora destas bactérias quando utilizadas em tratamento de sementes conferindo maior proteção as plantas em seus estádios iniciais de desenvolvimento, corroborando com os resultados encontrados neste trabalho.

Shifa e colaboradores em 2015, realizando testes de confronto direto, selecionaram a partir de sete agentes de biocontrole com atividade antifúngica aquele que apresentou melhores resultados no ensaio *in vitro* para controle de *Sclerotium rolfsii*. O agente de biocontrole selecionado por eles foi a bactéria *B. subtilis*. Este antagonista apresentou além dos ensaios em condições de laboratório, bons resultados em testes em casa de vegetação para cultura do amendoim (*Arachis hypogaea* L.). Os testes em casa de vegetação foram realizados de duas formas, inoculando as sementes com a bactéria antes do plantio (tratamento de sementes) e em aplicação no solo mais tratamento de sementes. Os melhores resultados foram obtidos quando além do tratamento de semente a bactéria foi também inoculada no solo onde apresentou uma redução de 93% de incidência da doença. Estes resultados confirmam a possibilidade de uso destes organismos como tratamento de sementes como proposto em nosso trabalho.

Além do efeito direto sobre o patógeno essas bactérias podem ainda induzir a resistência no hospedeiro. Dutta *et al.* (2008) testaram o efeito de dois isolados de RPCPs (*Bacillus cereus* e *Pseudomonas aeruginosa*), na indução de resistência sistêmica contra

*Fusarium udum* em ervilhas-de-angola e concluíram que essas bactérias foram capazes de induzir a resistência sistêmica nas plantas tratadas.

## 6. CONCLUSÕES

- O ajuste realizado no meio de cultura para realização dos testes de confronto direto possibilitou a realização dos ensaios sem favorecimento de um dos organismos em detrimento do outro equiparando as condições de competição;
- A criação e utilização da escala de notas para a realização das avaliações dos ensaios de pareado favoreceu uma padronização dos resultados tornando mais confiáveis as seleções;
- Com a realização dos testes de pareamento *in vitro*, foi possível a seleção de 13 estirpes que apresentaram bons resultados de competição;
- A partir da confecção das imagens de microscopia eletrônica de varredura das regiões de confronto entre patógeno e candidato a agente de controle biológico, foi possível visualizar alterações morfológicas nas hifas do patógeno com formação de superfícies irregulares, largura expandida e hidrólise;
- Das 13 estirpes selecionadas no ensaio anterior quatro (S1301, S1967, S2535 e S2538) são capazes de produzir metabólitos não-voláteis a ponto de reduzir o crescimento do micélio fúngico até no último dia de condução do ensaio;
- Para os ensaios de metabólitos voláteis duas estirpes (S1823 e S2536) foram capazes de interferir no desenvolvimento fúngico até o 10º dia de condução do experimento;
- Nos ensaios em casa de vegetação foi possível identificar 11 dos tratamentos e a testemunha negativa apresentando resultados estatisticamente superiores a testemunha positiva, isso indica um provável potencial antagônico dessas bactérias para proteção das plantas em tratamento de sementes.

## 7. LITERATURA CITADA

- ABED, H.; ROUAG, N.; MOUATASSEM, D. & ROUABHI, A. 2016. Screening for *Pseudomonas* and *Bacillus* antagonistic rhizobacteria strains for the biocontrol of *Fusarium* wilt of chickpea. Eurasian Journal of Soil Science, 5(3): 182-191.
- AGRAWAL, S.C.; KHARE, M.N. & AGRAWAL, P.S. 1977. Biological control of *Sclerotium rolfsii* causing collar rot of lentil. Indian Phytopathology, 30: 176-179.
- ALVES, E. 2004. Curso introdutório à microscopia eletrônica de varredura. UFLA/FAEPE, Lavras.
- AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M. & BERGAMIN FILHO, A. 2011. Manual de Fitopatologia. Piracicaba: Agronômica Ceres. 1(4): 704 p.
- ARMSTRONG, G.M. & ARMSTRONG, J.K. 1978. A new race (race 6) of the cotton-wilt fusarium from Brazil. Plant Disease Reporter, 62(5): 421-423.
- ARREBOLA, E.; SIVAKUMAR, D. & KORSTEN, L. 2010. Effect of volatile compounds produced by *Bacillus* strains on postharvest decay in citrus. Biological Control, 53: 122-128.
- ASSIGBETSE, K.B.; FERNANDEZ, D.; DUBOIS, M.P. & GEIGER, J. P. 1994. Differentiation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* races on cotton by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analyses. Phytopathology, 84(6): 622-626.
- BAAYEN, R.P.; O'DONNELL, K.; BONANTS, P.J.M.; CIGELNIK, E.; KROON, L.P.N.M.; ROEBROECK, E.J.A. & WAALWIJK, C. 2000. Gene genealogies and AFLP analyses in the *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and nonmonophyletic formae speciales causing wilt and rot disease. Phytopathology, 90(8): 891-900.
- BELTRÃO, N.E.M. 1999. O agronegócio do Algodão no Brasil. Brasília: Embrapa CTT/EMBRAPA-CNPA. 2: 55.
- BORÉM, A. & FREIRE, E.C. 2014. Algodão do plantio à colheita. Ed. UFV. Viçosa.

- BOSSOLA, J.J. & RUSSEL, L.D. 1998. Electron Microscopy. 2 ed. Jones and Bartlett Publishers, Boston.
- BRADBURY, J.F. 1986. Guide to plant pathogenic bacteria. CAB International. Aberystwyth.
- CHAURASIA, B.; PANDEY, A.; PALNI, L.M.; TRIVEDI, P.; KUMAR, B. & COLVIN, N. 2005. Diffusible and volatile compounds produced by an antagonistic *Bacillus subtilis* strain cause structural deformations in pathogenic fungi *in vitro*. Microbiology, 160: 75-81.
- CIA, E. 1977. Ocorrência e conhecimento das doenças de algodoeiro annual *Gossypium hirsutum* L. no Brasil. Summa Phytopatologica, 3(3): 167-193.
- CIA, E.; FUZATTO, M.G; PIZZINATTO, M.A.; PETTINELLI JÚNIOR, A.; PAULO, E.M.; ZIMBACK, L.; SILVA, M.A.; BORTOLETTO, N. & VASCONCELOS, A.S.A. 1999. Comportamento de novas cultivares e linhagens na presença de doenças que ocorrem na cotonicultura da região meridional do Brasil. In: II Congresso Brasileiro de Algodão, Ribeirão Preto. Anais. EMBRAPA/CNPA. p. 441-443.
- CIA, E. & SALGADO, C.L. 2005. Doenças do algodoeiro (*Gossypium* spp.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. & RESENDE, J.A.M. (Ed.). Manual de Fitopatologia: doenças de plantas cultivadas. São Paulo: Ceres. 2: 41-52.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. Acesso em: 15 jul. 2015.
- CRANE, J.M.; GIBSON, D.M.; VAUGHAN, R.H. & BERGSTROM, G.C. 2013. Iturin Levels on Wheat Spikes Linked to Biological Control of *Fusarium* Head Blight by *Bacillus amyloliquefaciens*. Phytopathology, 103(2): 146-155.
- DAVIS, R.D.; MOORE, N.Y. & KOCHMAN, J.K. 1996. Characterization of a population of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* causing wilt of cotton in Australia. Australian Journal of Agricultural Research, 47:1143-1156.

- DAVIS, R.M.; COLYER, P.D.; ROTHROCK, C.S. & KOCHMAN, J.K. 2006. Fusarium wilt of cotton: diversity and implications for management. *Plant Disease*, 90(6): 692-703.
- DENNIS, C. & WEBSTER J. 1971a. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. I. Production of non-volatile antibiotic. *Transactions British Mycological Society*, 57: 25-39.
- DENNIS, C. & WEBSTER J. 1971b. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. III. Hyphal interactions. *Transactions British Mycological Society*, 57: 363-369.
- DUNLAP, C.A.; SCHISLER, D. A.; PRICE, N. P. & VAUGHN, S. F. 2011. Cyclic lipopeptide profile of three *Bacillus subtilis* strains; antagonists of *Fusarium* head blight. *Journal of Microbiology*, 49: 603-609.
- DUTTA, S.; MISHRA, A.K. & DILEEP KUMAR, B.S. 2008. Induction of systemic resistance against fusarial wilt in pigeon pea through interaction of plant growth promoting rhizobacteria and rhizobia. *Soil Biology and Biochemistry*, 40: 452-461.
- GONG, A.D.; LI, H.P.; YUAN, Q.S.; SONG, X.S.; YAO, W.; HE, W.J.; ZHANG, J.B. & LIAO, Y.C. 2015. Antagonistic mechanism of iturin A and plipastatin A from *Bacillus amyloliquefaciens* S76-3 from wheat spikes against *Fusarium graminearum*. *PLoS ONE*, 10(2): 1-18. e0116871. doi:10.1371/journal.pone.0116871.
- GOTO, M. 1990. *Fundamentals of bacterial plant pathogens*. Academic Press, San Diego.
- GUPTA, R. & VAKHLU, J. 2015. Native *Bacillus amyloliquefaciens* W2 as a potential biocontrol for *Fusarium oxysporum* R1 causing corm rot of *Crocus sativus*. *European Journal of Plant Pathology*, 143: 123-131.
- IAMAMOTO, M.M. 2005. *Doenças foliares do algodoeiro*. 2<sup>a</sup> ed. Funep, Jaboticabal.
- KATAN, T. & KATAN, J. 1988. Vegetative-compatibility grouping of *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* from tissue and the rhizosphere of cotton plants. *Phytopathology*, 78(6): 852-855.

- KHIYAMI, M.A.; OMAR, M.R.; KAMEL AHMED ABD-ELSALAM, K. A. & ALY, A. A. E. 2014. *Bacillus*-based biological control of cotton seedling disease complex. *Journal of Plant Protection Research*, 54(4): 340-348.
- KIM, D.H.; MARTYN, R.D. & MAGILL, C.W. 1993. Mitochondrial DNA (mtDNA) – relatedness among *Formae speciales* of *Fusarium oxysporum* in the Cucurbitaceae. *Phytopathology*, 83(1): 91-97.
- KRUG, H.P. 1936. *Fusarium* como causador da murcha do algodoeiro no Brasil. *In: Reunião de Phytopatologistas do Brasil*, 1., 1936, Rio de Janeiro. Annaes... Rio de Janeiro: Instituto de Biologia Vegetal, p. 319-321.
- LOBO JR, M. & ABREU, M.S. 2000. Inibição do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* por metabólitos voláteis produzidos por alguns antagonistas em diferentes temperaturas e pH's. *Ciência e Agrotecnologia*, 24(2): 521-526.
- LORI, G.; EDEL-HERMANN, V.; GAUTHERON, N. & ALABOUVETTE, C. 2004. Genetic diversity of pathogenic and nonpathogenic populations of *Fusarium oxysporum* isolated from carnation fields in Argentina. *Phytopathology*, 94(6): 661-668.
- LUNARDON, M.T. 2007. Análise da conjuntura agropecuária safra 2007/08 algodão. 2007. Secretaria da Agricultura e do Abastecimento. Disponível em: <<http://www.seab.pr.gov.br>>. Acesso em: 23 abril. 2015.
- LUZ, W.C. 1996. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas e bioproteção. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, 4: 1-49.
- MACHADO, V.; BERLITZ, D.L.; MATSUMURA, A.T.S.; SANTIN, R.C.M.; GUIMARÃES, A.; SILVA, M.E. & FIUZA, L.M. 2012. Bactérias como agentes de controle biológico de fitonematoides. *Oecologia Australis* 16(2): 165-182.
- MANKAU, R. 1980. Biocontrol: fungi as nematode control agents. *Journal of Nematology*. 12(4): 244-252.
- MONNERAT, R.G.; BATISTA, A.C.; MEDEIROS, P.T.; MARTINS, E.; MELATTI, V.M.; PRAÇA, L.B.; DUMAS, V.; DEMO, C.; FALCÃO, R. & BERRY, C. 2007.

- Characterization of Brazilian *Bacillus thuringiensis* strains active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatalis*. *Biological Control*, 41: 291-295.
- PATEL, H.; TSCHEKA, C.; EDWARDS, K.; KARLSSON, G. & HEERKLOTZ, H. 2011. All-or-none membrane permeabilization by fengycin-type lipopeptides from *Bacillus subtilis* QST713. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1808: 2000-2008.
- PUNJA, Z.K. & UTKHEDE, R.S. 2003. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. *Trends in Biotechnology*, 21: 400-407.
- ROMERO, D.; VICENTE, A.; RAKOTOALY, R.H.; DUFOUR, S.E.; VEENING, J.W.; ARREBOLA, E.; CAZORLA, F.M.; KUIPERS, O.P.; PAQUOT, M. & GARCÍA1, A.P. 2007. The Iturin and Fengycin Families of Lipopeptides Are Key Factors in Antagonism of *Bacillus subtilis* Toward *Podosphaera fusca*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(4): 430-440.
- SCHROTH, M.N. & HANCOCK, J.G. 1982. Disease suppressive soil and root colonizing bacteria. *Science*. 216(5453): 1376-1381.
- SERRA, I.M.R.S. & SILVA, G.S. 2005. Caracterização biológica e fisiológica de isolados de *Sclerotium rolfsii* obtidos de pimentão no Estado do Maranhão. *Fitopatologia Brasileira*, 30: 61-66.
- SHIFA1, H.; GOPALAKRISHNAN, C. & VELAZHAHAN, R. 2015. Efficacy of *Bacillus subtilis* G-1 in suppression of stem rot caused by *Sclerotium rolfsii* and growth promotion of groundnut. *Plant Pathology*, 8(1): 111-118.
- SIDDIQUI, Z.A. & MAHMOOD, I. 1999. Role of bacteria in the management of plantparasitic nematodes: a review. *Bioresource Technology*, 69(2): 167-179.
- SILVA, F.A. & AZEVEDO, C.A.V. 2016. ASSISTAT. Software Assistência Estatística. Disponível em: <http://www.assistat.com/indexp.html>. Acesso em: 12 mar. 2016.
- SOARES, P.L.M. & SANTOS, J.M. 2006. Utilização de fungos nematofágos no controle biológico de fitonematoides. In: BORTOLI, S.A.; BOIÇA JR, A.L.; OLIVEIRA, J.E.M.

Agentes de controle biológico: metodologia de criação, multiplicação e uso. Jaboticabal: FUNEP, p. 281-329.

STIRLING, G.R. 1991. Biological control of plant parasitic nematodes. CABI Publishing, Wallingford.

STURZ, A.V. & NOWAK, J. 2000. Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops. *Applied Soil Ecology*, 15(2): 183-190.

TIAN, B.; YANG, J. & ZHANG, K.Q. 2007. Bacteria used in the biological control of plantparasitic nematodes: populations, mechanisms of action, and future prospects. *FEMS Microbiology Ecology*, 61(2): 197-213.

VEIGAS, A.P. 1935. A murcha do algodoeiro. *Revista de Agricultura*, 10(½): 49-51.

ZHANG, X.Y.; LI, B. Q.; WANG, Y.; GUO, Q.G.; LU, X.Y.; LI, S. & MA, P. 2013. Lipopeptides, a novel protein, and volatile compounds contribute to the antifungal activity of the biocontrol agent *Bacillus atropaeus* CAB-1. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97: 9525-9534.

# CONCLUSÕES GERAIS

---

---

## CONCLUSÕES GERAIS

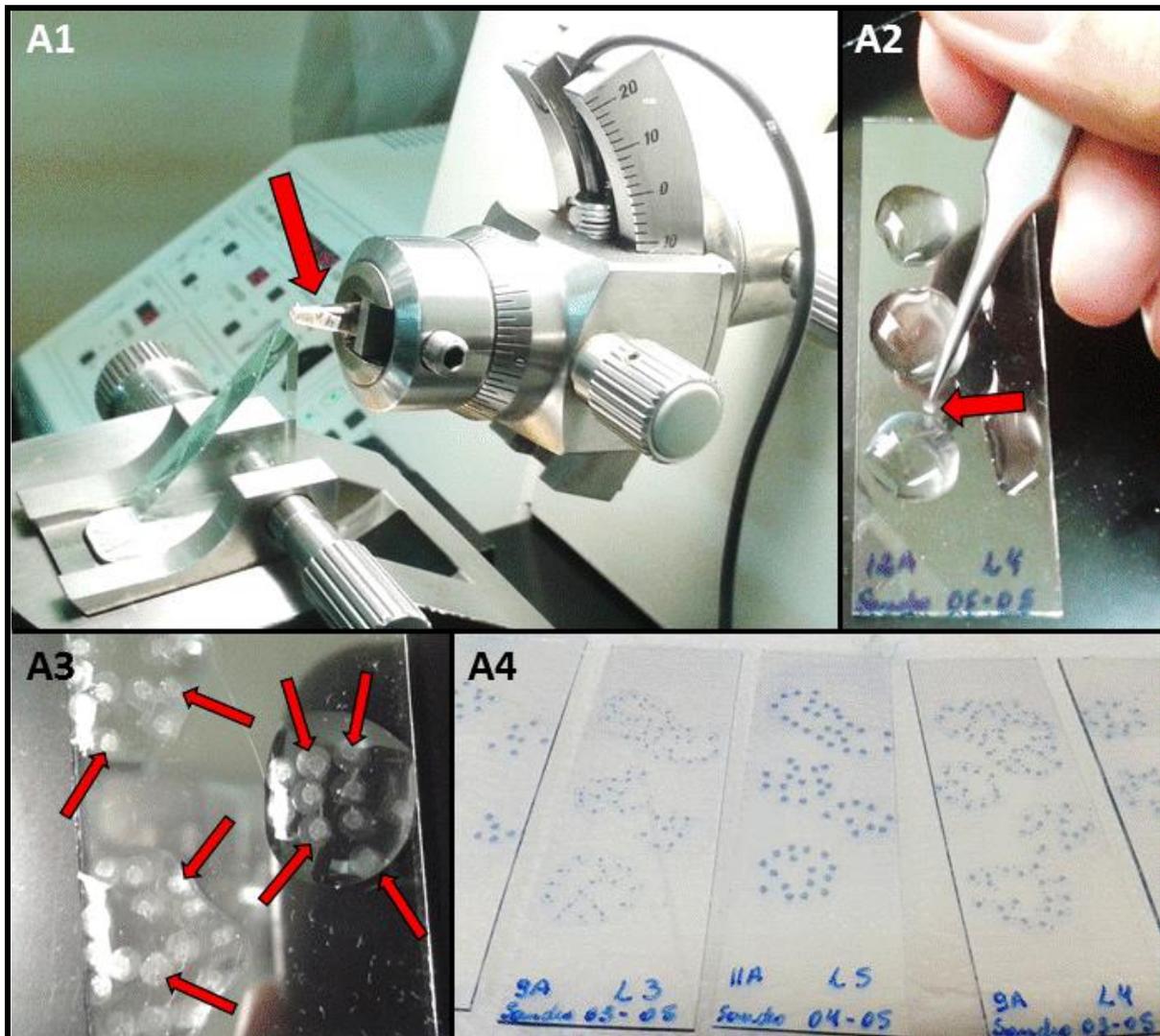
- A utilização do organismo modelo *Caenorhabditis elegans* em ensaios preliminares de seleção de estirpes de *Bacillus* mostra-se uma ferramenta promissora na triagem bactérias para controle de fitonematoides;
- *Bacillus*, além de promoverem o crescimento de plantas, podem proporcionar proteção inicial às raízes das plantas à penetração de *M. incognita* e são capazes de induzir resistência sistêmica das plantas ao parasita.
- Com a realização do trabalho, foi possível identificar espécies de *Bacillus* com ação tóxica a *Fusarium oxysporum* indicando-as como potenciais agentes antagônicos deste patógeno, sugerindo sua utilização em tratamento de sementes.

# ANEXOS

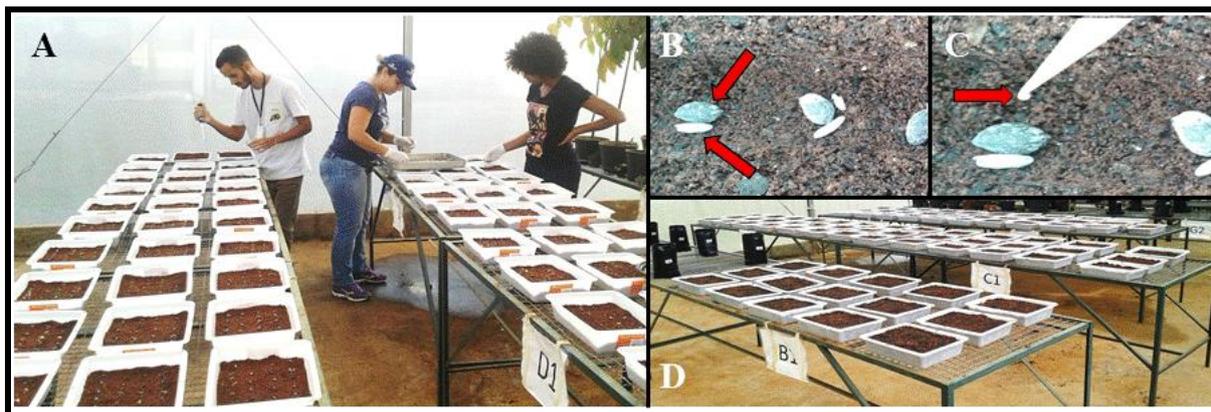
---

---

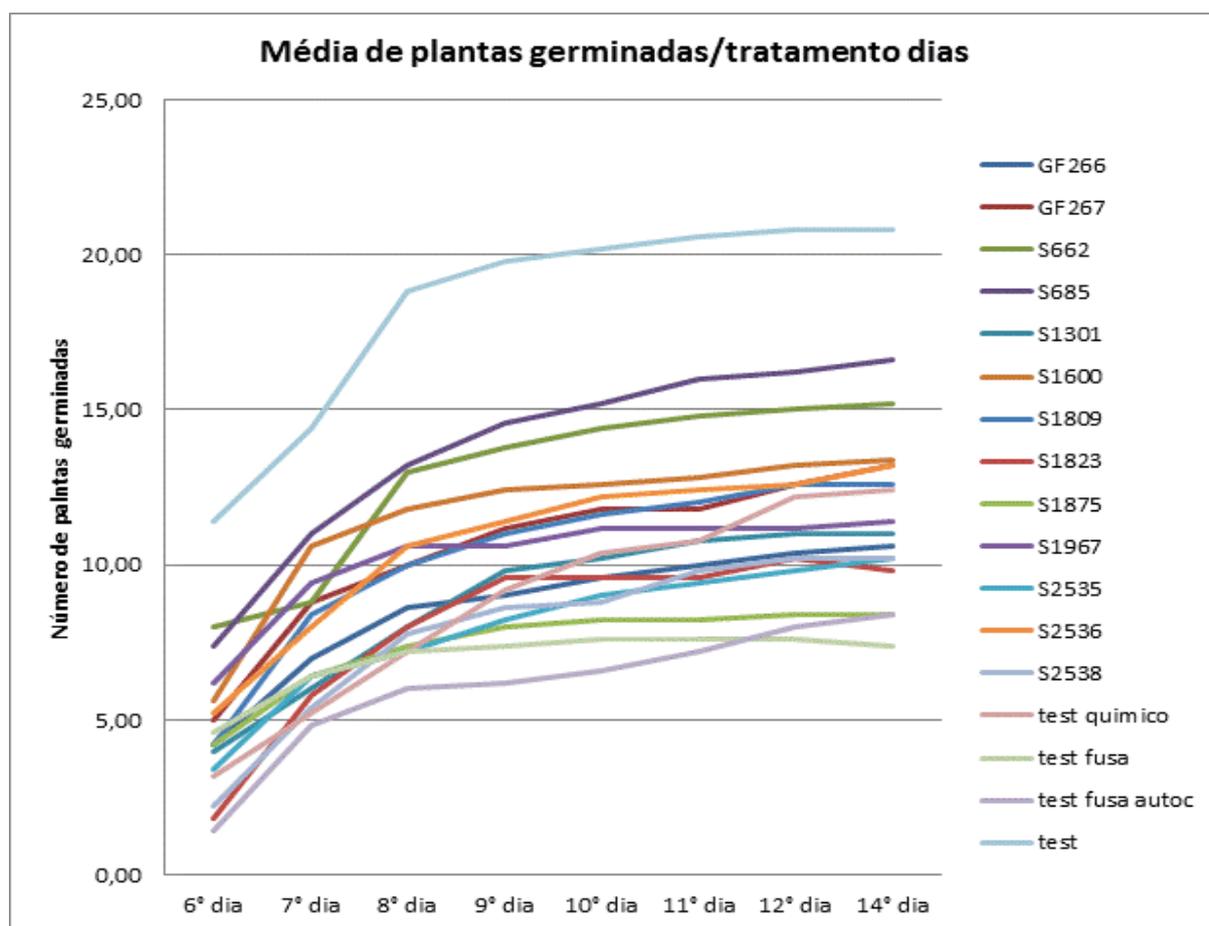
## ANEXOS



**ANEXO 1:** Preparação de cortes e lâminas para histopatologia. **A1-** imagem do micrótomo com seta vermelha apontando para o bloco de resina a ser cortado; **A2-** confecção de lâmina com setas apontando corte a ser acondicionado sobre gota d'água; **A3-** vários cortes acondicionados sobre gotas d'água, setas indicativas e **A4-** lâminas coradas com azul de toluidina e prontas para visualização ao microscópio ótico.



**ANEXO 2:** Experimento na casa de vegetação; **A-** montagem do ensaio com plantio das sementes e inoculação; **B-** seta vermelha superior apontando para semente de algodão e seta vermelha inferior apontando para semente de arros com *Fusarium* crescido; **C-** inoculação de suspensão bacteriana sobre a semente de algodão e **D-** vista panorâmica do ensaio montado.



**ANEXO 3:** Curvas de germinação das sementes de algodão tratadas com *Bacillus* para controle de *Fusarium* em casa de vegetação.