



**Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Fitopatologia
Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia**

**Ação nematicida de *Bacillus methylophilicus* sobre
Meloidogyne enterelobii e alterações fisiológicas induzidas pelo
nematoide em goiabeiras tratadas com o bionematicida**

Karoliny de Almeida Souza

Brasília –DF

2023

**Ação nematicida de *Bacillus methylotrophicus* sobre
Meloidogyne enterelobii e alterações fisiológicas induzidas pelo
nematóide em goiabeiras tratadas com o bionematicida**

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

Orientador: Prof. Juvenil Enrique Cares

Brasília –DF

2023

FICHA CATALOGRÁFICA

Souza, Karoliny de
SS729m Ação nematicida de *Bacillus methylotrophicus* sobre *Meloidogyne enterelobii* e alterações fisiológicas induzidas pelo nematoide em goiabeiras tratadas com o bionematicida / Karoliny de Souza; orientador Juvenil Enrique Cares; coorientador Pontes Nadson. -- Brasília, 2023.

138 p.

Tese (Doutorado em Fitopatologia) -- Universidade de Brasília, 2023.

1. Nematoide das galhas. 2. Alterações fisiológicas. 3. Goiaba. 4. Controle biológico. I. Cares, Juvenil, orient. II. Nadson, Pontes, co-orient. III. Título.

Dedicatória

Primeiramente, dedico este trabalho a Deus por me proporcionar a vida e saúde para correr atrás dos meus sonhos e objetivos; por sempre me iluminar e abençoar, estando sempre comigo pelos caminhos da vida e pela oportunidade de estar findando mais essa etapa da minha vida. Aos meus pais Adilson Alves e Zilma Gonçalves que sempre incentivaram a me dedicar ao estudo, obrigada por todo suporte e esforço; ao meu esposo Marcos Filipe, por compartilhar sua vida comigo, por toda palavra de apoio e incentivo. A todos que de alguma forma colaboraram para minha formação e ajudaram a chegar até aqui. É com enorme gratidão e carinho que dedico todos estes dias e horas de trabalhos para aqueles que sempre apoiaram e confiaram em mim!

Gratidão

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, pela minha vida, por minha saúde, por toda proteção, paz de espírito e luz pelos caminhos da vida e pela sabedoria a mim designada.

Ao programa de pós-graduação em Fitopatologia da Universidade de Brasília.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo suporte financeiro durante esses anos.

Ao Instituto Federal Goiano Campus Morrinhos no nome do professor Dr. Nadson de Carvalho Pontes pelo suporte.

Ao Prof. Cleber Furlanetto pela orientação inicial do trabalho, pela paciência, empolgação e ensinamentos que foram de grande importância para a conclusão da tese.

Ao meu orientador Prof. Juvenil Enrique Cares pela orientação, ensinamentos, compreensão, tranquilidade, atenção, paciência, incentivo, apoio, pelo esforço e empenho. Obrigada por tudo, sou imensamente grata.

Ao meu esposo Marcos Filipe por todo incentivo, apoio, amizade, ajuda, paciência nas horas que mais precisei.

Aos meus pais Adilson Alves e Zilma Gonçalves pelo suporte e apoio, por se sacrificarem diversas vezes por mim.

A todos os professores que contribuíram para minha formação, pela paciência por sempre ensinarem o lado teórico e prático das disciplinas.

Aos membros da banca pela disponibilidade e contribuições de grande valia para enriquecimento da tese.

A todos que de alguma forma ajudaram no decorrer do experimento.

A todas as pessoas que colaboraram comigo para a conclusão das disciplinas e conseqüentemente para minha formação profissional.

Muito obrigada

Trabalho realizado junto ao Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação do Professor **Juvenil Enrique Cares**, com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, vinculada ao Ministério da Educação (CAPES) e do Instituto Federal Goiano Campus Morrinhos.

Ação nematicida de *Bacillus methylotrophicus* sobre *Meloidogyne enterelobii* e alterações fisiológicas induzidas pelo nematoide em goiabeiras tratadas com o nematicida

KAROLINY DE ALMEIDA SOUZA

TESE APROVADA em 12/12/2023 por:

Dr. Jadir Borges Pinheiro
Embrapa Hortaliças

Prof. Jansen Rodrigo Pereira Santos
Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Maurício Rossato
Universidade de Brasília

Prof. Juvenil Enrique Cares
Orientador (Presidente)

BRASÍLIA – DF
BRASIL

2023

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	10
GENERAL ABSTRACT.....	12
INTRODUÇÃO GERAL	14
CAPÍTULO I: Revisão de literatura.....	15
Cultura da goiaba.....	15
<i>Meloidogyne</i> spp.....	19
Influência de <i>Meloidogyne</i> spp. em trocas gasosas de plantas	23
Controle de <i>Meloidogyne</i> spp.....	28
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
CAPÍTULO II: Potencial nematicida de <i>Bacillus methylotrophicus</i> sobre ovos e juvenis de <i>Meloidogyne enterolobii</i>	44
RESUMO	44
ABSTRACT	45
1 INTRODUÇÃO.....	46
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	47
2.1 Localização do experimento	47
2.2 Multiplicação de <i>Meloidogyne enterolobii</i>	47
2.3 Identificação e confirmação de <i>Meloidogyne enterolobii</i>	48
2.3.1 Eletroforese de Isoenzimas	48
2.3.2 PCR.....	49
2.4 Efeito <i>in vitro</i> de diferentes concentrações de ônix [®] sobre ovos de <i>Meloidogyne enterolobii</i>	49
2.4.1 Extração de ovos de <i>Meloidogyne enterolobii</i>	49
2.4.2 Tratamentos e delineamento experimental	50
2.4.3 Avaliações	50
2.5 Efeito <i>in vitro</i> de diferentes concentrações de ônix [®] sobre a mortalidade de juvenis de <i>Meloidogyne enterolobii</i>	51
2.5.1 Extração de ovos e juvenis de <i>Meloidogyne enterolobii</i> e montagem da câmara de eclosão	51
2.5.2 Tratamentos e delineamento experimental	51
2.5.3 Avaliações	52
3 RESULTADOS	52
3.1 Avaliação do efeito <i>in vitro</i> de diferentes concentrações de ônix [®] sobre ovos de <i>Meloidogyne enterolobii</i>	52
3.2 Avaliação do efeito <i>in vitro</i> de diferentes concentrações de ônix [®] sobre juvenis de <i>Meloidogyne enterolobii</i>	53
4 DISCUSSÃO.....	54
5 CONCLUSÕES	57

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
CAPÍTULO III: Estresse biótico causado por <i>Meloidogyne enterolobii</i> na fisiologia de goiabeiras tratadas com <i>Bacillus methylotrophicus</i> em casa de vegetação.....	62
RESUMO	62
ABSTRACT	64
1 INTRODUÇÃO.....	66
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	67
2.1 Localização do experimento.....	67
2.1 Multiplicação de <i>Meloidogyne enterolobii</i>	68
2.3 Identificação e confirmação de <i>Meloidogyne enterolobii</i>	68
2.3.1 Eletroforese de Isoenzimas.....	68
2.3.2 PCR.....	69
2.4 Tratamentos e delineamento experimental	70
2.5 Aplicações da bactéria, inoculação do nematoide e avaliações.....	71
2.6 Análise estatística	73
3 RESULTADOS	73
3.1 Variáveis fisiológicas	73
3.2 Variáveis nematológicas.....	76
4 DISCUSSÃO	77
5 CONCLUSÕES	82
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
CAPÍTULO IV: Estresse biótico causado por <i>Meloidogyne enterolobii</i> na fisiologia de goiabeiras tratadas com <i>Bacillus methylotrophicus</i> em campo	88
RESUMO	88
ABSTRACT	90
1 INTRODUÇÃO.....	92
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	93
2.1 Localização do experimento.....	94
2.2 Multiplicação de <i>Meloidogyne enterolobii</i>	95
2.3 Identificação e confirmação da espécie <i>Meloidogyne enterolobii</i>	95
2.3.1 Eletroforese de Isoenzimas.....	95
2.3.2 PCR.....	96
2.4 Tratamentos e delineamento experimental	97
2.5 Aplicações da bactéria e inoculação do nematoide	98
2.6 Avaliações	100
2.7 Análise estatística	102
3 RESULTADOS	103
3.1 Variáveis fisiológicas	103
3.2 Produtividade.....	107
4 DISCUSSÃO	108
5 CONCLUSÕES	113

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	114
ANEXO	119

RESUMO GERAL

SOUZA, Karoliny de Almeida. **Ação nematicida de *Bacillus methylotrophicus* sobre *Meloidogyne enterolobii* e alterações fisiológicas induzidas pelo nematoide em goiabeiras tratadas com o nematicida.** 2023. 138p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília, DF.

A interferência dos nematoides-das-galhas na fisiologia de frutíferas ainda é pouco estudada, assim como a capacidade de rizobactérias amenizar os danos fisiológicos causados por nematoides. A ausência de métodos de controle alternativos ao nematoide *Meloidogyne enterolobii* dificultam o manejo eficiente e sustentável ao meio ambiente. Os objetivos desta pesquisa foram avaliar *in vitro* o efeito de um bionematicida, de ingrediente ativo *Bacillus methylotrophicus* (*B. met*) sobre os ovos e juvenis de *M. enterolobii* e monitorar alterações na fisiologia de goiabeira inoculadas com *M. enterolobii* e tratadas com *B. met*. Foram realizados experimentos *in vitro* com ovos e juvenis de *M. enterolobii* e os tratamentos representados pelas concentrações de 1%, 10%, 25%, 50% e 70% de *B. met* e controle negativo. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado (DIC). Os tratamentos com ovos foram avaliados aos 2, 4, 6, 8 e 10 dias e os tratamentos com juvenis foram avaliados em intervalos de 24 até 96 horas. O monitoramento da atividade fisiológica da goiabeira foi avaliada em casa de vegetação e em campo e os tratamentos representados por: 1) goiabeira cv. Pedro Sato não inoculada e não tratada com *B. met* (testemunha); 2) goiabeira cv. Paluma não inoculada e não tratada com *B. met* (testemunha); 3) 'Pedro Sato' não inoculada e tratada com *B. met*; 4) 'Paluma' não inoculada e tratada com *B. met*; 5) 'Paluma' inoculada e não tratada com *B. met*; 6) 'Pedro Sato' inoculada e não tratada com *B. met*; 7) 'Pedro Sato' inoculada e tratada com *B. met* e 8) 'Paluma' inoculada e tratada com *B. met*. Os tratamentos foram dispostos em DIC e Delineamento blocos casualizados (DBC), em casa de vegetação e campo, respectivamente. Foram realizadas quatro aplicações do bionematicida no solo ao redor das mudas. Entre a segunda e a terceira aplicação as plantas foram inoculadas com *M. enterolobii*. Em casa de vegetação foram realizadas sete avaliações dos parâmetros fisiológicos (condutância estomática, eficiência de uso da água, fotossíntese e transpiração) e seis avaliações do teor de clorofila total. Aos 132 dias após a inoculação (DAI) foi determinado o índice de galhas, índice de massas de ovos e o fator de reprodução. Em campo, foram realizadas 10 avaliações dos parâmetros fisiológicos e foi estimada a produtividade. No ensaio *in vitro* *Bacillus methylotrophicus*, independente da

concentração, mostrou atividade antagônica sobre *M. enterolobii* através de danos na estrutura dos ovos e na mortalidade de juvenis. *Meloidogyne enterolobii* e *B. methylotrophicus* combinados reduziram a condutância estomática, fotossíntese e transpiração das goiabeiras durante a fase inicial do desenvolvimento da frutífera. O nematoide e a bactéria isolados e combinados reduziram a eficiência no uso da água aos 26 e 44 DAI. A partir de 44 DAI não houve alteração nos parâmetros fisiológicos avaliados. Não houve diferença no teor de clorofila total e na massa das raízes. Os parâmetros nematológicos não foram influenciados pela bactéria. Em todas as avaliações não houve padrão nas alterações ocasionados por *M. enterolobii* e *B. met* isolados e combinados. Em campo houve predomínio de redução nos parâmetros fisiológicos ocasionados pelo nematoide. A aplicação de *B. met* não atenuou os efeitos negativos do nematoide sobre a atividade fisiológica da goiabeira. *Meloidogyne enterolobii* e *B. met* isolados e combinados não alteraram a produtividade das goiabeiras.

Palavras-chave: controle biológico, fotossíntese, nematoide das galhas, *Psidium guajava*, rizobactérias.

GENERAL ABSTRACT

SOUZA, Karoliny de Almeida. **Nematicidal action of *Bacillus methylotrophicus* on *Meloidogyne enterolobii* and physiological changes induced by the nematode in guava plants treated with the bionematicide.** 2023. 138p. Doctoral Thesis in Plant Pathology – University of Brasília, Brasília, DF, Brazil.

The impact of root-knot nematodes on the physiology of fruit trees remains a relatively unexplored area, as does the potential of rhizobacteria to mitigate the physiological damage inflicted by these nematodes. The lack of viable alternative control methods for the nematode *Meloidogyne enterolobii* poses challenges for effectively and sustainably managing the environment. This study aimed to assess the *in vitro* efficacy of a bionematicide—*Bacillus methylotrophicus* (*B. met*) on the eggs and juveniles of *M. enterolobii*. Additionally, it sought to monitor changes in the physiology of guava trees inoculated with *M. enterolobii* and treated with *B. met*. *In vitro* experiments involved testing various concentrations (1%, 10%, 25%, 50%, and 70%) of *B. met* on eggs and juveniles of *M. enterolobii*, along with a negative control, using a completely randomized design (DIC). Evaluation of egg treatments occurred over 2, 4, 6, 8, and 10 days, while juvenile treatments were assessed at intervals of 24 to 96 hours. Monitoring the physiological activity of guava trees was conducted in both greenhouse and field settings. Treatments included: guava cv. Pedro Sato and guava cv. Paluma (both not inoculated and untreated with *B. met*, serving as controls); variations of guava inoculated or treated with *B. met*; and combinations thereof. These treatments were arranged using DIC and randomized block design (DBC) in the greenhouse and field, respectively. Four applications of the bionematicide were made to the soil around the plants, with *M. enterolobii* inoculation occurring between the second and third application. In the greenhouse, seven assessments of physiological parameters and six assessments of total chlorophyll content were conducted. At 132 days after inoculation (DAI), measures such as the gall index, egg mass index, and reproduction factor were determined. Field evaluations encompassed 10 assessments of physiological parameters alongside productivity estimation. The *in vitro* tests revealed that *Bacillus methylotrophicus*, regardless concentration, exhibited antagonistic activity against *M. enterolobii*, damaging egg structures and inducing juvenile mortality. The combined presence of *Meloidogyne enterolobii* and *B. methylotrophicus* led to reduced stomatal conductance, photosynthesis, and transpiration during the initial fruit development phase in guava trees. However, no alterations were observed in total chlorophyll content and root mass. Interestingly, the

nematological parameters remained unaffected by the bacteria. Despite these findings, no consistent patterns emerged regarding changes caused by *M. enterolobii*, *B. met* alone, or their combination across all evaluations. In the field, the nematode predominantly influenced the reduction in physiological parameters, with the application of *B. met* failing to mitigate the nematode's negative effects on guava tree physiology. Importantly, neither *M. enterolobii* nor *B. met*, alone or combined, affected the productivity of guava trees."

Keywords: biological control, photosynthesis, root-knot nematode, *Psidium guajava*, rhizobacteria.

INTRODUÇÃO GERAL

A Índia é o principal produtor de frutos que pertencem do grupo da goiaba (magostão e manga), o Brasil ocupa a 7^o posição. Na safra de 2022 o Brasil produziu cerca de 564.764 toneladas de goiaba em área colhida de 22.630 hectares. Sendo o estado de Pernambuco o principal produtor brasileiro (IBGE, 2023). As características edafoclimáticas do Brasil, assim como as características físicas e químicas do solo permitiram fácil adaptação da frutífera às condições brasileiras. A modernização do cultivo e as novas tecnologias implementadas em toda a cadeia produtiva permitiu aumento na produtividade e maior valor agregado ao fruto, uma vez que toda as partes vegetativas da goiaba podem ser utilizada para diversos fins, sendo que os produtos derivados da goiaba possuem boa aceitabilidade e valorização no mercado interno e externo (Souza *et al.*, 2022).

A goiaba enfrenta desafios de origens bióticas como a suscetibilidade a fungos, bactérias, vírus e nematoides que prejudicam e podem inviabilizar o cultivo da frutífera (Rai *et al.*, 2010; Padilla-Ramirez *et al.*, 2012). Dentre os nematoides-das-galhas *Meloidogyne enterolobii* Yang & Eisenback, 1983 é considerado o principal problema fitossanitário da goiabeira, sendo um grande obstáculo à produtividade assim como ao aumento de produção (Fisher *et al.*, 2007; Pommer & Santos, 2013; Santos *et al.*, 2020; Souza *et al.*, 2022).

Esse nematoide foi relatado pela primeira vez no Brasil em 2001 nos estados de Pernambuco e Bahia, em pomares de goiaba no Vale do São Francisco (Carneiro *et al.*, 2001). Entre 2011 e 2014 *M. enterolobii* foi relatada em várias regiões brasileiras, exceto nos estados do Amapá, Amazonas, Acre, Rondônia e Roraima onde ainda não existem relatos da presença desse patógeno (EPPO, 2023). Os nematoides se locomovem poucos metros por ano.

Meloidogyne enterolobii foi identificado multiplicando em outras culturas como feijão, café, algodão, beringela, mamão, pimenta, batata, soja, tomate, plantas ornamentais, medicinais e espécies de plantas daninhas (Carneiro *et al.*, 2001; Curtis *et al.*, 2009; Gomes *et al.*, 2013; Luquini *et al.*, 2019).

As galhas formadas nas raízes dificultam a absorção e a translocação de água pela planta e ocasionam estresse hídrico na planta. Essa situação predispõe a planta ao fechamento dos estômatos que inibe a captação e assimilação de CO₂ e pode inviabilizar

o processo fotossintético. Assim, o nematoide é capaz de induzir alterações fisiológicas na planta, que muitas vezes passam despercebidas, já que as plantas com frequência não demonstram momentaneamente sinais de alterações fisiológicas tão específicos, contudo os danos são percebidos, posteriormente pela redução na produtividade. Pesquisas já comprovaram a capacidade dos nematoides-das-galhas de reduzir a condutância estomática, taxa fotossintética e a transpiração de espécies vegetais (Strajnar *et al.*, 2012).

Ainda não é possível o controle genético de *M. enterolobii*. Além do que, o nematoide é capaz de multiplicar em plantas portadoras de genes de resistência, que são eficientes no controle de outras espécies de *Meloidogyne* (Brito *et al.*, 2007; Kiewnick *et al.*, 2009; Cantu *et al.*, 2009). Dessa forma, a capacidade de suplantar a resistência, a característica polífaga do nematoide, torna *M. enterolobii* uma espécie virulenta e de difícil controle.

Uma opção é a busca do controle biológico por meio de fungos e principalmente, bactérias do gênero *Bacillus*. Vários estudos já comprovaram a eficiência de diferentes espécies de *Bacillus* no controle de nematoides-das-galhas (Zhou *et al.*, 2016; Cheng *et al.*, 2019; Ji *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2023). *Bacillus* spp. podem controlar de forma indireta o nematoide, pela indução de resposta de defesa na planta dificultando a penetração de J2, podem interferir na reprodução das fêmeas, e eclosão de juvenis, na sobrevivência nos estádios iniciais de desenvolvimento do nematoide e provocar a morte dos indivíduos adultos (Sikora, 1992; Ramamoorthy *et al.*, 2001; Dong & Zhang, 2006; Machado *et al.*, 2012).

O efeito de *Bacillus* na mitigação dos efeitos de *M. enterolobii* no processo fisiológico das plantas segue pouco conhecido. Dessa forma, os objetivos da pesquisa foram *avaliar in vitro* o efeito de um bionemático, de ingrediente ativo *Bacillus methylotrophicus* (*B. met*) sobre os ovos e juvenis de *M. enterolobii* e monitorar alterações na fisiologia de goiabeira inoculadas com *M. enterolobii* e tratadas com *B. met*.

CAPÍTULO I: Revisão de literatura

Cultura da goiaba

A goiaba pertence à família *Myrtaceae* que contempla 80 gêneros. O gênero *Psidium* apresenta 150 espécies, sendo *Psidium guajava* L. a espécie mais plantada e de maior valor econômico. *Psidium guajava* é nativa da América Tropical, região localizada

entre o México e o Peru e pode ser encontrada em regiões tropicais e subtropicais devido à sua adaptação a diferentes condições edafoclimáticas e pela propagação seminífera (Risterucci *et al.*, 2005; Pommer & Murakami, 2006; Gonzaga Neto, 2007; Oliveira *et al.*, 2012; Pereira *et al.*, 2016). Os espanhóis foram os responsáveis pelo início da propagação da goiaba no mundo, levando-a do Pacífico às Filipinas e Índia. Posteriormente, a goiaba foi introduzida no arquipélago Malaio, Havaí, Ásia e África. No entanto, o primeiro local de cultivo da goiabeira data de 1526 nas Ilhas Caribenhas (Pommer & Murakami, 2006).

No mundo, a goiaba é considerada a principal fruta tropical de tamanho reduzido, e fica à frente de frutas como Longan (*Dimocarpus longan* Lour.), Lichia (*Litchi chinensis* Sonn.), Durião (*Durio zibethinus* L.), Maracujá (*Passiflora edulis* Sims), Rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) e Mangostão (*Garcinia mangostana* L.). O maior produtor de goiaba é a Índia com 40,4% da produção mundial, seguido pela China (10%), Tailândia (7,4%), Indonésia (4,7%), México (4,7%), Paquistão (3,5%) e Brasil, com a sétima posição, com 3% da produção mundial. O México é o maior exportador de goiaba e, o Brasil ocupa o 5º lugar (6,8%) sendo os Estados Unidos o maior importador da fruta. No Brasil, estima-se que a cadeia produtiva da goiaba movimentou 40 milhões de dólares ao ano, incluindo o cultivo convencional e orgânico, este último realizado principalmente por pequenos produtores, com cultivo em áreas de até 5 ha (Gomes *et al.*, 2013; Altendorf, 2018; Tridge, 2023).

A produção brasileira de goiaba vem crescendo tanto para o abastecimento do mercado interno e externo. Independentemente do número de safras no ano em cada pomar, assim de modo geral em 2021, o Brasil produziu 552.393 toneladas de goiaba em 22.137 ha de área colhida. A região Nordeste concentra a maior produção, com destaque para a região do Vale do São Francisco, com produção de 281.364 toneladas em 2022. Vale destacar que o cultivo irrigado favorece a produção de goiaba durante todo o ano. Em seguida as maiores produções concentram nas regiões Sudeste (221.015 t), Sul (30.823 t), Centro-Oeste (12.495 t) e Norte (6.696 t) (Figura 1). O estado de Pernambuco (PE) tem participação destacada na produção nordestina, na safra 2021 produziu 198.754 toneladas o que equivale a mais de 60% da produção do Nordeste. São Paulo, Bahia, Paraná e Ceará apresentaram evolução na produção brasileira de goiaba (Gonzaga Neto, 2007; Vitti *et al.*, 2020; IBGE, 2023).

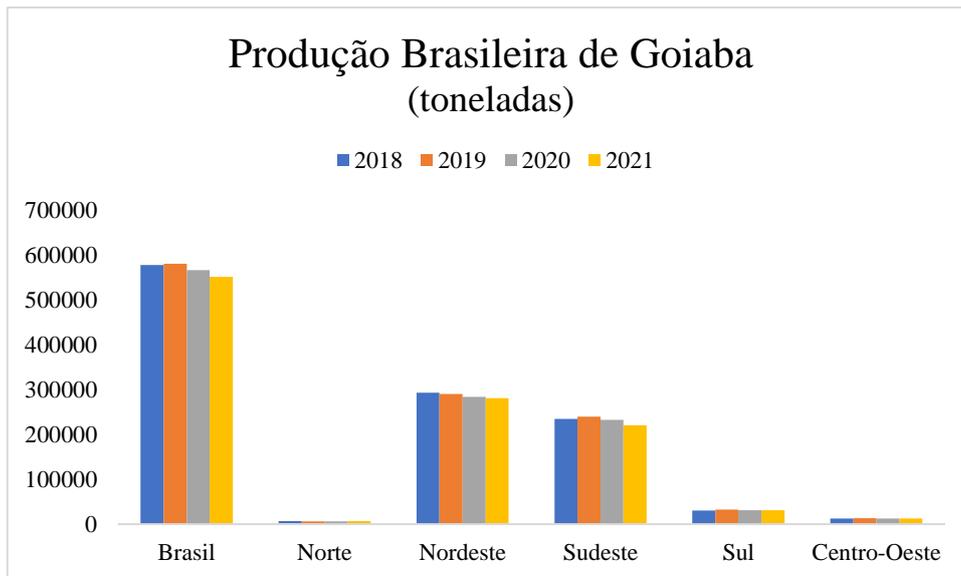


Figura 1. Produção Brasileira de goiaba (IBGE, 2023).

O aumento na produção de goiaba no Brasil deve-se, principalmente ao processamento para a produção de suco concentrado, néctares, polpas de purê enlatado, fruta em calda, geleias, compotas, sorvetes e molho agridoce. A grande aceitação da goiaba no mercado é devido ao seu valor nutricional, com elevados teores de vitamina C, elevada concentração de fibras e licopeno, além das vitaminas A, B1, B2 e B6 e à presença de um carotenoide de ação antioxidante. A presença de flavonoides na folha possibilita o tratamento de doenças gastrointestinais (Rozane *et al.*, 2003; Feria-Romero *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2012; Vitti *et al.*, 2020). As cultivares com maior concentração de flavonoides são identificadas com base em marcadores RAPD de 590-620 bp, 370 bp e 460-480 bp (Rozane *et al.*, 2003; Feria-Romero *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2012; Vitti *et al.*, 2020).

A goiaba tem sido explorada para uso medicinal. As folhas são utilizadas no preparo de chá para o tratamento de diarreias e o fruto tem potencial na farmacologia, pois é fonte de compostos químicos de atividades antioxidantes, antidiabéticos, antipiréticos, antifúngicos, antimicrobianos, hipotensor, anti-inflamatório, analgésico e na prevenção de câncer (Uzzaman *et al.*, 2018).

A goiabeira é uma frutífera perene de pequeno a médio porte, que pode atingir até nove metros de altura. O tronco é tortuoso, apresenta casca lisa em finas lâminas, de cor castanha, que se desprendem com o tempo. Os frutos são do tipo baga globoso, ovoide ou piriforme de superfície lisa ou rugosa, polpa branca ou vermelha e morfologia variável, de 4 a 12 cm de comprimento, sementes numerosas, reniformes ou achatadas, de cor amarelada. As folhas opostas, renovadas a cada primavera, apresentam formato oblongo

a elíptico, cor verde-clara, pilosas quando jovens e com nervuras bem-marcadas na página inferior. As flores são brancas, axilares, solitárias ou em pedúnculos de 2 a 3 flores e são hermafroditas (Gonzaga Neto, 2007; Oliveira *et al.*, 2012).

A frutificação e a formação do sistema radicular são influenciadas pelo modo de propagação. Quando à propagação é seminífera, a floração ocorre no início do 2º ou 3º ano após o plantio definitivo e com a formação de raízes pivotantes. Quando a propagação é por estaquia ou enxertia, a floração tem início precocemente ao 7º ou 8º mês de idade e o sistema radicular predominante é o adventício com ausência de raiz principal (Gonzaga Neto, 2007; Oliveira *et al.*, 2012).

No Brasil, a maioria dos pomares comerciais é formada por plantas de propagação vegetativa, com pomares com produção de frutos de polpa branca, destinados principalmente ao mercado externo por apresentar vida pós-colheita prolongada. Já os pomares com produção de frutos de polpa vermelha são destinados especialmente ao mercado interno. Existem mais de 400 cultivares de goiaba que surgiram devido à alta heterogeneidade e a fecundação cruzada, porém poucas variedades são cultivadas em escala comercial (Gonzaga Neto, 2007; Oliveira *et al.*, 2012).

Na Índia, principal produtor, as cultivares predominantes são 'Allahabad Safeda' e 'Sardar'. No Brasil, as cultivares predominantes são: Paluma (polpa vermelha), Rica (polpa vermelha), Ogawa n°1 (polpa vermelha), Ogawa n°1 (polpa branca), Ogawa n°2 (polpa vermelha), Ogawa n°3 (polpa rosada), Pedro Sato (polpa rosada), Sassaoka (polpa roseo claro), Século XXI (polpa vermelha), Kumagai branca (polpa branca), Kumagai vermelha (polpa vermelha), Guanabara (polpa rosada), Nomura (polpa branca), Pentecostes (polpa amarelada). As cultivares Paluma, Rica, Pedro Sato, Sassaoka, Ogawa e Século XXI são as predominantes no Brasil (Pommer & Murakami, 2006; Hernández-Delgado *et al.*, 2007; Dinesh & Vasugi, 2010).

A cultivar Paluma possui maior valor econômico é a mais comercializada e consumida, principalmente *in natura*; apresenta alta produtividade (50 t ha⁻¹) e origina frutos vigorosos e de sabor agradável. Por ser altamente perecível em comparação com as variedades de polpa branca, frutos desta cultivar são geralmente destinados ao mercado industrial e ao consumo *in natura*, em locais próximos às áreas de cultivo. Um diferencial dessa cultivar é a elevada produção de frutos mesmo em alta infestação da *Astropuccinia psidii* (G. Winter) Beenken, agente etiológico da ferrugem da goiabeira (Pommer &

Murakami, 2006; Hernández-Delgado *et al.*, 2007; Dinesh & Vasugi, 2010). A cultivar Pedro Sato, originada de sementes da ‘Ogawa nº1 vermelha’, é a cultivar de mesa com a casca rugosa mais apreciada no estado de São Paulo, devido à coloração rosada e à espessura da polpa, firmeza do fruto e sabor agradável. O sabor adocicado da cultivar é desencadeado pela alta concentração de açúcares, com consequente elevado teor de Brix. A propagação sexual não é eficiente devido à presença de poucas sementes no fruto (Pereira & Nachtigal, 2002; Pommer & Murakami, 2006).

No estado de São Paulo, a maioria dos produtores de goiaba possuem, nessa frutífera, a principal fonte de renda. Esta é uma situação de risco, uma vez que fatores bióticos e abióticos que se manifestarem no pomar podem inviabilizar toda a renda econômica do produtor (Oliveira *et al.*, 2012; Vitti *et al.*, 2020).

A goiaba enfrenta desafios, tais como: desenvolvimento de cultivares que expressam características morfológicas e nutritivas que sejam bem aceitas pelo consumidor, cultivares melhoradas geneticamente que atendam às exigências de cultivo, tratos culturais bem empregados e a necessidade de aperfeiçoar toda a logística desde a colheita até a mesa do consumidor. Além disso, principalmente nos primeiros meses de implantação do pomar, a goiabeira é sensível a estresse bióticos e abióticos, como a presença de plantas daninhas na entrelinha de cultivo e de patógenos, como fungos, bactérias, vírus e nematoides, que são responsáveis por prejudicar e inviabilizar o cultivo da frutífera (Rai *et al.*, 2010; Padilla-Ramirez *et al.*, 2012). *Astropuccinia psidii*, fungo do complexo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., *Sphaceloma psidii* Bitancour & Jenkins, *Erwinia psidii* Rodrigues Neto *et al.*, *Guignardia psidii* Ullasa & Rawal e *Meloidogyne* spp. são agentes etiológicos de doenças da goiabeira. Dentre os nematoides-das-galhas *Meloidogyne enterolobii* Yang & Eisenback, 1983 é considerado o principal problema fitossanitário da goiabeira (Fisher *et al.*, 2007; Pommer & Santos, 2013; Santos *et al.*, 2020).

***Meloidogyne* spp.**

O Botânico britânico Miles Joseph Berkeley (1855), foi o responsável pelo primeiro relato da interação de nematoides do gênero *Meloidogyne* com as plantas, ao identificar esse organismo em raízes de pepino cultivado em estufa, na Inglaterra. Porém, somente em 1879, Cornu descreveu a primeira espécie do nematoide-das-galhas em raízes de *Onobrychis sativa* Lam. na França. No Brasil, Göldi relatou, em 1887, uma espécie

de *Meloidogyne* em raízes de cafezais do Rio de Janeiro, à qual denominou *M. exigua*, considerada a espécie-tipo. Porém, a publicação só ocorreu em 1982. Posteriormente, Chitwood reescreveu várias espécies de *Meloidogyne*.

O gênero *Meloidogyne* pertence ao Filo Nematoda, Classe Chromadorea, Ordem Rhabditida, Subordem Tylenchina, Infraordem Tylenchomorpha, Superfamília Tylenchoidea e Família Meloidogynidae. O gênero inclui os nematoides de maior importância econômica, com cerca de 100 espécies que parasitam mais de 5.000 espécies vegetais cultiváveis ou não, em todo o mundo. Os nematoides do gênero *Meloidogyne* causam perdas mundiais de até 80 bilhões de dólares ao ano e *Meloidogyne enterolobii* isolado foi capaz de inviabilizar a produção em até 65% (Manzanilla-López *et al.*, 2004; Jones *et al.*, 2013; Philbrick *et al.*, 2020).

Meloidogyne arenaria (Neal, 1889; Chitwood, 1949), *M. incognita* (Kofoid & White, 1919; Chitwood, 1949), *M. javanica* (Treub, 1885; Chitwood, 1949) e *M. hapla* (Chitwood, 1949) são as principais espécies em nível mundial, sendo as três primeiras prevalentes em regiões tropicais e *M. hapla* comum em regiões temperadas. *Meloidogyne enterolobii* foi descrito por Yang e Eisenback (1983) em raízes de uma Fabaceae, na ilha de Hainan, na China. Em 1988 Rammah e Hirschmann identificaram, em raízes de berinjela (*Solanum melongena* L.), em Porto Rico, uma espécie que se divergiu de *M. enterolobii* em algumas características morfológicas e apresentou apenas uma banda da isoenzima malato desidrogenase, à qual denominaram *M. mayaguensis*. Posteriormente, comprovou-se tratar da mesma (EPPO, 2023). Xu *et al.* (2004) compararam sequências dos genes citocromo oxidase subunidade II (COI II) e da subunidade 16S do RNA ribossomal (rRNA) do DNA mitocondrial de *M. enterolobii* e *M. mayaguensis* e observaram identidade nas populações de espécies de *Meloidogyne* coletados em diferentes culturas na China. Também Karssen *et al.* (2012) verificaram tratar-se de sinonímia, ao compararem a morfologia e morfometria de juvenis de segundo estágio, fêmeas e machos de *M. enterolobii* e *M. mayaguensis*.

Meloidogyne enterolobii encontra-se presente nos países da África, América do Norte, América Central, América do Sul e Ásia (EPPO, 2023). No Brasil, a espécie foi relatada pela primeira vez em 2001 nos estados de Pernambuco e Bahia, em pomares de goiaba no Vale do São Francisco (Carneiro *et al.*, 2001). O último relato da presença do nematoide no Brasil foi na cultura do algodão (*Gossypium hirsutum* L.) em 2020 no estado de Minas Gerais (Galbieri *et al.* 2020). Entre 2011 e 2014 *M. enterolobii* foi

relatada em várias regiões brasileiras, exceto nos estados do Amapá, Amazonas, Acre, Rondônia e Roraima que ainda não existem relatos da presença da espécie (EPPO, 2023).

Os nematoides se locomovem poucos metros por ano. Portanto, a disseminação desses organismos é facilitada pelo homem, por meio do transporte de mudas com solo infestado, equipamentos agrícolas que transitam em áreas infestadas e posteriormente em áreas isentas do patógeno, além do manejo inadequado da água de irrigação e dos tratamentos culturais (Nyczepir *et al.*, 2009; EPPO, 2023).

Além da goiaba, *M. enterolobii* foi identificado em raízes de outras espécies vegetais cultivadas ou não. Entre as cultivadas, feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), café (*Coffea arabica* L.), algodão (*Gossypium hirsutum* L.), beringela (*Solanum melongena* L.), mamão (*Carica papaya* L.), pimenta (*Capsicum annuum* L.), batata (*Solanum tuberosum* L.), soja (*Glycine max* (L.) Merr.), tomate (*Solanum lycopersicum* L.) são citadas por diferentes autores (Carneiro *et al.*, 2001; Curtis *et al.*, 2009; Gomes *et al.*, 2013; Luquini *et al.*, 2019).

Espécies do gênero *Meloidogyne* spp. são fitopatógenos biotróficos com ciclo de vida de 4-5 semanas em condição ambiental favorável. O estilo de vida é endoparasita e as fêmeas são sedentárias. O juvenil de 2º estágio (J2) é responsável pelo início do ciclo infectivo. O J2 eclode dos ovos e a liberação de exsudados radiculares os atrai em direção às raízes. A penetração ocorre na zona de alongação da raiz, com auxílio da pressão exercida pelo estilete; este secreta substâncias provenientes das glândulas esofagianas, responsáveis pela degradação dos componentes da parede celular. O rompimento dos tecidos radiculares facilita, então, a penetração do nematoide (Tapia-Vázquez *et al.*, 2022).

Posteriormente, o nematoide movimenta-se até alcançar os tecidos parenquimáticos vasculares onde se estabelece e, com auxílio de substâncias secretadas pelo estilete, originam células gigantes, compostas por 5 a 7 células multinucleadas cujos núcleos se dividem sem citocinese (Huang & Maggenti, 1969). Essas funcionam como reservatórios nutritivos para as fêmeas durante o processo infectivo. Na região que circunda as células gigantes, ocorre a formação de tecido hiperplástico, que resulta nos sintomas típicos de galhas nas raízes. A célula gigante contém maior quantidade de aminoácidos, proteínas e ácidos nucleicos que as células vegetais saudáveis e é responsável por desviar nutrientes e fotoassimilados da planta para a nutrição da fêmea durante o processo infectivo. A formação das células gigantes garante o estabelecimento

da compatibilidade positiva entre nematoide-planta e a consequente suscetibilidade do hospedeiro (Abad *et al.*, 2009).

Os juvenis de 2º estágio (J2s) perdem a mobilidade, passando então pelos estádios J3 e J4, durante os quais não se alimentam. Ao chegarem à fase adulta, dependendo das condições ambientais e nutricionais, estes últimos diferenciam-se em fêmeas obesas ou machos vermiformes. A fêmea adulta é branco-leitosa brilhante, em forma de pêra e pode originar até 1.000 ovos depositados em uma capa protetora de matriz glicoproteica secretada pelas glândulas retais (Jones *et al.*, 2013; Shigueoka *et al.*, 2019). As alterações induzidas pelas células gigantes na morfologia e anatomia da raiz influenciam os processos que ocorrem em nível fisiológico, na planta (Nguyên *et al.*, 2014).

Em algumas situações, o J2 consegue penetrar na raiz, porém sem estabelecer o sítio de alimentação ou o desenvolvimento do sítio de alimentação é retardado. Isso pode ocorrer em plantas com níveis de resistência. O extremo da resistência é a indução da reação de hipersensibilidade (HR), caracterizada pela morte celular no local de penetração, que restringe e bloqueia o acesso do nematoide a outros tecidos da raiz (Cabasan *et al.*, 2012; Nguyên *et al.*, 2014). O ciclo infectivo varia de acordo com o nível de resistência da planta. Arroz resistente a *M. graminicola* Golden & Birchfield 1965 apresentou redução na penetração de J2, assim como desenvolvimento lento do nematoide e menor número de ovos por grama de raiz. Fêmeas de *M. enterolobii* foram observadas até 24 dias após a inoculação de tomate resistente, enquanto *M. javanica* apresenta baixa incidência de J2 aos 31 dias após a inoculação (Westerich *et al.*, 2011; Castagnone-Sereno *et al.*, 2013; Jones *et al.*, 2013).

Os sintomas diretos envolvem a formação de protuberâncias nas raízes, conhecidas como galhas, ou a formação de pontos necróticos e destruição do córtex. Sintomas reflexos na parte aérea, como redução no crescimento, amarelecimento, murcha e deformação das estruturas vegetais podem ser observados em reboleiras no campo (Westerich *et al.*, 2011; EPPO, 2014).

Plantas com genes de resistência como o *Mh* em batata (*Solanum tuberosum*), *Mir1* em soja (*Glycine max*), *N* em pimenta (*Capsicum* sp.), *N* e *Tabasco* no pimentão (*Capsicum annuum*), *Rk* em feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) e *Mi* em tomate (*Solanum lycopersicum*) apresentam suscetibilidade a *M. enterolobii* (Kiewnick *et al.*, 2009; Brito *et al.*, 2007). Tomateiro portadores do gene *Mi*, principal gene de resistência

a diferentes espécies de *Meloidogyne*, apresentaram alta taxa de multiplicação de *M. enterolobii* (Cantu *et al.*, 2009). A capacidade de suplantar a resistência, a característica polífaga do nematoide, a alta taxa reprodutiva em espécies suscetíveis e a formação de galhas mais robustas nas raízes, torna *M. enterolobii* uma espécie muito agressiva. O impacto desse nematoide é tão relevante que em 2008 essa espécie entrou para a lista de alerta da Organização Europeia e Mediterrânea de Proteção de Plantas (EPPO) como praga emergente. Posteriormente, o nematoide foi adicionado à lista de pragas quarentenárias A1 em alguns países das Américas, Europa e África, e em 2010 foi adicionado à lista de pragas quarentenárias A2 na Europa (EPPO, 2023). Existem relatos da ocorrência da espécie em Portugal (2017) e Suíça (2008), na Itália e França o nematoide foi completamente erradicado (EPPO, 2023).

Meloidogyne enterolobii apresenta 701 famílias de genes ortólogos que codificam proteínas específicas secretadas pelas glândulas esofagianas que não foram identificadas em *M. incognita* e *M. hapla*. Isso demonstra que a espécie tem um padrão único de parasitismo e, talvez, explique o comportamento diferencial na capacidade de suplantar genes dominantes de resistência, e explique também a agressividade do nematoide na planta e a manifestação dos sintomas na goiabeira (Li *et al.*, 2016).

Os nematoides indutores de sítios de alimentação influenciam em processos das plantas que estão além dos sintomas visíveis e são de difícil percepção, como processos que ocorrem em nível fisiológico da planta. As galhas radiculares e os sítios de alimentação interrompem o fluxo contínuo de água, hormônios e nutrientes da raiz para a parte aérea, pelo estabelecimento das fêmeas próximas ao cilindro vascular e, em consequência, a planta apresenta um déficit de água em toda sua estrutura, com reflexos em alterações nos mecanismos fisiológicos da planta (Bird, 1974; Ferraz, 2008; Dalastra *et al.*, 2014; Goulart *et al.*, 2019).

Influência de *Meloidogyne* spp. em trocas gasosas de plantas

A fotossíntese é o processamento da energia solar em energia química na forma de ATP e fotoassimilados utilizados na respiração e em vários processos metabólicos essenciais das plantas (Rodrigues *et al.*, 2018). O gás carbônico (CO₂) fixado da atmosfera é utilizado e reduzido em moléculas orgânicas com auxílio do ATP. A água absorvida e disponível na planta é oxidada em oxigênio (O₂) que é utilizado na respiração de organismos vivos. Todos esses processos são dependentes da luz solar. O principal

produto da fotossíntese é o açúcar em forma de moléculas orgânicas que estão envolvidos em vários processos celulares essenciais da planta. Todo o aparato de matéria seca da planta é originado do processo fotossintético, monitorado pela taxa de assimilação de CO₂ (Kluge *et al.*, 2015; Taiz *et al.*, 2017; Rodrigues *et al.*, 2018).

Os pigmentos presentes nos cloroplastos das folhas são essenciais para o eficiente desempenho da maquinaria fotossintética e são responsáveis pela absorção da energia da luz solar. As clorofilas *a* e *b* são os pigmentos mais comuns presentes em organismos fotossintetizantes. Pigmentos acessórios, tipo carotenoides, também são encontrados em menores proporções e estão relacionados aos pigmentos proteicos das antenas dos centros de reação do fotossistema I e II (PSI e PSII) e a transferência de luz para as clorofilas (Taiz *et al.*, 2017). O aumento da taxa fotossintética proporciona maiores ganhos de produtividade e são regulados através das trocas gasosas entre a planta e a atmosfera.

O principal mecanismo de controle de trocas gasosas em plantas superiores é realizado pelo estômato, e a água é a responsável pelo controle do fechamento e abertura estomática, enquanto a condutância estomática regula o grau de abertura e fechamento dos estômatos. A condutância estomática é a difusão de gases do meio ambiente para o interior das plantas através dos estômatos presentes nas folhas. A abertura estomática é dependente das condições ambientais (Taiz *et al.*, 2017). À medida que o potencial de água nas folhas diminui, os estômatos tornam-se mais sensíveis ocorrendo a redução na condutância estomática, devido ao fechamento dos estômatos. A resistência dos estômatos é responsável por controlar a perda de água pela folha e a taxa de assimilação de CO₂ necessária para a fotossíntese. As células-guardas dos estômatos são sensíveis a fatores ambientais. Qualquer mudança na intensidade e qualidade da luz, temperatura, umidade relativa e concentração de CO₂ é capaz de controlar a resposta de abertura e fechamento dos estômatos (Gomes *et al.*, 2004; Taiz *et al.*, 2017).

A transpiração é outra variável controlada pela condutância estomática e envolve a água presente no xilema que é puxada para células do mesófilo e em seguida evapora para os espaços intercelulares. Posteriormente, a água na forma de vapor atravessa os poros estomáticos contra um gradiente de concentração, sendo liberada no ambiente externo. Em plantas C₃, a razão de transpiração é o resultado da quantidade de água transpirada dividida pela quantidade de CO₂ assimilada para a fotossíntese, assim 400 moléculas de água são perdidas na transpiração por cada molécula de CO₂ fixada na fotossíntese. Dessa

forma, o valor da eficiência no uso da água é de 0,0025 (Taiz *et al.*, 2017).

Esse mecanismo depende da resistência à difusão da concentração de vapor de água entre os espaços intercelulares das folhas e da atmosfera externa. Mudanças na taxa transpiratória são impulsionadas pela temperatura e pelo potencial de água foliar que indica o estado energético da folha. Em condições ótimas de suprimento de água as plantas possuem alta taxa transpiratória; à medida que água se torna escassa a taxa transpiratória é reduzida a fim de economizar a água disponível. Em alta transpiração ocorre elevada demanda evaporativa e como forma de amenizar as plantas necessitam de maior fluxo de água (Taiz *et al.*, 2017).

Em condições de deficiência hídrica, o fechamento estomático reduz a taxa transpiratória e esta é a principal causa de redução na taxa fotossintética, devido à limitação na absorção de CO₂ nos sítios de carboxilação da planta. A redução na condutância estomática, no potencial hídrico foliar, nas taxas transpiratórias, são impulsionados pelo estresse hídrico que conduz à perda de turgescência da planta (Farquhar & Sharkey, 1982; Ferraz, 2008; Osakabe *et al.*, 2014). Em horários mais quentes do dia e com baixa disponibilidade de água, a condutância estomática diminui com intuito de reduzir as perdas de água e evitar que o potencial hídrico das folhas reduza a níveis críticos, da mesma forma a concentração interna de CO₂ (C_i) também é reduzida por causa da limitação da absorção de CO₂ (Lago *et al.*, 2011; Dalstra *et al.*, 2014). Os patógenos em íntimo contato com hospedeiros induzem modificações celulares, bioquímicas e fisiológicas nas plantas. A fotossíntese é o mecanismo fisiológico mais importante e essencial no metabolismo das plantas e talvez por isso seja o principal processo fisiológico alterado por patógenos direta e/ou indiretamente. Redução na assimilação de CO₂ e inibição do fotossistema I (PSI), danos no centro de reação do fotossistema II (PSII), perda na eficiência de transferência de elétrons, aumento da dissipação de energia por mecanismos não-fotoquímicos, limitações estomáticas, redução na concentração de pigmentos fotossintetizantes, danos estruturais aos cloroplastos e a baixa expressão de genes fotossintetizantes são mecanismos que, quando alterados, refletem no desempenho das trocas gasosas e da maquinaria fotossintética da planta (Debona *et al.*, 2014, 2016; Rodrigues *et al.*, 2018).

Para os patógenos biotróficos que causam lesões foliares, o aumento da severidade da doença é um ótimo indicativo de alterações nas trocas gasosas e na taxa fotossintética. Toxinas e enzimas líticas produzidas pelos patógenos podem reduzir a concentração total

de clorofilas ($a+b$) abundantes em plantas verdes e aumentar a razão *Chl a/b*. Porém, patógenos radiculares não induzem sintomas diretos nas folhas, mesmo assim mudanças nas trocas gasosas e na taxa fotossintética, principalmente em hospedeiros suscetíveis são observadas. A liberação de toxinas não-seletivas e enzimas líticas produzidas por patógenos que não possuem folhas como principal órgão de parasitismo são propagadas sistemicamente pela planta e podem ser responsáveis por induzir alterações nas trocas gasosas e na taxa fotossintética (Resende *et al.*, 2012; Debona *et al.*, 2014, 2016; Bermúdez-Cardona *et al.*, 2015).

Alterações bioquímicas causadas por patógenos, como a redução na atividade da rubisco, alteração nos níveis da invertase, enzima associada à hidrólise da sacarose, podem colaborar para tal efeito. Patógenos induzem a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em plantas, que em altas concentrações causam alterações em diferentes mecanismos da espécie botânica, como a destruição dos pigmentos fotossintetizantes, clorofila e carotenoides. Conforme aumenta a concentração de EROs nas plantas, enzimas antioxidantes são requeridas para suprimir os danos causados e, nesse caso plantas mais resistentes tendem a aumentar as concentrações de enzimas antioxidantes e, possivelmente a atuação dessas enzimas antioxidantes seja uma das explicações pelas quais plantas mais resistentes sofrem reduzida alteração na troca gasosa e na taxa fotossintética (Resende *et al.*, 2012; Debona *et al.*, 2014, 2016; Bermúdez-Cardona *et al.*, 2015).

As vias de alterações das condições ótimas de trocas gasosas e da taxa fotossintética dependem de fatores relacionados à interação patógeno-hospedeiro. No patossistema trigo- *Pyricularia oryzae* Sacc., alterações nas trocas gasosas e na taxa fotossintética foram explicadas por mecanismos bioquímicos, devido à redução da atividade da rubisco, enquanto mecanismos associados a fatores diretos de trocas gasosas como, limitações estomáticas não tiveram efeito significativo (Debona *et al.*, 2014). Alterações na taxa fotossintética do milho colonizado por *Stenocarpella macrospora* (Earle; B. Sutton) são causadas por alteração no mecanismo bioquímico do hospedeiro e modificações no aparato fisiológico como, a limitação na difusão de CO₂ (Bermúdez-Cardona *et al.*, 2015).

Em cafeeiro inoculado com *M. exigua* e *M. paranaensis* (Carneiro, Carneiro, Abrantes, Santos & Almeida, 1996) houve redução nas trocas gasosas desencadeadas por fatores relacionados à difusão estomática (Goulart *et al.*, 2019). Deficiência na difusão de CO₂ nos cloroplastos e fatores bioquímicos do Ciclo de Calvin foram responsáveis pela redução na taxa fotossintética de algodoeiro inoculado com *M. incognita* (Lu *et al.*, 2014).

As células gigantes induzidas por nematoides nas raízes são responsáveis pela nutrição da fêmea durante o ciclo de vida por desviar fotoassimilados da planta para essas células nutridoras. Isso reflete em custo energético para a planta e resulta em prejuízos ao mecanismo fotossintético da hospedeira (Melakeberhan & Webster, 1993). De acordo com Ahmed *et al.* (2009) as galhas induzidas nas raízes prejudicam a absorção e translocação de nutrientes do solo para a parte aérea e esse cenário pode ser considerado o efeito primário da alteração na taxa fotossintética causada por nematoides. Deficiência na absorção de nitrogênio e potássio provocada pela interrupção das raízes pelas células gigantes inviabilizam o funcionamento da maquinaria fotossintética da planta. O nitrogênio é essencial à molécula de clorofila e o potássio é encarregado de potencializar o processo fotossintético (Melakeberhan & Webster, 1993).

As galhas também dificultam a translocação de hormônios essenciais ao funcionamento de todo sistema fisiológico da planta, por inviabilizar o transporte xilemático da planta (Strajnar *et al.*, 2012). A ineficiência da absorção e translocação de nutrientes e o déficit hídrico na planta causados pelo estabelecimento dos juvenis próximos ao cilindro vascular intensificados pela fêmea obesa e sedentária podem acarretar perda na assimilação de luz devido à redução nos pigmentos fotossintetizantes e inviabilizar o transporte de elétrons pelo fotossistema II. Essas alterações são refletidas em sintomas na parte aérea da planta, como clorose foliar, murcha e redução do crescimento da planta (Maqsood *et al.*, 2020).

As galhas formadas nas raízes tornam ineficiente a translocação de água e ocasionam redução na condutividade hídrica e estresse hídrico na planta. Essa situação predispõe a planta ao fechamento dos estômatos que inibe a captação e assimilação de CO₂ e inviabiliza o processo fotossintético. A baixa concentração de CO₂ resulta em menor atividade fotossintética e estimula a abertura dos estômatos permitindo a entrada de CO₂ (Strajnar *et al.*, 2012).

Plantas com níveis de resistência genética desencadeiam a ativação de vários mecanismos de resistência e o gasto energético dessa planta será maior. A planta resistente assimila maior quantidade de CO₂ e isso aumenta a eficiência de carboxilação pela rubisco e requer aumento nos teores de clorofila. Esses fatores causam o incremento da taxa fotossintética responsável por suprir a alta demanda energética da planta. Por outro lado, plantas suscetíveis podem assimilar quantidades maiores de CO₂, aumentar os níveis de clorofila e da taxa fotossintética devido ao aumento na demanda de

fotoassimilados para supriras fêmeas durante o parasitismo através das células gigantes (Abrão & Mazzafera, 2001; Strajnar *et al.*, 2012; Figueiredo *et al.*, 2018, 2020).

Controle de *Meloidogyne* spp.

O controle químico foi por muito tempo o principal método empregado no controle de nematoides principalmente, através da utilização de produtos fumigantes. O brometo de metila, é um gás extremamente tóxico à saúde humana e ao meio ambiente; foi o principal fumigante utilizado no controle de insetos e fitopatógenos, difundido até o início da década 20. Porém, em 1987, no Canadá, ocorreu o início da tomada de decisão para a retirada do gás fumigante do mercado, através do Protocolo de Montreal, cujo objetivo principal tratou da eliminação de substâncias que contribuíssem para a destruição da camada de ozônio. O Brasil assinou o acordo e estabeleceu até 2015 a eliminação completa do brometo de metila nos diferentes segmentos da agricultura, através da instrução normativa nº1, de 10 de setembro de 2002 (IBAMA, 2023).

Aldicarb, conhecido como “chumbinho”, pertencente a classe dos carbamatos, foi utilizado no controle de nematoides, ácaros e insetos por várias décadas. É considerado o pesticida de maior toxicidade do grupo e as restrições impostas à comercialização para outros fins impulsionaram o comércio ilegal. Em 2006 o projeto de lei nº 7.586-a acrescentou o parágrafo § 6º no art.3º da Lei nº 7.802, de 1989, que tratou da proibição da comercialização do Aldicarb para o único fim, para o qual ainda era permitido. Outros exemplos são os ingredientes ativos Dibromocloropropano (DBCP) e Dibromoetano (EDB), que por décadas foram utilizados no controle de nematoides, porém devido aos danos irreversíveis à saúde humana ficou proibida a comercialização (Oka *et al.*, 2000; Oka, 2020).

Os nematicidas tornaram-se os principais vilões da agricultura econômica moderna, por isso, medidas de controle que visam substituir os nematicidas e sejam tão eficientes quanto as moléculas químicas vêm sendo abordadas. Como forma de reduzir a dependência do controle químico, vem sendo recomendado o emprego de outras medidas de manejo associadas ou não com moléculas químicas, conhecido como manejo integrado. A rotação de culturas com espécies não hospedeiras do nematoide, ou com espécies que não permitem a sua reprodução de forma eficiente e o uso de variedades resistentes são medidas que, em conjunto, mostram-se eficientes na redução da densidade populacional

do nematoide (Dong & Zhang, 2006).

Cultivares de hortaliças como cebolinha, salsa, cenoura, couve e brócolis apresentaram resistência a *Meloidogyne* sp. E são consideradas boas opções para rotação de culturas, porém, pelo menos três ciclos de cultivo são necessários para se obter controle satisfatório (Rosa *et al.*, 2015). A rotação de culturas requer um bom planejamento e conhecimento, uma vez que a maioria dos nematoides-das-galhas possuem ampla gama de hospedeiros. Assim, o número de espécies utilizadas restringe sua adoção (Dong & Zhang, 2006). Na fruticultura, a rotação de cultura é inviável, uma vez que, ao contrário das hortaliças e culturas anuais, espécies frutíferas permanecem na área por vários anos. Portanto, existe maior limitação de medidas de controle dos nematoides em frutíferas comparado com culturas de ciclofenológico curto (Saucet *et al.*, 2016).

Porta-enxerto resistente é uma opção promissora no controle das principais espécies de *Meloidogyne* em frutíferas. O porta-enxerto híbrido BRS Guaraçá resultante do cruzamento dagoiaba e araçá-do-campo (*Psidium guajava* L. x *P. guineense* Sw.) mostrou-se eficiente no controle de *M. enterolobii*. Genótipos de porta-enxerto de pêssogo são fontes de resistência no controle de *M. incognita* (Paula *et al.*, 2011; Santos, 2020). Segundo Kamunya *et al.* (2008) o controle de *Meloidogyne* spp. por meio de cultivares resistentes é o método de melhor custo-benefício e maior viabilidade, entretanto grande parte das espécies vegetais cultivadas não possuem genes de resistência, sendo necessária a inserção de genes através de técnicas de biotecnologia. Isso demanda procedimentos de maior custo e longo período até a cultivar melhorada ser comercializada. O plantio de cultivares resistente demanda ações a fim de aumentar ou manter a durabilidade da resistência e evitar que populações do nematoide sejam capazes de sobrepor os mecanismos de resistência implantados (Molinari, 2011).

Em espécies de frutíferas do gênero *Prunus* foram mapeados genes de resistência (R) para o controle de *Meloidogyne* spp., que futuramente poderão ser incorporados em porta-enxertos de frutíferas (Saucet *et al.*, 2016). Segundo os autores, o gene *Ma* presente no locus LG7 foi mapeado e clonado e, através da transformação de células por *Agrobacterium tumefaciens*, foi inserido em espécies de *Prunus*. O gene é capaz de controlar as principais espécies de nematoides-das-galhas, além de *M. floridensis* Handoo, Nyczepir, Esmenjaud, van der Beek, Castagnone-Sereno, Carta, Skantar & Higgins, 2004 e *M. enterolobii*.

O gene *Mi-1* identificado no cromossomo 6 em tomateiro selvagem (*Solanum*

peruvianum L.) é a principal fonte de resistência disponível para o tomateiro domesticado no controle de *M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria*, porém existem relatos de isolados mais virulentos capazes de superar a resistência do gene em diferentes condições de temperatura do solo. Além disso, o gene não é eficiente para algumas espécies de nematoides como *M. enterolobii* e *M. hapla*. Tais espécies possuem mecanismos de parasitismo capazes de superar a resistência genética (Brito *et al.*, 2007).

Os genes *R*, *Mi-2*, *Mi-3*, *Mi-4*, *Mi-5*, *Mi-6*, *Mi-7*, *Mi-8*, *Mi-9* e *Mi-HT* são outras fontes de resistência encontradas em tomateiro selvagem, porém para alguns destes genes são necessários mais estudos com o intuito de identificar a posição nos cromossomos, a eficiência genética em diferentes condições climáticas e os eficientes mecanismos de transferência dos genes para espécies domesticadas (El-Sappah *et al.*, 2019; Philbrick *et al.*, 2020).

Pesquisas envolvendo a utilização de manipueira, composto extraído da mandioca, metabólitos vegetais, extrato foliar, extrato de sementes de espécies vegetais, adição de compostos orgânicos, solarização e tratamento térmico mostraram-se eficientes no controle de *Meloidogyne* spp. (Rufino *et al.*, 2009; Lanza *et al.*, 2010; Baldin *et al.*, 2012), porém são medidas que muitas vezes não alcançam aplicabilidade prática, necessitando estudos de maior abrangência que envolvam as condições reais encontradas pelo produtor. Água tratada com gás ozônio (O₃) também possui potencial para controlar *Meloidogyne* spp. pela indução de genes que codificam para o ácido salicílico, e consequentemente induz mecanismos de defesa na planta, além de interferir diretamente na produção de ovos e na sobrevivência de J2s (Prigigallo *et al.*, 2019; Saedizadeh *et al.*, 2019).

Bacillus spp. integram o complexo de espécies de rizobactérias que atuam, principalmente na região de maior concentração das raízes, contra e sobre uma imensa gama de fitopatógenos. A principal importância das rizobactérias no controle de doenças é a capacidade de despertar na planta, mecanismos de defesa contra fitopatógenos de origem bacteriana, fúngica e nematológica. Este mecanismo é conhecido como resistência sistêmica induzida (RSI). A RSI altera mecanismos estruturais, bioquímicos e fisiológicos das plantas uma vez que as rizobactérias produzem antibióticos, enzimas e toxinas que são assimiladas pelas plantas. Atuam tanto de forma indireta, dificultando a penetração de J2, como direta, na reprodução das fêmeas, postura e eclosão de juvenis, sobrevivência nos estádios iniciais de desenvolvimento e provocando, também, a morte dos indivíduos adultos (Sikora, 1992; Ramamoorthy *et al.*, 2001; Dong & Zhang, 2006;

Machado *et al.*, 2012).

A presença de genes *cry* em *Bacillus* spp. permite a produção de proteínas *Cry*, distribuídas em 68 famílias, com diferentes graus de toxicidade a insetos e fitopatógenos. Um exemplo clássico é o milho *Bt* que foi geneticamente modificado pela introdução de um gene da família *cry* (Jouzani *et al.*, 2008). O milho modificado, quando ingerido por insetos das ordens Lepidoptera, Diptera, Coleoptera e Hymenoptera, codificam proteínas cristalinas tóxicas no intestino médio do inseto, que são clivadas em pequenos fragmentos capazes de se ligarem a receptores de reconhecimento do intestino do inseto e causar deformações nas células intestinais dos insetos (Jouzani *et al.*, 2008; Machado *et al.*, 2012).

Cinco genes *cry* de *B. thuringiensis* *cry5*, *cry12*, *cry13*, *cry14* e *cry21* codificam proteínas com potencial nematocida. Jouzani *et al.* (2008) identificaram três genes, *cry5*, *cry14* e *cry2*, além de *cry6* que foi o mais abundante em 70 isolados de *B. thuringiensis* avaliados. Possivelmente, o mecanismo de ação das proteínas cristalinas codificadas por genes *cry* sobre os nematoides é similar ao mecanismo de deformação das células epiteliais do intestino dos insetos. O gene *cry5b* expressa proteínas que reduzem o número de ovos da progênie (Li *et al.*, 2008). Outras espécies de *Bacillus* produzem antibióticos, toxinas e endotoxinas que vão interferir negativamente, na oviposição e na eclosão dos juvenis (Machado *et al.*, 2012).

Bacillus methylophilus também apresenta grande potencial no controle de fitonematoides (Liu *et al.*, 2023; Zhou *et al.*, 2016). É importante destacar que, a espécie *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* é sinônimo heterotípico de *B. methylophilus* (Dunlap *et al.*, 2015). Entre os diferentes modos de ação de *Bacillus* spp., *B. methylophilus* é capaz de sintetizar nanopartículas de prata que podem ser utilizadas no controle de nematoides (Wanget *et al.*, 2016) e lipopeptídeos, com atividade comprovada no controle de doenças fúngicas (Cheng *et al.*, 2019). O isolado de *B. methylophilus* P11-2 sintetizou enzimas, como amilases que possuem características químicas diferentes de amilases secretadas por outras espécies de *Bacillus* (Xie *et al.*, 2014).

Vários isolados de *B. methylophilus* possuem atividade comprovada contra bactérias fitopatogênicas, como DR-08 (Im *et al.*, 2020) e fungos, como o isolado de *B. methylophilus* BC79, eficiente no controle da Brusone do arroz graças à síntese de ácido fenaminometilacético (Shan *et al.*, 2013). Além disso, *B. methylophilus* promove o crescimento de plantas através da síntese de hormônios, como observado por

Radhakrishnan *et al.* (2016) em alface. *Bacillus methylotrophicus* pode ser utilizada em associação com a plantas de cobertura e reduzir a população de nematoides na cultura principal, semeada posteriormente (Araújo *et al.*, 2023). Mais estudos são necessários para comprovar se os mecanismos de ação no controle de bactérias e fungos fitopatogênicos podem ser ampliados para o controle de fitonematoides.

O primeiro estudo de *B. methylotrophicus* no controle de nematoides-das-galhas foi avaliado *in vitro* e no campo no controle *M. incognita* em tomateiro (Zhou *et al.*, 2016). Posteriormente, observou-se que o isolado TA-1 de *B. methylotrophicus* no mesmo patossistema mostrou-se eficiente no controle desse nematoide (Cheng *et al.*, 2019; Ji *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2023).

Assim como *Bacillus* spp., é comum no solo a presença de fungos micorrízicos, endofíticos e nematófagos, além de actinomicetos, bactérias e nematoides entomopatogênicos que possuem ação nematicida. Há registros de 62 nematicidas microbiológicos no Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (AGROFIT). Sendo que a maioria dos produtos possuem espécies de *Bacillus* como o ingrediente ativo (AGROFIT, 2023). Todavia, mais pesquisas são necessárias a fim de identificar o mecanismo de atuação desses microrganismos e descobrir qual substância/proteína é responsável por tal capacidade (Sikora, 1992; Dong & Zhang, 2006; Machado *et al.*, 2012). Pesquisas que abordam microrganismos naturais do solo são abundantes, porém é preciso identificar uma forma de aplicabilidade ao produtor, seja através da transformação genética de plantas, produção de nematicidas à base de microrganismos ou possível isolamento de substâncias nematicidas para tratamento de plantas ou sementes.

Pesquisas que envolvam ferramentas moleculares e transformação genética de plantas no controle de nematoides estão em fase inicial no Brasil. No futuro, talvez o método de controle com plantas geneticamente modificadas que expressem genes de resistência de outros organismos possa contribuir para o controle do nematoides-das-galhas. Um planejamento adequado e o conhecimento das medidas de controle desses nematoides é importante, visto tratar-se de patógenos altamente polífagos, de difícil visualização ao olho nu, além dos sintomas serem tardiamente perceptíveis. Por isso, um monitoramento perspicaz da lavoura torna-se necessário. O objetivo geral desta tese foi: avaliar *in vitro* o efeito de um bionematicida de ingrediente ativo *Bacillus methylotrophicus* sobre os ovos e juvenis de *Meloidogyne enterolobii* e monitorar, ao longo do tempo, alterações na fisiologia de goiabeira inoculadas com *M. enterolobii* e

tratadas com o bionematicida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD, P.; CASTAGNONE-SERENO, P.; ROSSO, M.N.; ENGLER, J.A. & FAVERY, B. 2009. *Invasion, feeding and development*. In: Perry, R.N.; Moens, M. & Starr, J.L. (eds.). Root-Knot nematodes. 1st ed. Cabi. London. p.163-176.

ABRÃO, M.M. & MAZZAFERA, P. 2001. Efeitos do nível de inóculo de *Meloidogyne incognita* em algodoeiro. *Bragantia* **60**:19–26.

AGROFIT. 2023. *Sistemas de agrotóxicos fitossanitários*. Disponível em: <https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons> Acesso: 05 Nov 2022

AHMED, N.; ABBASI, M.W.; SHAUKAT, S.S. & ZAKI, M.J. 2009. Physiological changes in leaves of mungbean plants infected with *Meloidogyne javanica*. *Phytopathologia Mediterranea* **48**:262–268.

ALTENDORF, S. 2018. Minor Tropical Fruits (Mainstreaming a Niche Market). Food Outlook, 67-75. Disponível em: <http://www.fao.org/fileadmin/templates/est/COMM_MARKETS_MONITORING/Tropical_Fruits/Documents/Minor_Tropical_Fruits_FoodOutlook>. Acesso 19 Out 2022.

ARAÚJO, F.G.; TEIXEIRA, S.J.C.; SOUZA, J.C. & ARIEIRA, C.R.D. 2023. Cover crops and biocontrol agents in the management of nematodes in soybean crop. *Revista Caatinga* **36**:243-250.

BALDIN, E.L.L.; WILCKEN, S.R.S.; PANNUTI LE, R.; SCHLICK-SOUZA, E.C. & VANZEI, F.P. 2012. Use of botanical extracts, cassava wastewater and nematicide for the control of root-knot nematode on carrot. *Summa Phytopathologica* **38**:36–41.

BERMÚDEZ-CARDONA, M.B.; WORDELL-FILHO, J.A. & RODRIGUES, F.Á. 2015. Leaf gas exchange and chlorophyll a fluorescence in maize leaves infected with *Stenocarpella macrospora*. *Phytopathology* **105**:26–34.

BIRD, A.F. 1974. Plant response to root-knot nematode. *Annual Review of Phytopathology* **12**: 69–85.

BRITO, J.A.; STANLEY, J.D.; KAUR, R.; CETINTAS, R.; DI VITO, M.; THIES, J.A. & DICKSON, D.W. 2007. Effects of the *Mi-1*, *N* and *Tabasco* genes on infection and reproduction of *Meloidogyne mayaguensis* on tomato and pepper genotypes. *Journal of Nematology* **39**:327-332.

CABASAN, M.; KUMAR, A. & WAELE, D. 2012. Comparison of migration, penetration, development and reproduction of *Meloidogyne graminicola* on susceptible and resistant ricegenotypes. *Nematology* **14**:405-415.

- CANTU, R.R.; WILCKEN, S.R.S.; ROSA, J.M.O. & GOTO, R. 2009. Reaction of commercial tomato rootstocks plant to *Meloidogyne mayaguensis*. *Summa Phytopathologica* **35**:216–218.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; MOREIRA, W.A.; ALMEIDA, R.M.A. & GOMES, C.M.M. 2001. Primeiro registro de *Meloidogyne mayaguensis* em Goiabeira no Brasil. *Nematologia Brasileira* **25**:223–228.
- CASTAGNONE-SERENO, P.; DANCHIN, E.G.J.; 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.
- CHENG, X.; JI, X.; GE, Y.; LI, J.; QI, W. & QIAO, K. 2019. Characterization of antagonistic *Bacillus methylotrophicus* isolated from rhizosphere and its biocontrol effects on maize stalk rot. *Phytopathology* **4**:571–581.
- CURTIS, R.H.C.; ROBINSON, A.F. & PERRY, R.N. 2009. Taxonomy, identification and principal species. In: Perry, R.N.; Moens, M. & Starr, J.L. (eds.). *Root-knot Nematodes*. Cabi.London. p.139–162.
- DALASTRA, G.M.; ECHER, M.D.M.; GUIMARÃES, V.F.; HACHMANN, T.L. & INAGAKI, A.M. 2014. Trocas gasosas e produtividade de três cultivares de meloeiro conduzidas com um e dois frutos por planta. *Bragantia* **73**:365–371.
- DEBONA, D.; RODRIGUES, F.A.; RIOS, J.A.; MARTINS, S.C.V.; PEREIRA, L.F. & DAMATTA, F.M. 2014. Limitations to photosynthesis in leaves of wheat plants infected by *Pyricularia oryzae*.pdf. *Phytopathology* **104**:34–39.
- DEBONA, D.; RIOS, J.A.; NASCIMENTO, K.J.T.; SILVA, L.C. & RODRIGUES, F.A. 2016. Influence of magnesium on physiological responses of wheat infected by *Pyricularia oryzae*. *Plant Pathology* **65**:114–123.
- DINESH, M.R. & VASUGI, C. 2010. Guava improvement in India and future needs. *Journal of Horticultural Science* **5**:94–108.
- DONG, L.Q. & ZHANG, K.Q. 2006. Microbial control of plant-parasitic nematodes: A five-party interaction. *Plant and Soil* **288**:31–45.
- DUNLAP, C.A.; KIM, S.J.; KWON, S.W. & ROONEY, A.P. 2015. Phylogenomic analysis shows that *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* is a later heterotypic synonym of *Bacillus methylotrophicus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **65**:2104–2109.
- EL-SAPPAH, A.H.; ISLAM, M.M.; EL-AWADY, H.H.; YAN, S.; QI, S.; LIU, J.; CHENG, G. & LIANG, Y. 2019. Tomato natural resistance genes in controlling the root-

knot nematode.pdf. *Genes* **10**:1–19.

EPPO. European and Mediterranean Plant Protection Organization. 2023. *Meloidogyne enterolobii*. *EPPO Bulletin* **44**:159–163.

FARQUHAR, G.D. & SHARKEY, T.D. 1982. Stomatal conductance and photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology* **33**:317–345.

FERIA-ROMERO, I.A.; ASTUDILLO-DE LA VEGA, H.; Chavez-Soto, M.A.; RIVERA-ARCE, E.; LÓPEZ, M.; SERRANO, H. & LOZOYA, X. 2009. RAPD markers associated with quercetin accumulation in *Psidium guajava*. *Biologia Plantarum* **53**:125–128.

FERRAZ, M.T. 2008. Trocas gasosas em mamoeiro ‘Golden’: relações entre plantas inteiras e folhas individuais. Tese de doutorado. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Campos dos Goytacazes. Brasil.

FIGUEIREDO, F.R.A.; NÓBREGA, J.S.; RIBEIRO, J.E.S.; SILVA, T.I.; SILVA, F.J.; NASCIMENTO, R.G.S.; ALBUQUERQUE, M.B.; PODESTÁ, G.S. & BRUNO, R.L.A. 2018. *Solanum melongena* L. Ecophysiology under the influence of *Meloidogyne javanica*. *Journal of Experimental Agriculture International* **23**:1–9.

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

FISHER, I.H.; ALMEIDA, A.M. & GARCIA, M.J.M. 2007. Doenças importantes da goiabeira. p. 62-70.

GALBIERI, R.; DAVIS, R.F.; SCOZ, L.B.; BELOT, J.L. & SKANTAR, A.M. 2020. First report of *Meloidogyne enterolobii* on cotton in Brazil. *Plant Disease* **104**:2295–2295.

GOMES, M.M.A.; LAGÔA, A.M.M.A.; MEDINA, C.L.; MACHADO, E.C. & MACHADO, M.A. 2004. Interactions between leaf water potential, stomatal conductance and abscisic acid content of orange trees submitted to drought stress. *Brazilian Journal of Plant Physiology* **16**:155–161.

GOMES, V.M.; SOUZA, R.M.; SILVEIRA, S.F. & ALMEIDA, A.M. 2013. Guava decline: Effect of root exudates from *Meloidogyne enterolobii*-parasitized plants on *Fusarium solani* *in vitro* and on growth and development of guava seedlings under controlled conditions. *European Journal of Plant Pathology* **137**:393–401.

GONZAGA NETO, L. 2007. Produção de goiaba. Fortaleza: Instituto Frutal.

GOULART, R.R.; TERRA, W.C.; DE SALGADO, S.M.L. ALVES, J.D.; CAMPOS,

V.P.; FATOBENE, B.J.R.; MARCHIORI, P.E.R.; SOUZA, S.R. & OLIVEIRA, R.D'A. 2019. *Meloidogyne paranaensis* and *M. exigua* alter coffee physiology. *Nematology* **21**:459–467.

HERNÁNDEZ-DELGADO, S.; PADILLA-RAMÍREZ, J.S.; NAVA-CEDILLO, A. & MAYEK-PÉREZ, N. 2007. Morphological and genetic diversity of Mexican guava germplasm. *Plant Genetic Resources: Characterisation and Utilisation* **5**:131–141.

HUANG, C.S. & MAGGENTI, A.R. 1969. Mitotic aberrations and nuclear changes of developing giant cells in *Vicia faba* caused by root knot nematode *Meloidogyne javanica*. *Phytopathology* **59**:447-455.

HUNT, D.J. & HANDOO, Z.A. 2009. Taxonomy, Identification and Principal species. In: Perry, R.N.; Moens, M. & Starr, J.L. (eds.). *Root-knot Nematodes*. Cabi. London. p.55–88.

IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. 2023. *Instrução Normativa 1, de 10 de setembro de 2002*. Disponível em: <<https://www.ibama.gov.br/component/legislacao/?view=legislacao&force=1&legislacao=137316>>. Acesso 29 Nov. 2022.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2023. *Área plantada ou destinada à colheita, área colhida, quantidade produzida, rendimento médio e valor da produção das lavouras temporárias e permanentes*. Disponível

em:<<https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9117-producao-agricola-municipal-culturas-temporarias-e-permanentes.html?t=resultados>>. Acesso 20 Nov.2022.

IM, S.M.; YU, N.H.; JOEN, H.W.; KIM, S.O.; PARK, H.W.; PARK, A.R. & KIM, J.C. 2020. Biological control of tomato bacterial wilt by oxydifficidin and difficidin-producing *Bacillus methylotrophicus* DR-08. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **163**: 130-137.

JI, X.; LI, J.; MENG, Z.; ZHANG, S.; DONG, B. & QIAO, K. 2019. Synergistic effect of combined application of a new fungicide fluopimomide with a biocontrol agent *Bacillus methylotrophicus* TA-1 for management of gray mold in tomato. *Plant Disease* **103**:1991– 1997.

JONES, J.T.; HAEGEMAN, A.; DANCHIN, E.G.J.; GAUR, H.S.; HELDER, J.; JONES, M.G.K.; KIKUCHI, T.; MANZANILLA-LÓPEZ, R.; PALOMARES-RIUS, J.E.; WESEMAEL, W.M.L. & PERRY, R.N. 2013. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* **14**:946–961.

JOUZANI, G.S.; SEIFINEJAD, A.; SAEEDIZADEH, A.; NAZARIAN, A.; YOUSEFLOO, M.; SOHEILIVAND, S.; MOUSIVAND, M.; JAHANGIRI, R.;

- YAZDANI, M.; AMIRI, R.M. & AKBARI, S. 2008. Molecular detection of nematicidal crystalliferous *Bacillus thuringiensis* strains of Iran and evaluation of their toxicity on free-living and plant-parasitic nematodes. *Canadian Journal of Microbiology* **54**:812–822.
- KAMUNYA, S.M.; WACHIRA, F.N.; LANG, A.T.J.; OTIENO, W. & SUDOI, V. 2008. Integrated management of root knot nematode (*Meloidogyne* spp.) in tea (*Camellia sinensis*) in Kenya. *International Journal of Pest Management* **54**:129–136.
- KARSSSEN, G.; LIAO, J.; KAN, Z.; HEESE, E. Y. V.; NIJS, L. J. D. 2012. On the species status of the root-knot nematode *Meloidogyne mayaguensis* Rammah & Hirschmann, 1988. *ZooKeys* **181**:67-77.
- KIEWNICK, S. MIREILLE, D. & FRANCK, L. 2009. Effects of the *Mi-1* and the *N* root-knot nematode-resistance gene on infection and reproduction of *Meloidogyne enterolobii* on tomato and pepper cultivars. *Journal of Nematology* **41**:134-139.
- KLUGE, R.A.; TEZOTTO-ULIANA, J.V. & DA SILVA, P.P.M. 2015. Physiological and environmental aspects of photosynthesis. *Revista Virtual de Quimica* **7**:56–73.
- LAGO, I.; STRECK, N.A.; BISOGNIN, D.A.; DE SOUZA, A.T. & DA SILVA, M.R. 2011. Transpiration and leaf growth of cassava plants as a response to soil water deficit. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* **46**:1415–1423.
- LANZA, F.E.; RIBEIRO, R.C.F.; REIS, S.T.; FARIA, M.A.V.R. & XAVIER, A.A. 2010. Efeito de *Capraria biflora* sobre a eclosão e mortalidade de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne javanica* in vitro. *Unimontes Científica* **12**:1–8.
- LI, X.Q.; TAN, A.; VOEGTLIN, M.; BEKELE, S.; CHEN, C.S. & AROIAN, R. V. 2008. Expression of Cry5B protein from *Bacillus thuringiensis* in plant roots confers resistance to root-knot nematode. *Biological Control* **47**:97–102.
- LI, X.; YANG, D.; NIU, J.; ZHAO, J. & JIAN, H. 2016. De novo analysis of the transcriptome of *Meloidogyne enterolobii* to uncover potential target genes for biological control. *International Journal of Molecular Sciences* **17**:1–14.
- LIU, H.; GUANGHAN, F.; YUJIE, L.; SHOUAN, Z.; XIAOXUE, J. & QIAO, K. 2023. Biocontrol efficacy of *Bacillus methylotrophicus* TA-1 against *Meloidogyne incognita* in tomato. *Plant Disease* **0**:1:34.
- LU, P.; DAVIS, R.F.; KEMERAIT, R.C.; VAN IERSE, M.W. & SCHERM, H. 2014. Physiological effects of *Meloidogyne incognita* infection on cotton genotypes with differing levels of resistance in the greenhouse. *Journal of Nematology* **46**:352–359.
- LUQUINI, L.; BARBOSA, D.; FERREIRA, C.; ROCHA, L.; HADDAD, F. &

AMORIM, E. 2019. First report of the root-knot nematode *Meloidogyne enterolobii* on bananas in Brazil. *Plant Disease* **103**:377.

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 fitonematóides. *Oecologia Australis* **16**:165–182.

MANZANILLA-LÓPEZ, R.H.; EVANS, K. & BRIDGE, J. 2004. Plant diseases caused by nematodes. In: Chen, Z.; Chen, S.; & DICKSON, D.W. (eds). *Nematology - Advances and Perspectives*. Cabi. China. p.637-703.

MAQSOOD, A.; WU, H.; KAMRAN, M.; ALTAF, H.; MUSTAFA, A.; AHMAR, S.; HONG, N.T.T.; TARIQ, K.; HE, Q. & CHEN, J.T. 2020. Variations in growth, physiology, and antioxidative defense responses of two tomato (*Solanum lycopersicum* L.) cultivars after co-infection of *Fusarium oxysporum* and *Meloidogyne incognita*. *Agronomy* **10**:1-25.

MELAKEBERHAN, H. & WEBSTER, J.M. 1993. The phenology of plant nematode interaction and yield loss. In: Khan, M.W. *Nematode Interactions*. Springer. Singapore. p. 26-41.

MOLINARI, S. 2011. Natural genetic and induced plant resistance, as a control strategy to plant-parasitic nematodes alternative to pesticides. *Plant cell reports* **30**:311-323.

NGUYỄN, V.P.; BELLAFIORE, S.; PETITOT, A.S.; HAIDAR, R.; BAK, A.; ABED, A., GANTET, P.; MEZZALIRA, I.; ENGLER, J.A. & FERNANDES, D. 2014. *Meloidogyne incognita* - rice (*Oryza sativa*) interaction: a new model system to study plant-root-knot nematode interactions in monocotyledons. *Rice* **7**:1-13.

NYCZEPIR, A.P. & THOMAS, S.H. 2009. *Current and future management strategies in intensive crop production systems*. In: Perry, R.N.; Moens, M. & Starr, J.L. (eds.). *Root-Knot nematodes*. 1st ed. Cabi. London. p.412-435.

OKA, Y. 2020. From old-generation to next-generation nematicides. *From old-generation to next-generation nematicides* **10**:1–16.

OKA, Y.; NACAR, S.; PUTIEVSKY, E.; RAVID, U.; YANIV, Z. & SPIEGEL, Y. 2000. Nematicidal activity of essential oils and their components against the root-knot nematode. *Nematology* **90**:700-715.

OLIVEIRA, I.P.; OLIVEIRA, L.C.; MOURA, C.S.F.T.; LIMA JÚNIOR, A.F. & ROSA, S.R.A. 2012. Cultivo da goiabeira: do plantio ao manejo. *Revista Faculdade Montes Belos* **5**:137–156.

- OSAKABE, Y.; OSAKABE, K.; SHINOZAKI, K. & TRAN, L.S.P. 2014. Response of plants to water stress. *Frontiers in Plant Science* **5**:1–8.
- PADILLA-RAMIREZ, J.S.; GONZÁLEZ-GAONA, E. & AMBRIZ-AGUILAR, J. 2012. International market of fresh and processed guava: Challenges and perspectives for the Mexican case. *Acta Horticulturae* **959**:15–22.
- PAULA, L.; BIANCHI, V.; GOMES, C. & FACHINELLO, J. 2011. Reação de porta-enxertos de pessegueiro à *Meloidogyne incognita*.pdf. *Revista Brasileira de Fruticultura* **33**:680–684.
- PEREIRA, F.M.; MUHAMMAD, U.; MAYER, N.A.; NACHTIGAL, C.J.; MAPHANGA, O.R.M. & WILLEMSE, S. 2016. Advances in guava propagation. *Revista Brasileira de Fruticultura* **39**:1–24.
- PEREIRA, F.M. & NACHTIGAL, J.C. 2002. Melhoramento da goiabeira. In: Bruckner, C.H. *Melhoramento de Fruteiras Tropicais*. UFV. Viçosa. p.53–78.
- PHILBRICK, A.N.; ADHIKARI, T.B.; LOUWS, F.J. & GORNY, A.M. 2020. *Meloidogyne enterolobii*, a major threat to tomato production: Current status and future prospects for its management. *Frontiers in Plant Science* **11**:1–13.
- POMMER, C.V. & MURAKAMI, K.R.N. 2006. Goiaba no mundo. *O Agrônomo* **58**:22–26.
- POMMER, C.V. & SANTOS, C. 2013. Goiaba: recursos genéticos e melhoramento. Editora Universitária da UFERSA. Mossoró-RN.
- PRIGIGALLO, M.I.; MELILLO, M.T.; BUBICI, G.; DOBREV, P.I.; VANKOVA, R.; CILLO, F. & VERONICO, P. 2019. Ozone treatments activate defence responses against *Meloidogyne incognita* and tomato spotted wilt virus in tomato. *Pest Management Science* **75**:2251–2263.
- RADHAKRISHNAN, R. & LEE, I.J. 2016. Gibberellins producing *Bacillus methylotrophicus* KE2 supports plant growth and enhances nutritional metabolites and food values of lettuce. *Plant Physiology and Biochemistry* **109**:181–189.
- RAI, M.K.; ASTHANA, P.; JAISWAL, V.S.; JAISWAL, U. 2010. Biotechnological advances in guava (*Psidium guajava* L.): Recent developments and prospects for further research. *Trees - Structure and Function* **24**:1–12.
- RAMAMOORTHY, V.; VISWANATHAN, R.; RAGUCHANDER, T.; PRAKASAM, V.; SAMIYAPPAN, R. 2001. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. *Crop*

Protection **20**:1–11.

RESENDE, R.S.; RODRIGUES, F.A.; CAVATTE, P.C.; MARTINS, S.C.V.; MOREIRA, W.R.; CHAVES, A.R.M. & DAMATTA, F.M. 2012. Leaf gas exchange and oxidative stress in sorghum plants supplied with silicon and infected by *Colletotrichum sublineolum*. *Phytopathology* **102**:892–898.

RISTERUCCI, A.M.; DUVAL, M.F.; ROHDE, W. & BILLOTTE, N. 2005. Isolation and characterization of microsatellite loci from *Psidium guajava* L. *Molecular Ecology Notes* **5**:745–748.

RODRIGUES, F.A.; EINHARDT, A.M.; OLIVEIRA, L.M. & DIAS, C.S. 2018. Physiological and biochemical changes in plantas infected by pathogens. p. 47–69.

ROSA, J.M.O.; OLIVEIRA, S.A.; JORDÃO, A.L.; SIVIERO, A. & OLIVEIRA, C.M.G. 2014. Nematoides fitoparasitas associados à mandioca na Amazônia brasileira. *Acta Amazônica* **44**:271-275.

ROZANE, D.E.; OLIVEIRA, D.A. & LIRIO, V.S. 2003. Importância Econômica da cultura da goiabeira. *Cultura da goiabeira: tecnologia e mercado*.p.1-20.

RUFINO A.D.; FERREIRA, O.D, CAMPOS P.V, PANTALEÃO, A.J, CARVALHO, A.D. & NUNES, S.A. 2009. Effect of plant and fungus metabolites on *Meloidogyne exigua*. *Ciência e Agrotecnologia* **33**:1861–1865.

SAEEDIZADEH, A.; NIASTI, F.; AMERI-BAFGHI, M.E. & AGAHI, K. 2019. Response of root-knot nematode *Meloidogyne javanica* to ozone. *Ciência e Agrotecnologia* **43**:1–11.

SANTOS, C.A.F. 2020. Produção de mudas do BRS Guaraçá: porta enxerto de goiabeira resistente ao nematoide-das-galhas. *Comunicado técnico 174*. Embrapa Semiárido, 1.ed.

SAUCET, S.B.; GHELDER, C.V.; ABAD, P.; DUVAL, H. & ESMENJAUD, D. 2016. Resistance to root-knot nematodes *Meloidogyne* spp. in woody plants. *New Phytologist* **211**:41–56.

SHAN, H.Y.; ZHAO, M.M.; CHEN, D.X.; CHENG, J.L.; LI, J.; FENG, Z.Z.; MA, Z. & AN, D. 2013. Biocontrol of rice blast by thephen amino methylacetic acid producer *Bacillus methylotrophicus* strain BC79. *Crop Protection* **44**:29–37.

SHIGUEOKA, L.H.; DORIGO, O.F.; ARITA, L.Y.; FONSECA, I.C.B.; SILVA, S.A.; SERA, G.H. & MACHADO, A.C.Z. 2019. Histopathological characterization of *Coffea arabica* cultivar IPR 106 resistance to *Meloidogyne paranaensis*. *Scientia Agricola* **76**:434–438.

SIKORA, R.A. 1992. Agricultural Ecosystems for the Biological Control of Plant Parasitic Nematodes. *Annual Review of Phytopathology* **30**:245-270.

SOUZA, L.A.F. & FERRAREZI JUNIOR, E. 2022. Perspectivas para o mercado da goiaba: cenário atual e principais desafios. *Interface Tecnológica* **19**:198-209.

STRAJNAR, P.; ŠIRCA, S.; UREK, G.; ŠIRCEL, J.H.; ŽELEZNIK, P. & VODNIK, D. 2012. Effect of *Meloidogyne ethiopica* parasitism on water management and physiological stress in tomato. *European Journal of Plant Pathology* **132**:49–57.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I.M. & MURPHY, A. 2017. *Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal*. 6° ed. Artmed. Porto Alegre-Brasil.

TAPIA-VÁZQUEZ, I.; MONTOYA-MARTÍNEZ, A.C.; SANTOS-VILLALOBOS, S.L.; EK-RAMOS, M.J.; MONTESINOS-MATÍAS, R.; MARTÍNEZ-ANAYA, C. 2022. Root - knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) a threat to agriculture in México: biology, current control strategies, and perspectives. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **38**:1-18.

TRIDGE. 2023. *Fresh Guava*. Disponível em: <<https://www.tridge.com/intelligences/guava>> Acesso 15 Out 2022.

UZZAMAN, S.; AKANDA, K.M.; MEHJABIN, S. & PARVEZ, G.M.M. 2018. A short review on a Nutritional Fruit: Guava. *Open Access: Toxicology & Research* **1**:1–8.

VITTI, K.A.; LIMA, L.M. & FILHO-MARTINES, J.G. 2020. Agricultural and economic characterization of guava production in Brazil. *Revista Brasileira de Fruticultura* **42**:1–11.

XIE, F.; QUAN, S.; LIU, D.; MA, H.; LI, F.; ZHOU, F. & CHEN, G. 2014. Purification and characterization of a novel α -amylase from a newly isolated *Bacillus methylotrophicus* strain P11-2. *Process Biochemistry* **49**:47-53.

XU, J.; LIU, O.; MENG, Q.; LONG, H. 2004. Characterisation of *Meloidogyne* species from China using isozyme phenotypes and amplified mitochondrial DNA restriction fragment length polymorphism. *European Journal of Plant Pathology* **110**:309-315.

ZHOU, L.; YUEN, G.; WANG, Y.; WEI, L. & JI, G. 2016. Evaluation of bacterial biological control agents for control of root- knot nematode disease on tomato. *Crop Protection* **84**:8–13.

WANG, C.; KIM, Y.J.; SINGH, P.; MATHIYALAGAN, R.; JIN, Y. & YANG, D.C. 2016. Green synthesis of silver nanoparticles by *Bacillus methylotrophicus*, and their antimicrobial activity. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology* **44**: 1127-1132.

WESTERICH, J.N.; ROSA, J.M.O. & WILCKEN, S.R.S. 2011. Estudo comparativo da biologia de *Meloidogyne enterolobii* (= *M. mayaguensis*) e *Meloidogyne javanica* em tomateiros com gene *Mi*. *Summa Phytopathologica* **37**:35–41.

CAPÍTULO II: Potencial nematicida de *Bacillus methylotrophicus* sobre ovos e juvenis de *Meloidogyne enterolobii*

RESUMO

A carência de produtos biológicos e a ausência de métodos de controle alternativos para uso contra *Meloidogyne enterolobii* dificultam o manejo eficiente e sustentável. O objetivo desta pesquisa foi avaliar a eficiência *in vitro* de diferentes concentrações do bionematicida (Onix[®]) de ingrediente ativo *Bacillus methylotrophicus* sobre ovos e juvenis (J2) de *M. enterolobii*. Os tratamentos foram representados pelas concentrações de 1%, 10%, 25%, 50% e 70% do bionematicida e por água como controle negativo. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado com seis repetições e duas repetições no tempo. Os tratamentos com ovos foram avaliados aos 2, 4, 6, 8 e 10 dias após a incubação, através da contagem do número de ovos danificados. Os tratamentos com J2 foram avaliados em intervalos de 24 até 96 horas pela contagem do número de juvenis mortos. Os danos aos ovos foram crescentes para todos os tratamentos ao longo dos 10 dias de exposição, não havendo diferença estatística entre as dosagens após seis dias de exposição. A mortalidade de J2 aumentou até as 48 horas nas dosagens mais baixas (1%, 10% e 25%), tendo permanecido próxima dos 100% nas dosagens mais altas (50% e 70%), não havendo diferença estatística entre as dosagens após 48 horas de exposição. Dosagens maiores diferiram das demais com relação à percentagem de ovos danificados aos 2 dias (25, 50 e 70%) e aos 4 dias (70%) e à mortalidade de J2 em 24 horas (25%, 50% e 70%).

Palavras-chave: Bactéria, controle alternativo, controle biológico, nematoide-das-galhas

**Nematicidal potential of *Bacillus methylotrophicus* on eggs and juveniles of
*Meloidogyne enterolobii***

ABSTRACT

The lack of biological products and the absence of alternative control methods for the nematode *Meloidogyne enterolobii* make difficult efficient and sustainable management difficult. The objective of this study was to evaluate the *in vitro* efficiency of different concentrations of the bionematicide Onix[®] with *Bacillus methylotrophicus* as the active ingredient on eggs and juveniles (J2) of *M. enterolobii*. The treatments were represented by the concentrations of 1%, 10%, 25%, 50% and 70% of the bionematicide and water as the negative control. A completely randomized design with six replications and two replications in time was used. Egg treatments were evaluated at 2, 4, 6, 8 and 10 days after incubation by counting the number of damaged eggs. J2 treatments were evaluated at intervals of 24 to 96 hours by counting the number of dead juveniles. Egg damage increased for all treatments over the 10 days of exposure, with no statistical difference between dosages after six days of exposure. J2 mortality increased up to 48 hours at the lowest dosages (1%, 10% and 25%), remaining close to 100% at the highest dosages (50% and 70%), with no statistical difference between the dosages after 48 hours of exposure. Higher dosages differed from the others in terms of percentage of egg mortality at 2 days (25, 50 and 70%) and at 4 days (70%) and J2 mortality at 24 hours (25%, 50% and 70%).

Keywords: *Bacterium*, alternative control, biological control, root-knot nematode

1 INTRODUÇÃO

O controle de nematoides no solo foi por muito tempo realizado com aplicações de brometo de metila. Esse fumigante químico libera compostos que reagem com a camada de ozônio; é altamente tóxico, contaminando lençõs freáticos, rios e lagos; causa danos diretos à saúde pela indução de células cancerígenas e é apontado como causador da perda de fertilidade. Além disso, a ausência de especificidade do fumigante interfere negativamente na microfauna benéfica do solo, já que pertence as quatro classes de pesticidas. Teoricamente, restrições impostas pelo Protocolo de Montreal em 2002, pregavam que a utilização do brometo de metila era para ser reduzida em 100% em países desenvolvidos até 2005 e, em países em desenvolvimento, até 2015 (MMA, 2023). Porém, constam relatos da utilização do fumigante posterior a esses períodos (Zasada *et al.*, 2010; Msayleb *et al.*, 2013).

Existem 31 nematicidas químicos registrados contra 69 bionematicidas, fato que demonstra que grandes empresas detentoras da produção de pesticidas estão em busca de alternativas ao controle químico. Do total de bionematicidas registrados, cerca de 75% são produtos à base de *Bacillus*, considerado o gênero de bactérias mais eficiente no controle de fitonematoides. Entretanto, Onix[®] e OnixOG[®] são os únicos bionematicidas à base de *B. methylotrophicus* com registro e recomendação para controle das espécies *M. javanica* e *Pratylenchus brachyurus*. Ambos os produtos possuem aproximadamente 1,5% de endósporos (estrutura de resistência) de bactérias e 98,5% de outros ingredientes inertes. É recomendada a aplicação de 3 mL/kg no tratamento de sementes ou 6L/ha em aplicações foliares, no controle das duas espécies de nematoides. Não existem bionematicidas registrados para o controle de *M. enterolobii* (AGROFIT, 2023).

Vários estudos indicaram que certas espécies de *Bacillus* possuem a capacidade de controlar *in vitro* e *in vivo* espécies de *Meloidogyne* spp. e outros patógenos. Segundo Shan *et al.* (2013), o ácido fenaminometilacético sintetizado por *Bacillus methylotrophicus* é a substância com maior potencial no controle de patógenos fúngicos. Testes *in vitro*, em casa de vegetação e em condições de campo com o isolado da bactéria BC79 mostrou eficiência no controle da Brusone do arroz causada por *Magnaporthe oryzae*. Além disso, o isolado CKAM produziu quitinases, proteases, pectinases, surfactina, iturina e fengicinas que contribuíram para o controle de patógenos fúngicos (Mehta *et al.*, 2014).

Espécies de *Bacillus* aumentam a tolerância das plantas parasitadas por nematoides, por contribuírem direta ou indiretamente para o desenvolvimento vegetal, através de diferentes mecanismos. Desse modo, essas bactérias promovem o escape às doenças no início do ciclo da cultura e são capazes de intensificar a produção vegetal (Khan *et al.*, 2022). Em vista da ausência de genes de resistência a *M. enterolobii* e de produtos químicos e/ou biológicos registrados para o controle de *M. enterolobii*, o manejo integrado desse nematoide apresenta-se como medida altamente desejável para redução da densidade populacional de *M. enterolobii* (Sikora *et al.*, 2022). De outra parte, a crescente inquietação da sociedade na busca de um ambiente sustentável, livre de resíduos tóxicos tende a reduzir o interesse pelo mercado dos nematicidas químicos. Esse fato reforça a necessidade de se desenvolver métodos alternativos que possam ser integrados ao manejo dos nematoides e, entre esses, os bionematicidas tem lugar de destaque. Geralmente, os bionematicidas são capazes de controlar nematoides sem afetar de forma significativa a microbiota do solo e causar danos à sociedade (Khan *et al.*, 2022). Diante disso, o objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* a eficiência do bionematicida comercial (Onix[®]) sobre ovos e juvenis de *M. enterolobii*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Localização do experimento

O experimento foi realizado no Laboratório de Fitopatologia do Instituto Federal Goiano, Campus Morrinhos, localizado nas coordenadas geográficas 17°49'10.83" de latitude Sul e 49°12'13.46" de longitude Oeste, à altitude de 901 metros.

2.2 Multiplicação de *Meloidogyne enterolobii*

Uma população de *M. enterolobii* oriunda de um pomar de goiabeira da variedade Cortibel RM com 7 anos de cultivo localizado em uma propriedade rural no município de Jaraguá – GO foi mantida e multiplicada em tomateiro (*Solanum lycopersicum*) cv. Santa Clara e posteriormente em pimentão cv. Yolo Wonder. Esta cultivar de pimentão possui gene que confere resistência às principais espécies de *Meloidogyne*, mas não confere resistência ao *M. enterolobii*.

Sementes de pimentão foram semeadas em sacos de polietileno de 2 L contendo mistura de solo e areia na proporção de 1:2, previamente esterilizada a 120 °C/60 min. Após 20-30 dias as mudas foram inoculadas com cerca de 8000 ovos e J2 de *M. enterolobii*. As plantas foram mantidas em casa de vegetação com regas diárias e temperatura entre 20° ± 27°C.

O inóculo foi renovado a cada três meses, mediante extração de ovos e J2 das raízes de pimentão pela técnica de Hussey & Baker (1973) modificada por Bonetti & Ferraz (1981). Para isso, as raízes foram trituradas em liquidificador com solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 0,5%. A suspensão foi transferida para peneiras de 100 (0,149 mm) e 500 mesh (0,025 mm), sendo ovos e J2 recolhidos da peneira de 500 mesh e inoculados em pimentão.

2.3 Identificação e confirmação de *Meloidogyne enterolobii*

Meloidogyne enterolobii foi identificado pela técnica de eletroforese de isoenzimas com base no fenótipo das esterases e por PCR, mediante o uso de *primers* específicos (Tigano *et al.*, 2010).

2.3.1 Eletroforese de Isoenzimas

Fêmeas leitosas foram extraídas das raízes de tomateiro sob microscópio estereoscópico com auxílio de pinça e estilete. Em seguida, foram colocadas em microtubos de 0,5 ml com a solução tampão de extração (20% sacarose, 2% de Triton X-100, 0,01% de azul de bromofenol e 78% de água destilada). Os microtubos foram mantidos em isopor com gelo durante todo o processo.

Cerca de 10 µl de cada amostra foram colocados, com auxílio de micropipeta, em cavidades do gel de poliacrilamida 8%. A amostra padrão consistiu em fêmeas de *M. javanica* com perfil J3, conforme descrito por Alonso & Alfenas (1998). A corrida de eletroforese vertical foi conduzida em aparelho Mini-PROTEAN da Bio-Rad, a 200 volts, sendo a cuba mantida sob refrigeração a 4 °C por 1 hora. Após a corrida, o gel foi imerso em solução reveladora para esterase (100 mL de solução tampão fosfato de potássio 0,05M pH 6,0, 100 mg de Fast Blue RR Salt e 4,5 mL de I-naftilacetato 1%), mantido em

estufa a 37 °C por 30 minutos. Em seguida, o gel foi lavado em água destilada e transferido para uma solução fixadora (45% de metanol, 9% de ácido acético e 45% de água destilada), onde permaneceu por 20 minutos em estufa a 37 °C.

O perfil de esterase revelou o fenótipo (M2) com duas bandas mais fortes e duas bandas secundárias mais fracas, como descrito por Carneiro *et al.* (2001) para *M. enterolobii*. Para *M. javanica* observaram-se três bandas fortes (J3).

2.3.2 PCR

Marcadores SCAR espécie-específicos desenvolvidos por Tigano *et al.* (2010) foram usados para confirmação da população de *Meloidogyne enterolobii* utilizada nesse estudo. O DNA genômico foi extraído de fêmeas leitosas, de formas J2 ou de ovos. Foi utilizado DNA genômico de *M. javanica* e de *M. enterolobii* como controle positivo. Os *primers* específicos, sequência MK7-F (5'-GATCAGAGGCGGGCGCATTGCGA-3') e MK7-R (5'-CGAACTCGCTCGAACTCGAC-3') para identificação de *M. enterolobii* e FJAV (5'-GGTGC GCGATTGAACTGAGC-3') e RJAV (5'-CAGGCCCTTCAGTGGAACTATAC-3') para *M. javanica* (Zijlstra *et al.*, 2000). Para cada uma das duas espécies foram misturados em quantidades equimolares e utilizados em reação Duplex-PCR. As reações foram realizadas em volume final de 25 µl contendo: 10X MgCl₂; 4 µl (1,25mM) de cada um dos dNTPs (Pharmacia Biotec), 1 µl de cada *primer* SCAR (10 µM) e 14,25 µl de água Milli-Q. As amplificações foram realizadas em termociclador (Biocycler) usando o seguinte programa: desnaturação inicial do DNA por 5 min a 94 °C; 35 ciclos de 30s a 94 °C, 45s a 64 °C e 1 min a 70 °C e período final de extensão de 8 min a 70 °C. Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose (1,4%) e visualizados sob luz ultravioleta, após coloração com brometo de etídio a 0,3 µg/ml. Os fragmentos amplificados foram de 520 pb e 670 pb para *M. enterolobii* e *M. javanica*, respectivamente.

2.4 Efeito *in vitro* de diferentes concentrações de ônix[®] sobre ovos de *Meloidogyne enterolobii*

2.4.1 Extração de ovos de *Meloidogyne enterolobii*

Os ovos foram extraídos de raízes de pimentão, de acordo com a metodologia Hussey & Baker (1973), modificada por Bonetti & Ferraz (1981), mediante trituração de raízes em liquidificador, em solução de hipoclorito de sódio a 0,5%. As suspensões obtidas foram vertidas em peneira de 60 mesh (0,250 mm) acoplada sobre peneiras de 100 (0,149 mm) e 500 mesh (0,025 mm). Em tubos de centrifuga contendo a suspensão de material coletado, foram adicionados 2 mL de caulim, a suspensão foi homogeneizada com bastão de vidro e, os tubos, balanceados com água. Os nematoides foram separados dos resíduos radiculares pela técnica modificada de Jenkins (1964), com centrifugação de 1800 rpm por 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se solução de sacarose à concentração de 0,454 Kg/L ao precipitado. Após a homogeneização com o bastão de vidro e balanceamento com a solução de sacarose, levou-se novamente à centrifuga de 1800 rpm por 1 minuto. As suspensões obtidas foram vertidas em peneira de 500 mesh e lavadas cuidadosamente com água corrente, para retirar o excesso de sacarose. Em seguida as amostras foram recolhidas em tubos Falcon de 50 mL, para posterior contagem e calibração em lâmina de Peters, sob microscópio óptico. Foram utilizados 100 ovos por tratamento.

2.4.2 Tratamentos e delineamento experimental

O bionematicida utilizado foi cedido por um colaborador da empresa titular do registro do produto. Os tratamentos foram representados por diferentes concentrações de Onix[®] a 1×10^9 ufc/mL, sendo: 1%, 10%, 25%, 50% e 70%, além do tratamento controle (água), ao volume final de 2 mL. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado com seis repetições e duas repetições no tempo. Cada repetição foi constituída por um tubo Falcon de 15 mL. Os tubos foram mantidos em incubadora a $25^\circ \pm 1^\circ\text{C}$, no escuro.

2.4.3 Avaliações

Em intervalos de 48 horas (2, 4, 6, 8 e 10 dias), as suspensões de ovos foram vertidas em peneira de 500 mesh e os ovos recolhidos. Com auxílio da lâmina de Peter foi estimado o número total de ovos e o número de ovos danificados. Foram considerados ovos danificados, aqueles com ruptura da membrana da casca do ovo, conforme

representado na figura 2. Foi calculada a porcentagem de ovos danificados por tratamento através da fórmula: n° de ovos danificados/ n° total de ovos*100.



Figura 2 – Representação de ovos considerados danificados nas avaliações

2.5 Efeito *in vitro* de diferentes concentrações de ônix[®] sobre a mortalidade de juvenis de *Meloidogyne enterolobii*

2.5.1 Extração de ovos e juvenis de *Meloidogyne enterolobii* e montagem da câmara de eclosão

Os ovos foram extraídos de raízes de pimentão de acordo com a metodologia descrita em 2.4.1. Após a centrifugação as suspensões foram recolhidas em tubos Falcon de 50 mL, para posterior contagem de Juvenis. Em seguida foram montadas câmaras de eclosão mantidas por no máximo cinco dias em incubadora da LimaTec, à temperatura de 25°C. Após 6 horas da montagem das câmaras de eclosão, foram descartados os juvenis em estágio de desenvolvimento avançado. Os juvenis foram coletados a intervalos de 24 horas, contados e acondicionados em incubadoras, à temperatura de 10°C ± 3°C. Ao final das coletas, as suspensões com juvenis foram reunidas e calibradas. Foi realizada a calibração para 100 juvenis por tratamento.

2.5.2 Tratamentos e delineamento experimental

Utilizaram-se os tratamentos e o delineamento experimental conforme descrito em 2.4.2.

2.5.3 Avaliações

Em intervalos de 24 horas, até 96 horas, as suspensões foram vertidas em peneira de 500 mesh e os J2 recolhidos. Foi adicionado uma alíquota (50 a 100 μ l) de hidróxido de sódio (NaOH) 1N a suspensão com J2 antes da avaliação quanto à mortalidade (Chen & Dickson, 2000). Em seguida, foi estimado o número de juvenis mortos, pela reação à solução salina, sendo considerados mortos aqueles com corpo totalmente distendido e imóveis, e vivos aqueles com corpo retorcido. Ao final foi calculada a percentagem de juvenis mortos, através da fórmula: número de juvenis mortos/número total de juvenis*100.

2.6 Análise estatística

Os dados de ovos foram transformados por \sqrt{x} e, em seguida, os dados transformados de ovos e os dados brutos de juvenis foram submetidos a análise de variância (ANOVA), ao nível de significância de 0,05 (teste F). Em seguida foi aplicado o teste de SCOTT- KNOTT a 5% de probabilidade com auxílio do programa RStudio.

3 RESULTADOS

3.1 Avaliação do efeito *in vitro* de diferentes concentrações de ônix[®] sobre ovos de *Meloidogyne enterolobii*

Aos dois dias de incubação, nas concentrações de 1 e 10% houve menor percentagem de ovos danificados, diferenciando das concentrações de 25, 50 e 70%. Aos quatro dias de incubação, a concentração de 70% diferenciou-se das outras concentrações e apresentou maior percentagem de ovos danificados (50%). A partir do sexto dia de incubação não houve diferença entre os tratamentos, e a percentagem de ovos danificados foi superior a 30%, com exceção do controle negativo que não apresentou ovos danificados, como esperado (Figura 3).

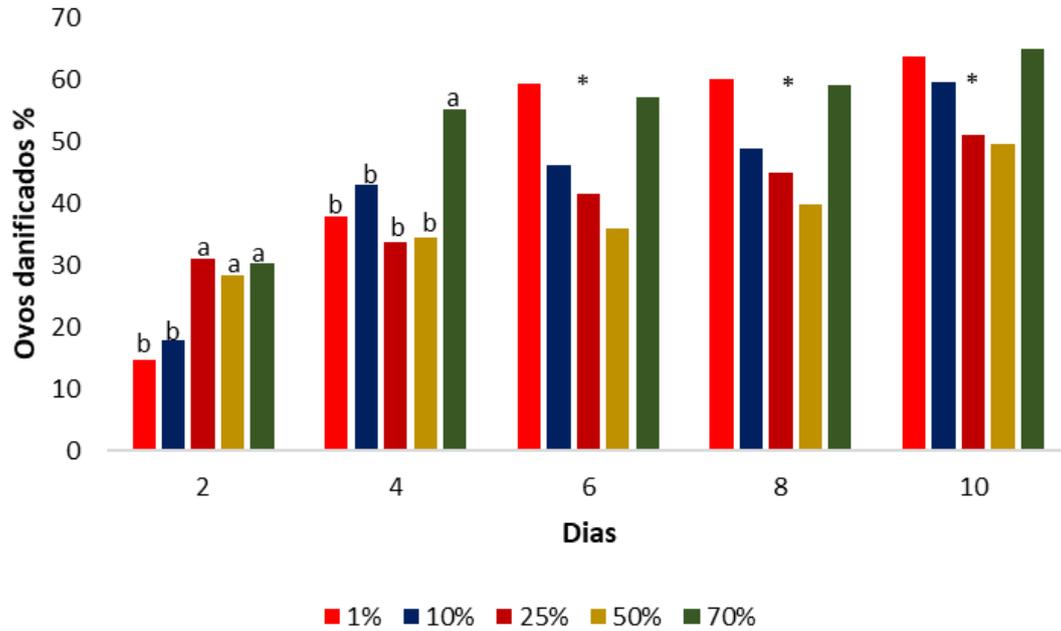


Figura 3 – Percentagem de ovos danificados de *Meloidogyne enterolobii* sob diferentes concentrações de Onix[®] avaliados por 10 dias. Tratamentos com a mesma letra não diferiram estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5%. * Não houve diferença entre os tratamentos. Dados do controle negativo não apresentados.

3.2 Avaliação do efeito *in vitro* de diferentes concentrações de ônix[®] sobre juvenis de *Meloidogyne enterolobii*

As concentrações 1% (26% de mortalidade) e 10% (70%) foram menos eficientes em causar a morte dos juvenis, e diferenciaram das concentrações de 25% (80%), 50% (100%) e 70% (100%) em 24 horas de incubação. A partir de 48 horas não houve diferença entre os tratamentos e a mortalidade média foi superior a 70% (Figura 4). No controle negativo não houve juvenis mortos, como esperado.

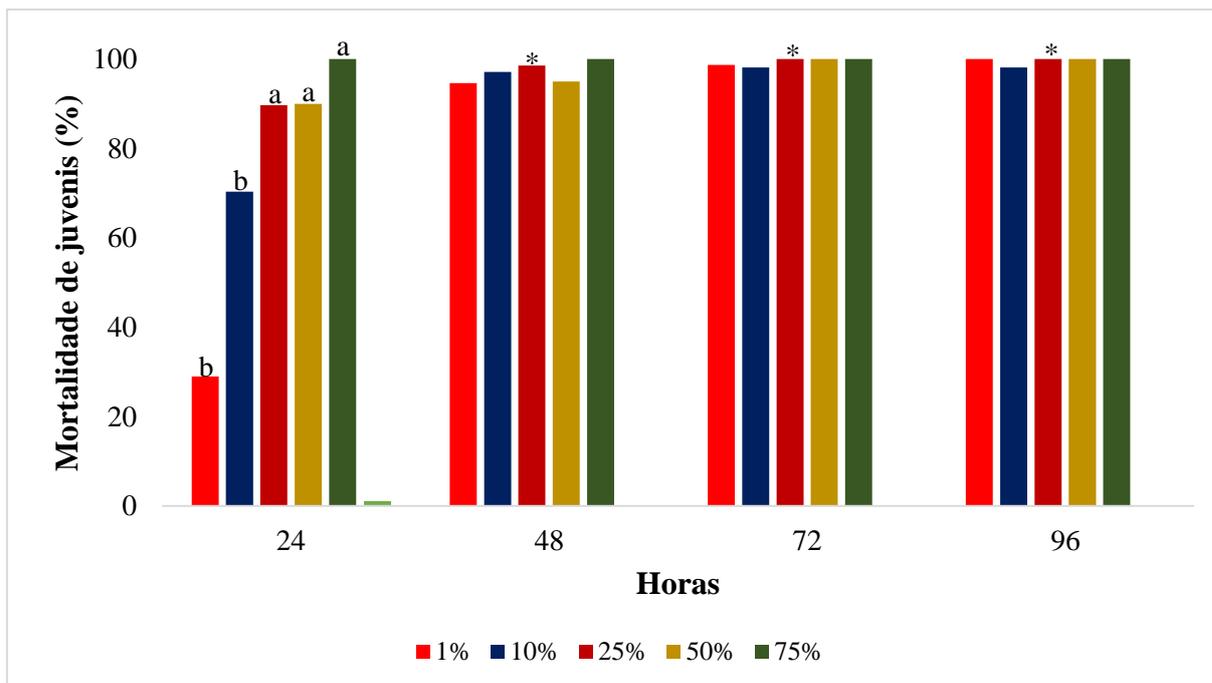


Figura 4 – Percentagem de mortalidade de juvenis de *Meloidogyne enterolobii* em função de diferentes concentrações de Onix[®] avaliados aos 24, 48, 72 e 96 horas. Tratamentos com a mesma letra não diferiram estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5%. a* não houve diferença estatística entre os tratamentos. Dados do controle negativo não apresentados.

4 DISCUSSÃO

Nesse estudo, observou-se que diferentes concentrações do bionemacida ônix[®], cujo ingrediente ativo é *B. methylotrophicus*, é eficiente no controle de *M. enterolobii*, através de danos na morfologia dos ovos e na mortalidade de juvenis. Vinte e três isolados de *Bacillus* testados *in vitro* na presença de 1×10^9 UFC/mL foram eficientes no controle de *M. enterolobii* (Vieira de Carvalho Júnior *et al.*, 2022). *Bacillus amyloliquefaciens*, na concentração de 100%, produziu composto nematicida eficiente no controle de *M. enterolobii* (Ganeshan *et al.*, 2019).

Neste estudo em 24 horas de exposição, *B. methylotrophicus* na formulação do produto a 10% causou aproximadamente 73% de mortalidade de juvenis. A mesma concentração de *B. pumilis* causou mais de 80% de mortalidade de juvenis de *M. arenaria* em um dia de exposição. Após três dias de exposição a mortalidade em ambos os ensaios foi próximo a 100% (Lee & Kim, 2016). A concentração de 10% de *B. amyloliquefaciens* causou aproximadamente, 20% de mortalidade de juvenis de *M. incognita* e

concentrações maiores que 30% causaram a mortalidade de quase 100% dos juvenis três dias após a exposição (Jamal *et al.*, 2017).

A partir da concentração de 25%, com apenas dois dias de contato com a suspensão foi suficiente para ocasionar mais de 30% de ovos danificados. As menores concentrações (1 e 10%) a partir dos quatro dias de contato não apresentaram diferença das concentrações de 25 e 50% e a percentagem de ovos danificados foi superior a 35%. Concentrações e períodos de exposição crescente aumentaram os danos aos ovos e reduziram a taxa de sobrevivência dos juvenis, da mesma forma que *B. pumilus* aumentou a taxa de mortalidade de *M. arenaria* (Lee & Kim, 2016).

Assim, existem bactérias extremamente eficientes em controlar nematoides, visto que período curto de exposição do nematoide é suficiente para causar a morte de quase 100% de juvenis, situação observado na interação de *B. cereus* e *M. incognita*. O isolado de *Bacillus* (BC27) ajustado à concentração de 10^8 esporos por mL causou a morte de 100% dos juvenis de *M. javanica* apenas com 3 horas de exposição. Por outro lado, *B. subtilis* em 24 horas de exposição não foi tão eficiente em causar a morte de juvenis de *M. incognita* (Chinheya *et al.*, 2017; Zhao *et al.*, 2018).

A destruição das cascas dos ovos dos nematoides ocasiona desorganização do conteúdo celular e vazamento citoplasmático. Com o aumento do tempo de incubação, as rizobactérias conseguem formar biofilmes e aderir à casca do ovo em processo de destruição, e colonizar o embrião. Lee & Kim (2016) observaram que a produção de enzimas líticas por *B. pumilis* foi responsável por degradar os ovos de *M. arenaria*, sendo que os danos aos ovos foram maiores aos cinco dias de exposição.

Compostos antibacterianos podem apresentar potencial nematicida, por isso o modo de ação desses metabólitos com foco no controle de nematoides precisa ser melhor esclarecido (Castaneda Alvarez & Aballay, 2016; Engelbrecht *et al.*, 2018; Liang *et al.*, 2020). Estudo recente comprovou *in vitro* que *B. methylotrophicus* é eficiente sobre ovos e J2 de *M. incognita*, mas o mecanismo de ação permanece desconhecido (Liu *et al.*, 2023). Podemos inferir que danos causados em ovos e em juvenis de *M. enterolobii* seja atribuída a genes que codificam proteínas de diferentes classes. *Sfp*, *ItuD*, *SrfC*, *Fen* e *BamC* são genes identificados em *B. methylotrophicus* ligados a produção de substâncias antimicrobianas atuantes em diferentes patógenos. No entanto, é necessário realizar mais estudos (Ji *et al.*, 2019).

Bacillus firmus e *B. methylotrophicus* produziram uma substância com capacidade nematicida sobre a eclosão e juvenis de *M. incognita* (Mendoza *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2016). Os endósporos e os metabólitos secundários de *Bacillus paralicheniformis* (TB197) causaram a morte de *M. incognita* e *M. enterolobii in vitro* (Chavarria-Quicaño *et al.*, 2023). *Bacillus pumilis* produziu quitinases e proteases que suprimiram *M. arenaria* (Lee & Kim, 2016), do mesmo modo que *B. megaterium* no controle de *Meloidogyne* sp. (Tran *et al.*, 2019). Surfactina e Iturin são lipopeptídeos produzidos por *B. subtilis* que tem ação nematicida sobre os ovos e juvenis (Jang *et al.*, 2016; Chavarria-Quicaño *et al.*, 2023).

Bacillus aryabhatai possui potencial nematicida no controle de *M. incognita* devido os múltiplos mecanismos de ação expressos, incluindo a produção do composto volátil tioacetato de metila (Chen *et al.*, 2022). Os compostos voláteis acetona e 2-decanol produzidos por *B. polymyxa* atraíram e mataram *M. incognita* (Niu *et al.*, 2010; Cheng *et al.*, 2017). Benzeno acetaldeído, 2-nonanona, decanal, 2-undecanone e dissulfeto de dimetila, 2,3-butanodiona, ácido acético, 2-isopropoxietilamina, ácido 3-metilbutírico, ácido 2-metilbutírico e ácido octanóico são compostos voláteis com potencial nematicida, liberados por microrganismos, que podem atuar sobre a integridade do intestino e a faringe do nematoide (Huang *et al.*, 2010; Cheng *et al.*, 2017).

Isolados de bactérias apresentam diferenças quanto ao potencial nematicida e modos de ação. Por isso, o controle de nematoides é mais eficiente quando ocorre a combinação de isolados (Seenivasan *et al.*, 2012; Moghaddam *et al.*, 2013). Espécies de *Bacillus* podem ser utilizadas em conjunto e responder com mais eficiência na motilidade de juvenis de *Meloidogyne*, já que a combinação dos modos de ação das bactérias pode potencializar o controle (Engelbrecht *et al.*, 2022).

Embora, o bionematicida de ingrediente ativo *B. met* não seja registrado para o controle de *M. enterolobii*, pode tornar-se um aliado como medida complementar ao manejo do nematoide, através da aplicação diretamente nas sementes ou aplicação no solo, como sugere a bula. Entretanto, microrganismos com eficiência comprovada em testes *in vitro*, quando aplicados em campo, podem comportar-se de maneira diferente, uma vez que podem ser influenciados fatores químicos, físicos e biológicos do solo e por fatores relacionados ao modo de aplicação (Geng *et al.*, 2016).

Estudos adicionais são necessários para identificar: (1) a natureza do mecanismo de ação envolvido no controle de *M. enterolobii in vitro*, (2) efeito de concentrações menores que 1% no controle de *M. enterolobii in vitro* e no campo e (3) eficiência de *B. met* comparada aos nematicidas químicos.

5 CONCLUSÕES

Bacillus methylotrophicus, independente da concentração, mostrou atividade antagônica sobre *M. enterolobii* através de danos na estrutura dos ovos e na mortalidade de juvenis. Maiores concentração de Onix[®] 25, 50 e 70% diferiram dos demais tratamentos quanto a mortalidade de juvenis e ovos danificados nas avaliações iniciais.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGROFIT. 2023. Sistemas de agrotóxicos fitossanitários. Disponível em:<https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons> Acesso: 10 Dez 2022.

ALONSO, S. K. de; ALFENAS, A. C. 1998. Isoenzimas na taxonomia e na genética de fitonematóides. In: ALFENAS, A. C. (ed.). Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos. UFV. Viçosa. p. 26-543.

BONETTI, J.I. & FERRAZ, S. 1981. Modificações do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* em raízes de cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira* **6** (Resumo).

CARNEIRO, R.M.D.G.; ALMEIDA, M.R.A & QUÉNHERVÉ, P. 2000. Enzyme phenotype of *Meloidogyne* spp. populations. *Nematology* **2**:645-654.

CARNEIRO, R.M.D & ALMEIDA, M.R.A. 2001. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematóides de galhas para identificação de espécie. *Nematol Bras* **25**:35-44.

CASTANEDA ALVAREZ, C. & ABALLAY, E. 2016. Rhizobacteria with nematicide aptitude: enzymes and compounds associated. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **32**:1-7.

CHAVARRIA-QUICAÑO, E.; DE LA TORRE-GONZÁLEZ, F.; GONZÁLEZ-RIOJAS, M.; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, J. & ASAFF-TORRES, A. 2023. Nematicidal lipopeptides from *Bacillus paralicheniformis* and *Bacillus subtilis*: A comparative study. *Applied Microbiology and Biotechnology* **107**:1537-1549.

CHEN, S.Y. & DICKSON, D.W. 2000. A technique for determining live second-stage juveniles of *Heterodera glycines*. *Journal of Nematology* **32**:117-121.

CHEN, W.; WANG, J.; HUANG, D.; CHENG, W.; SHAO, Z.; CAI, M.; ZHENG, L.; YU, Z. & ZHANG, J. 2022. Volatile Organic Compounds from *Bacillus aryabhatai* MCCC 1K02966 with Multiple Modes against *Meloidogyne incognita*. *Molecules* **27**:1-11.

CHENG, W.; YANG, J.; NIE, Q.; HUANG, D.; YU, C.; ZHENG, L.; CAI, M.; TOMASHOW, L.S.; WELLER, D.M.; YU, Z. & ZHANG, J. 2017. Volatile organic compounds from *Paenibacillus polymyxa* KM2501-1 control *Meloidogyne incognita* by multiple strategies. *Scientific Reports* **7**:1-11.

- CHINHEYA, C.C.; YOBO, K.S. & LAING, M.D. 2017. Biological control of the root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* (Chitwood) using *Bacillus* isolates, on soybean. *Biological Control* **109**:37–41.
- ENGELBRECHT, G.; HORAK, I.; JANSEN VAN RENSBURG, P.J. & CLAASSENS, S. 2018. Bacillus-based bionematicides: development, modes of action and commercialisation. *Biocontrol Science and Technology* **28**:629–653.
- ENGELBRECHT, G.; CLAASSENS, S.; MIENIE, C.M.S. & FOURIE, H. 2022. Filtrates of mixed *Bacillus* spp. inhibit second-stage juvenile motility of root-knot nematodes. *Rhizosphere* **22**:100528.
- GANESHAN, K.; POORNIMA, K.; RENUKADEVI, P. & NAKKEERAN, S. 2019. Characterisation of antinematic and antimicrobial compounds of *Bacillus amyloliquefaciens* (VB7), against nematode-disease complex causing guava decline in Tamil Nadu. *International Journal of Agriculture Sciences* **11**:9191-9196.
- GENG, C.; NIE, X.; TANG, Z.; ZHANG, Y.; LIN, J.; SUN, M. & PENG, D. 2016. A novel serine protease, Sep1, from *Bacillus firmus* DS-1 has nematicidal activity and degrades multiple intestinal-associated nematode proteins. *Scientific Reports* **6**:1–12.
- HUANG, Y.; XU, C.K.; MA, L.; ZHANG, K.Q.; DUAN, C.Q. & MO, M.H. 2010. Characterisation of volatiles produced from *Bacillus megaterium* YFM3.25 and their nematicidal activity against *Meloidogyne incognita*. *European Journal of Plant Pathology* **126**:417–422.
- HUSSEY, R.S. & BAKER, K.R.A. 1973. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. *Plant disease reporter* **57**:1025–1028.
- JAMAL, Q.; CHO, J.Y.; MOON, J.H.; MUNIR, S.; ANEES, M. & KIM, K.Y. 2017. Identification for the First Time of Cyclo (D-Pro-L-Leu) Produced by *Bacillus amyloliquefaciens* Y1 as a nematocide for control of *Meloidogyne incognita*. *Molecules* **22**:1-16.
- JANG, J.Y.; CHOI, Y.H.; SHIN, T.S.; KIM, T.H.; SHIN, K.S.; PARK, H.W.; KIM, Y.H.; KIM, H.; CHOI, G.J.; JANG, J.S.; CHA, B.; KIM, I.S.; MYUNG, E.J. & KIM, J.C. 2016. Biological control of *Meloidogyne incognita* by *Aspergillus niger* F22 producing oxalic acid *PLoS ONE* **11**:1–15.
- JENKINS, W.R. 1964. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant Disease Reporter* **48**:692.
- JI, X.; LI, J.; MENG, Z.; ZHANG, S.; DONG, B. & QIAO, K. 2019. Synergistic effect of combined application of a new fungicide fluopimomide with a biocontrol agent *Bacillus methylotrophicus* TA-1 for management of gray mold in tomato. *Plant Disease* **103**:1991–1997.

KHAN, A.R.; MUSTAFA, A.; HYDER, S.; VALIPOUR, M.; RIZVI, Z.F.; GONDAL, A.S.; YOUSUF, Z.; IQBAL, R. & DARAZ, U. 2022. *Bacillus* spp. as biogents: uses and application for sustainable agriculture. *Biology* **11**:1-21.

LEE, Y.S. & KIM, K.Y. 2016. Antagonistic Potential of *Bacillus pumilus* L1 against root-knot nematode, *Meloidogyne arenaria*. *Journal of Phytopathology* **164**:29–39.

LIANG, Y.; ARIYAWANSA, H.A.; BECKER, J.O. & YANG, J. 2020. The Evaluation of Egg-parasitic fungi *Paraboeremia taiwanensis* and *Samsoniella* sp. for the biological control of *Meloidogyne enterolobii* on chinese cabbage. *Microorganisms* **8**:1-13.

LIU, H.; GUANGHAN, F.; YUJIE, L.; SHOUAN, Z.; XIAOXUE, J. & QIAO, K. 2023. Biocontrol efficacy of *Bacillus methylotrophicus* TA-1 against *Meloidogyne incognita* in tomato. *Plant Disease* **0**:1:34.

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

MEHTA, P.; WALIA, A.; KAKKAR, N. & SHIRKOT, C.K. 2014. Tricalcium phosphate solubilisation by new endophyte *Bacillus methylotrophicus* CKAM isolated from apple root endosphere and its plant growth-promoting activities. *Acta Physiologiae Plantarum* **36**:2033-2045.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. 2023. Protocolo de Montreal. Disponível em:<<https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/emissoes-e-residuos/emissoes/protocolo-de-montreal>>. Acesso: 15 mai 2023.

MOGHADDAM, M.R.; MOGHADDAM, E.M.; RAVARI, S.B. & ROUHANI, H. 2013. The nematicidal potential of local *Bacillus* species against the root-knot nematode infecting greenhouse tomatoes. *Biocontrol Science and Technology* **24**:279-290.

MSAYLEB, N.; KANWAR, R.; VAN LEEUWEN, J.; ROBERTSON, A. & TYLKA, G. 2013. Soil disinfection with ozone (O₃) as an alternative to methyl bromide - A sustainable practice in agriculture. *American Society of Agricultural and Biological Engineers* **4**:1–12.

NIU, Q.; HUANG, X.; ZHANG, L.; XU, J.; YANG, D.; WEI, K.; NIU, X.; AN, Z.; BENNETT, J.W.; ZOU, C.; YANG, J. & ZHANG, K.Q. 2010. A Trojan horse mechanism of bacterial pathogenesis against nematodes. *PNAS* **107**:16631–16636.

SCOTT, A.A.J. & KNOTT, M. 1974. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance published by: International Biometric Society Stable URL: <http://www.jstor.org/stable/2529204>. *Biometrics* **30**:507–512.

- SEENIVASAN, N.; DAVID, P.M.M.; VIVEKANANDAN, P. & SAMIYAPPAN, R. 2012. Biocontrol science and technology biological control of rice root-knot nematode, *Meloidogyne graminicola* through mixture of *Pseudomonas fluorescens* strains. *Biocontrol Science and Technology* **22**:611–632.
- SHAN, H.Y.; ZHAO, M.M.; CHEN, D.X.; CHENG, J.L.; LI, J.; FENG, Z.Z.; MA, Z. & AN, D. 2013. Biocontrol of rice blast by thephenamino methyl acetic acid producer *Bacillus methylotrophicus* strain BC79. *Crop Protection* **44**:29–37.
- SIKORA, R.A.; DESAEGER, J. & MOLENDIJK, L.P.G. 2022. Integrated nematode management state-of-the-art and visions for the future. Cabi. London-Reino Unido.
- TIGANO, M.; SIQUEIRA, K.; CASTAGNONE-SERENO, P.; MULET, K.; QUEIROZ, P.; SANTOS, M.; TEIXEIRA, C.; ALMEIDA, M.; SILVA, J. & CARNEIRO, R. 2010. Genetic diversity of the root-knot nematode *Meloidogyne enterolobii* and development of a SCAR marker for this guava-damaging species. *Plant Pathology* **59**:1054-1061.
- TRAN, T.P.H.; WANG, S.L.; NGUYEN, V.B.; TRAN, D.M.; NGUYEN, D.S. & NGUYEN, A.D. 2019. Study of novel endophytic bacteria for biocontrol of black pepper root-knot nematodes in the Central Highlands of Vietnam. *Agronomy* **9**:1-12.
- VIEIRA DE CARVALHO JÚNIOR, O.; DE SÁ, A.V.; PEIXOTO, A.R.; DA PAZ, C.D.; DA CUNHA E CASTRO, J.M. & GAVA, C.A.T. 2022. Local *Bacillus* species as potential biocontrol agents for *Meloidogyne enterolobii* in melon (*Cucumis melo* L.). *Biocontrol Science and Technology* **32**:314–328.
- ZASADA, I.A.; HALBRENDT, J.M.; KOKALIS-BURELLE, N.; LAMONDIA, J.; MCKENRY, M.V. & NOLING, J.W. 2010. Managing nematodes without methyl bromide. *Annual Review of Phytopathology* **48**:311–328.
- ZIJLSTRA, C.; DONKERS-VENNE, D.T.H.M. & FARGETTE, M. 2000. Identification of *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria* using sequence characterised amplified region (SCAR) based PCR assays. *Nematology* **2**:847–853.
- ZHAO, D.; ZHAO, H.; ZHAO, D.; ZHU, X.; WANG, Y.; DUAN, Y.; XUAN, Y. & CHEN, L. 2018. Isolation and identification of bacteria from rhizosphere soil and their effect on plant growth promotion and root-knot nematode disease. *Biological Control* **119**:12–19.
- ZHOU, L.; YUEN, G.; WANG, Y.; WEI, L. & JI, G. 2016. Evaluation of bacterial biological control agents for control of root- knot nematode disease on tomato. *Crop Protection* **84**:8–13.

CAPÍTULO III: Estresse biótico causado por *Meloidogyne enterolobii* na fisiologia de goiabeiras tratadas com *Bacillus methylophilicus* em casa de vegetação

RESUMO

A fotossíntese, a condutância estomática e a transpiração são atividades fisiológicas das plantas que influenciam no potencial produtivo das culturas. A interferência dos nematoides na fisiologia da planta ainda é pouco estudada, assim como a capacidade das rizobactérias de amenizar os danos fisiológicos na planta causados por nematoides. Os objetivos desta pesquisa foram monitorar alterações fisiológicas em goiabeiras parasitadas pelo nematoide *Meloidogyne enterolobii* e tratadas com o bionemático Onix[®], ingrediente ativo *Bacillus methylophilicus* (*B.met*) e avaliar a eficiência do bionemático no controle do nematoide. O experimento foi instalado em casa de vegetação e os tratamentos representados por: 1) goiabeira cv. Pedro Sato não inoculada e não tratada com *B. met* (testemunha); 2) goiabeira cv. Paluma não inoculada e não tratada com *B. met* (testemunha); 3) 'Pedro Sato' não inoculada e tratada com *B. met*; 4) 'Paluma' não inoculada e tratada com *B. met*; 5) 'Paluma' inoculada e não tratada com *B. met*; 6) 'Pedro Sato' inoculada e não tratada com *B. met*; 7) 'Pedro Sato' inoculada e tratada com *B. met* e 8) 'Paluma' inoculada e tratada com *B.met*. Foram realizadas quatro aplicações do bionemático na dosagem de 3 mL/L de água por planta. Entre a segunda e a terceira aplicação as plantas foram inoculadas com 5000 ovos e eventuais juvenis de *M. enterolobii*. Foram realizadas sete avaliações dos parâmetros fisiológicos das goiabeiras (condutância estomática, eficiência no uso da água, fotossíntese e transpiração) e seis avaliações do teor de clorofila total ao longo do ciclo de desenvolvimento da goiabeira. Aos 132 dias após a inoculação (DAI) as raízes foram pesadas e determinado o índice de galhas, índice de massas de ovos e o fator de reprodução. As alterações nos parâmetros fisiológicos concentraram-se nos primeiros 44 DAI. *Meloidogyne enterolobii* e *B. met* combinados reduziram a condutância estomática e a transpiração aos 26 e 44 DAI, respectivamente. A fotossíntese foi menor aos 26 DAI nos tratamentos que receberam o nematoide e a bactéria em combinação. *Meloidogyne enterolobii* e *B. met* isolados e combinados apresentaram redução na eficiência no uso da água aos 26 e 44 DAI. Para a massa de raízes não houve diferença entre os tratamentos. Índice de galhas, índice de massas de ovos e fator de reprodução foram maiores nos tratamentos que receberam nematoides independente da aplicação da bactéria. Nas condições do ensaio,

M. enterolobii não alterou as variáveis fisiológicas das goiabeiras, no entanto em combinação com *B. met* a goiabeira mostrou-se mais sensível às alterações fisiológicas. *Bacillus methylotrophicus* aplicado em solo cultivado com goiabeiras não mostrou eficiência no controle de *M. enterolobii*.

Palavras-chave: controle alternativo, controle biológico, fotossíntese, nematoide das galhas, rizobactéria

**Biotic stress caused by *Meloidogyne enterolobii* on the physiology of guava trees
treated with *Bacillus methylotrophicus* under greenhouse**

ABSTRACT

Photosynthesis, stomatal conductance, and transpiration are pivotal physiological processes in plants, significantly influencing crop productivity. Despite their importance, the impact of nematode interference on plant physiology remains an understudied area. Equally underexplored is the potential of rhizobacteria, particularly the efficacy of *Bacillus methylotrophicus* (*B.met*), in mitigating physiological harm caused by nematodes. This study aimed to monitor the physiological changes in guava plants parasitized by the nematode *Meloidogyne enterolobii* and subsequently treated with the bionematicide Onix©, containing *B. methylotrophicus*. The objectives extended to assessing the bionematicide's effectiveness in nematode control. The experiment was conducted within a greenhouse, involving eight treatments: 1) non-inoculated and untreated guava cv. Pedro Sato (control); 2) non-inoculated and untreated guava plant cv. Paluma (control); 3) 'Pedro Sato' non-inoculated and treated with *B. met*; 4) 'Paluma' non-inoculated and treated with *B. met*; 5) 'Paluma' inoculated and non-treated with *B. met*; 6) 'Pedro Sato' inoculated and not treated with *B. met*; 7) 'Pedro Sato' inoculated and treated with *B. met*; and 8) 'Paluma' inoculated and treated with *B.met*. The bionematicide was applied four times at a dosage of 3 mL/L of water per plant. Between the second and third application, 5000 eggs and juveniles of *M. enterolobii* were inoculated in the soil around the plants. Seven evaluations of physiological parameters were conducted in the guava plants (stomatal conductance, water use efficiency, photosynthesis, and transpiration), along with six assessments of total chlorophyll content throughout the development cycle. At 132 days after inoculation (DAI), root weight, gall index, egg mass index, and reproduction factor were determined. Significant changes in physiological parameters were observed primarily within the initial 44 DAI. The combined presence of *Meloidogyne enterolobii* and *B. met* led to reduced stomatal conductance and transpiration at 26 and 44 DAI, respectively. Additionally, treatments receiving both the nematode and bacteria exhibited lower photosynthesis at 26 DAI. Moreover, isolated and combined applications of *Meloidogyne enterolobii* and *B. met* resulted in decreased water use efficiency at 26 and 44 DAI. However, there were no notable differences in root mass between treatments. Gall index, egg mass index, and reproduction factor were notably higher in treatments exposed to nematodes, regardless

of bacterial application. Surprisingly, under the experimental conditions, *Meloidogyne enterolobii* did not induce significant changes in the guava plant's physiological variables. However, in conjunction with *B. met*, the plants displayed increased sensitivity to physiological alterations. The application of *Bacillus methylotrophicus* to guava plants did not demonstrate efficiency in controlling *Meloidogyne enterolobii*.

Key words: Alternative control, biological control, photosynthesis, root-knot nematode, rhizobacteria

1 INTRODUÇÃO

No parasitismo dos nematoides-das-galhas a planta pode enfrentar estresse hídrico e para suprir essa deficiência os estômatos são parcialmente fechados e a absorção de CO₂ e a fixação de CO₂ pela rubisco nas folhas é reduzida com conseqüente redução na fotossíntese, transpiração e condutância estomática (Bird, 1974). Os pigmentos presentes nos cloroplastos são responsáveis pela absorção da energia da luz solar e por isso são essenciais para o eficiente desempenho da maquinária fotossintética (Taiz *et al.*, 2017). A fotossíntese é uma variável que influencia no rendimento das culturas, uma vez que a produtividade é o resultado da concentração interna de CO₂ e da energia solar interceptada. O aumento da fotossíntese estimula maiores ganhos de produtividade e pode ser monitorada através das trocas gasosas entre a planta e o meio ambiente (Hussey & Williamson, 1998).

A condutância estomática regula o grau de abertura e fechamento dos estômatos e é regulada pelo fluxo de CO₂ em direção aos cloroplastos. À medida que o potencial de água nas folhas diminui os estômatos tornam-se mais sensíveis e reduzem a condutância estomática pelo fechamento dos estômatos (Gomes *et al.*, 2004; Mioranza *et al.*, 2018). A transpiração é outra variável controlada pela condutância estomática e envolve a água presente no xilema que é puxada para células do mesófilo e evapora para os espaços intercelulares e na forma de vapor atravessa os poros estomáticos, sendo liberada no ambiente (Taiz *et al.*, 2017). A eficiência no uso da água é outra variável fisiológica relacionada com a biomassa produzida pela planta. É definida como quantidade de CO₂ que a planta consegue fixar enquanto transpira (Hatfield & Dold, 2019).

Com o intuito de buscar novos meios de controle de nematoides, produtos à base de fungos e bactérias que possuem propriedades nematicidas e que além disso, podem induzir na planta mecanismos de resistência, vem crescendo em importância e utilização no mundo (Mioranza *et al.*, 2018). *Bacillus* spp. integram o complexo de espécies de rizobactérias que atuam, principalmente na região de maior concentração das raízes e possuem efeitos negativos contra organismos fitopatogênicos. *Bacillus methylotrophicus* pode atuar contra os nematoides através de danos corporais e/ou pela síntese e liberação de compostos antagonistas.

Zhang *et al.* (2013) observaram que o isolado CSY-F1 dessa bactéria aumentou a concentração de enzimas presentes no solo, como a catalase e superóxido dismutase, as

quais podem auxiliar no crescimento vegetal, esse isolado também foi capaz de degradar o ácido ferúlico, um inibidor de plantas presente no solo. Segundo Ge *et al.* (2016), existe a possibilidade de *B. methylotrophicus* ser utilizado como biofertilizante, uma vez que aumentou o rendimento do tomateiro e inibiu o fungo causador da podridão cinzenta (*Botrytis cinerea*). Salienta-se que a maioria das formulações bionemáticas existentes no mercado são à base bactérias do gênero *Bacillus* (AGROFIT, 2023).

As rizobactérias podem amenizar alterações na fotossíntese, condutância estomática e transpiração induzidas por nematoides-das-galhas, porque podem contribuir com o aumento do teor de pigmentos fotossintetizantes pela proteção dos mecanismos bioquímicos envolvidos na síntese do processo fotossintético e melhorar a absorção e translocação de nutrientes pela planta (Abd-El-Khair *et al.*, 2019; Khanna *et al.*, 2019).

O conhecimento da capacidade de *M. enterolobii* influenciar na taxa fotossintética, condutância estomática e transpiração é importante uma vez que grande parte do conteúdo de matéria seca e da produtividade são determinadas pela maquinária fotossintética (Dalastra *et al.*, 2014). Ainda não existem pesquisas que buscam entender a capacidade do nematoide para interferir nesses processos fisiológicos, nem como o tratamento com *Bacillus* pode contrapor os efeitos negativos do nematoide em goiabeira. Os objetivos desta pesquisa foram monitorar alterações fisiológicas em goiabeiras parasitadas pelo nematoide *Meloidogyne enterolobii* e tratadas com o bionemático Onix[®], produto à base de *B.met*, através do acompanhamento da condutância estomática, eficiência no uso da água, fotossíntese, transpiração e teor de clorofila total, além de avaliar a eficiência do bionemático no controle do nematoide.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Localização do experimento

O experimento foi realizado em casa de vegetação do Instituto Federal Goiano, Campus Morrinhos, localizado nas coordenadas geográficas 17°49'10.83" de latitude Sul, 49°12'13.46" de longitude Oeste, à 901 metros de altitude.

2.1 Multiplicação de *Meloidogyne enterolobii*

Uma população de *M. enterolobii* oriunda de um pomar de goiabeira variedade Cortibel RM com 7 anos de cultivo localizado em uma propriedade rural no município de Jaraguá – GO foi mantida e multiplicada em tomateiro (*Solanum lycopersicum*) cv. Santa Clara e posteriormente em pimentão cv. Yolo Wonder, caracterizada por conferir resistência as principais espécies de *Meloidogyne*, com 20-30 dias de cultivo, em casa de vegetação.

Sementes de pimentão foram semeadas em sacos de polietileno de 2 L contendo mistura de solo e areia na proporção de 1:2, previamente esterilizada a 120 °C/60 min. Após 20-30 dias as mudas foram inoculadas com cerca de 8000 ovos e J2 de *M. enterolobii*. As plantas foram mantidas em casa de vegetação com regas diárias e temperatura entre 20-27°C.

O inóculo foi renovado a cada três meses, mediante extração de ovos e J2 das raízes de pimentão pela técnica de Hussey & Baker (1973) modificada por Bonetti & Ferraz (1981). Para isso, as raízes foram trituradas em liquidificador com solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 0,5%. A suspensão foi transferida para peneiras de 100 (0,149 mm) e 500 mesh (0,025 mm), sendo ovos e J2 recolhidos da peneira de 500 mesh e inoculados em pimentão.

2.3 Identificação e confirmação de *Meloidogyne enterolobii*

Meloidogyne enterolobii foi identificado pela técnica de eletroforese de isoenzimas com base no fenótipo das esterases e por PCR, mediante o uso de *primers* específicos (Tigano *et al.*, 2010).

2.3.1 Eletroforese de Isoenzimas

Fêmeas leitosas foram extraídas das raízes de tomateiro sob microscópio estereoscópico com auxílio de pinça e estilete. Em seguida, foram colocadas em microtubos de 0,5 ml com a solução tampão de extração (20% sacarose, 2% de Triton X-

100, 0,01% de azul de bromofenol e 78% de água destilada). Os microtubos foram mantidos em isopor com gelo durante todo o processo.

Cerca de 10 µl de cada amostra foram colocados, com auxílio de micropipeta, em cavidades do gel de poliacrilamida 8%. A amostra padrão consistiu em fêmeas de *M. javanica* com perfil J3, conforme descrito por Alonso & Alfenas (1998). A corrida de eletroforese vertical foi conduzida em aparelho Mini-PROTEAN da Bio-Rad, a 200 volts, sendo a cuba mantida sob refrigeração a 4 °C por 1 hora. Após a corrida, o gel foi imerso em solução reveladora para esterase (100 mL de solução tampão fosfato de potássio 0,05M pH 6,0, 100 mg de Fast Blue RR Salt e 4,5 mL de I-naftilacetato 1%), mantido em estufa a 37 °C por 30 minutos. Em seguida, o gel foi lavado em água destilada e transferido para uma solução fixativa (45% de metanol, 9% de ácido acético e 45% de água destilada) onde permaneceu por 20 minutos em estufa a 37 °C.

O perfil de esterase revelou o fenótipo (M2) com duas bandas mais fortes e duas bandas secundárias mais fracas, como descrito por Carneiro *et al.* (2001) para *M. enterolobii*. Para *M. javanica* observaram-se três bandas fortes (J3).

2.3.2 PCR

Marcadores SCAR espécie-específicos desenvolvidos por Tigano *et al.* (2010) foram usados para confirmação da população de *Meloidogyne enterolobii* utilizada nesse estudo. O DNA genômico foi extraído de fêmeas leitosas, de formas J2 ou de ovos. Foi utilizado DNA genômico de *M. javanica* e de *M. enterolobii* como controle positivo. Os *primers* específicos, sequência MK7-F (5'-GATCAGAGGCGGGCGCATTGCGA-3') e MK7-R (5'-CGAACTCGCTCGAACTCGAC-3') para identificação de *M. enterolobii* e FJAV (5'-GGTGC GCGATTGAACTGAGC-3') e RJAV (5'-CAGGCCCTTCAGTGGAACTATAC-3') para *M. javanica* (Zijlstra *et al.*, 2000). Para cada uma das duas espécies foram misturados em quantidades equimolares e utilizados em reação Duplex-PCR. As reações foram realizadas em volume final de 25 µl contendo: 10X MgCl₂; 4 µl (1,25mM) de cada um dos dNTPs (Pharmacia Biotec), 1 µl de cada *primer* SCAR (10 µM) e 14,25 µl de água Milli-Q. As amplificações foram realizadas em termociclador (Biocycler) usando o seguinte programa: desnaturação inicial do DNA por 5 min a 94 °C; 35 ciclos de 30s a 94 °C, 45s a 64 °C e 1 min a 70 °C e período final de extensão de 8 min a 70 °C. Os produtos de amplificação foram

separados em gel de agarose (1,4%) e visualizados sob luz ultravioleta, após coloração com brometo de etídio a 0,3 µg/ml. Os fragmentos amplificados foram de 520 pb e 670 pb para *M. enterolobii* e *M. javanica*, respectivamente.

2.4 Tratamentos e delineamento experimental

Foram avaliadas as cultivares de goiaba ‘Paluma’ e ‘Pedro Sato’, distribuídas em 8 tratamentos conforme descrito na tabela 1.

Tabela 1 – Cultivares de goiaba ‘Paluma’ e ‘Pedro Sato’ distribuídas em oito tratamentos avaliados no experimento

	Tratamentos
1	‘Pedro Sato’ não inoculada com <i>Meloidogyne enterolobii</i> e não tratada com <i>Bacillus methylotrophicus</i> (<i>B. met</i>) (testemunha)
2	‘Paluma’ não inoculada e não tratada com <i>B. met</i> (testemunha)
3	‘Pedro Sato’ não inoculada e tratada com <i>B. met</i>
4	‘Paluma’ não inoculada e tratada com <i>B. met</i>
5	‘Paluma’ inoculada e não tratada com <i>B. met</i>
6	‘Pedro Sato’ inoculada e não tratada com <i>B. met</i>
7	‘Pedro Sato’ inoculada e tratada com <i>B. met</i>
8	‘Paluma’ inoculada e tratada com <i>B.met</i>

As mudas utilizadas foram produzidas por estaquia e adquiridas de um viveiro situado no município de Morrinhos, GO cadastrado no Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento, que garantiram a sanidade das mudas. O experimento foi conduzido em casa de vegetação, durante os meses de janeiro a julho de 2021, com temperatura aproximada de 25°C e umidade próxima de 60% da capacidade de campo. Foi instalado duas repetições no tempo, porém em uma repetição algumas mudas foram contaminadas, por isso o ensaio foi descartado. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições sendo a unidade experimental representada por uma planta por vaso. O transplântio foi realizado com mudas de aproximadamente 30 cm de altura. Foi

utilizado sacos de polietileno de 35 x 40cm, preenchido com solo autoclavado na proporção 2:1 (areia:solo).

2.5 Aplicações da bactéria, inoculação do nematoide e avaliações

Sete dias após o transplântio (DAT) foi aplicada sobre o solo e ao redor das mudas de goiabeiras a bactéria na quantidade mínima de 1×10^9 UFC/mL. O bionemático utilizado foi cedido por um colaborador da empresa titular do registro do produto e acondicionado lacrado em refrigerador até o momento da utilização. A dosagem utilizada no ensaio foi proposta por um profissional da mesma empresa com experiência no manejo de nematoides em frutíferas. Foram realizadas quatro aplicações na dosagem de 3 mL do produto comercial por litro de suspensão, por planta, com auxílio de um regador. As aplicações foram realizadas a intervalo de 15 dias. A inoculação e as aplicações da bactéria foram realizadas no período das 08:30 às 11:00 horas. Após todas as aplicações, o bionemático foi fechado e acondicionado em refrigerador em temperatura aproximada de 5°C e a irrigação foi suspensa por 24 horas.

Entre a segunda (21 DAT) e a terceira (35 DAT) aplicação, foi realizada a inoculação com 5000 ovos e eventuais J2 de *M. enterolobii*, a intervalos de uma semana após e antes as aplicações da bactéria, respectivamente. Os ovos e J2 foram extraídos das raízes de acordo com o método de Hussey & Baker (1973), modificado por Bonetti & Ferraz (1981). A inoculação foi efetuada vertendo-se 1 mL da suspensão em quatro orifícios equidistantes, próximos ao colo das plantas. Após a inoculação a irrigação foi suspensa por 24 horas.

Cinco dias após a última aplicação do produto com a bactéria e 26 DAI (dias após a inoculação), iniciaram-se avaliações quinzenais, com analisador de gás infravermelho portátil (Infrared Gas Analyser – IRGA – modelo: LI-6800), quanto às variáveis: A = fotossíntese líquida ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); E = transpiração ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), gs = condutância estomática ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e EUA = Eficiência no uso da água ($A/E - \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1} \cdot \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), em uma folha totalmente expandida localizada no terço superior da planta e posicionadas entre o 3° e o 5° par de folhas a partir do ápice. Todas as avaliações foram realizadas entre as 7h30 e 10h30 da manhã até aos 118 DAI (146 DAT). Foi quantificado o teor de clorofila total (ng/cm^2), com medidor de clorofila, Minolta SPAD-502 (Konica Minolta, Ramsey, NJ), aos 26, 57, 69, 82, 104 e 118 DAI (54, 85, 97, 110, 132 e 146

DAT). Em cada avaliação, 10 medidas aleatórias por planta foram efetuadas e, ao final, a média foi registrada.

A irrigação foi realizada através de aspersores instalados e acionados de três a quatro vezes ao dia, nos seguintes horários: 07:00, 11:00, 14:30 e 17:00 horas. As condições climáticas durante os dias de avaliação e a precipitação pluvial mensal estão inseridas nas tabelas 2 e 3.

Tabela 2 – Temperatura média e médias da temperatura máxima e mínima, umidade relativa do ar e evapotranspiração, registrado na estação meteorológica Agrosystem do Instituto Federal Goiano Campus Morrinhos – Goiás, nos dias de avaliações das variáveis fisiológicas.

	Temperatura média (°C)	Temperatura máxima (°C)	Temperatura mínima (°C)	UR (%)	Evapotranspiração (mm/dia)
26 DAI	20	21	20	84	0
44 DAI	20	20	19	80	0
56 DAI	20	20	20	83	0
68 DAI	24	24	23	81	0
92 DAI	22	22	21	68	0
104 DAI	22	22	21	57	0
118 DAI	19	19	18	82	0

Tabela 3 – Precipitação pluviométrica mensal de 2021, registrado na estação meteorológica Agrosystem do Instituto Federal Goiano Campus Morrinhos – Goiás, nos dias de avaliações das variáveis fisiológicas.

Ano	Avaliação (DAI)	Mês	Precipitação pluvial mensal (mm)
2021	-	Jan	265
	44	Fev	371
	56 e 68	Mar	94
	92 e 104	Abr	71
	118	Mai	2.8
Total			803,8

Aos 132 DAI as raízes foram lavadas em água corrente, pesadas e submetidas à coloração com Floxina B (Taylor & Sasser, 1978). Foi realizada a contagem das galhas e das massas de ovos, de acordo com a escala de notas estabelecida por Taylor & Sasser (1978) – 1= 1-2 galhas ou massas de ovos; 2=3-10 galhas ou massas de ovos; 3= 11-30 galhas ou massas de ovos; 4= 31-100 galhas ou massas de ovos; e 5= acima de 100 galhas ou massas de ovos por sistema radicular. Após a contagem, os nematoides foram extraídos das raízes seguindo o método de Hussey & Barker (1973), modificado por Bonetti & Ferraz (1981). O fator de reprodução (FR) foi obtido pela relação entre as densidades populacionais finais e iniciais ($FR = P_f/P_i$) segundo Oostenbrink (1966).

2.6 Análise estatística

Os dados foram transformados por $\sqrt{x} + 1$ e submetidos a análise de variância. Foi aplicado o teste de Scott- Knott (1974) a 5% de probabilidade para o agrupamento das médias, utilizando o programa estatístico RStudio.

3 RESULTADOS

3.1 Variáveis fisiológicas

Na transpiração aos 26 e 44 DAI os tratamentos que receberam *M. enterolobii* e *B. met* combinados apresentaram os menores valores, diferenciando-se dos outros tratamentos (Tabela 4).

Tabela 4 –Taxa transpiratória de goiabeiras inoculadas com *Meloidogyne enterolobii* e tratadas com *Bacillus methylotrophicus*, isolados e associados.

Transpiração (mol m ⁻² s ⁻¹)							
	26 DAI	44 DAI	56 DAI	68 DAI	92 DAI	104 DAI	118 DAI
T1	12,0 a	11,1 a	8,9 a	7,3 a	4,8 a	7,6 a	4,9 a
T2	12,6 a	11,6 a	10,6 a	9,1 a	4,6 a	8,0 a	4,3 a
T3	11,6 a	10,2 a	10,1 a	10, a	6,1 a	9,7 a	8,4 a

T4	11,4 a	11,0 a	8,8 a	7,4 a	5,1 a	9,0 a	5,5 a
T5	11,9 a	11,2 a	10,4 a	8,6 a	5,2 a	6,9 a	4,5 a
T6	14,1 a	11,0 a	11,0 a	10,3 a	6,2 a	8,5 a	5,1 a
T7	9,10 b	6,6 b	7,5 a	8,8 a	4,8 a	6,8 a	6,2 a
T8	10,1 b	8,9 b	8,1 a	8,7 a	5,8 a	8,7 a	6,8 a
CV%	0,11	0,11	0,11	0,13	0,07	0,12	0,13

T1: 'Pedro Sato' não inoculada e não tratada; T2: 'Paluma' não inoculada e não tratada; T3: 'Pedro Sato' não inoculada e tratada; T4: 'Paluma' não inoculada e tratada; T5: 'Paluma' inoculada e não tratada; T6: 'Pedro Sato' inoculada e não tratada; T7: 'Pedro Sato' inoculada e tratada e T8: 'Paluma' inoculada e tratada; DAI: dias após inoculação. DAT dias após o transplante. Letras maiúsculas iguais na linha não apresentam diferença estatística. Letras minúsculas iguais na coluna não apresentam diferença estatística pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. (54, 85, 97, 110, 132 e 146 DAT).

A única diferença observada na fotossíntese foi aos 26 DAI, no qual os tratamentos que receberam o nematoide e a bactéria combinados apresentaram as menores taxas de fotossíntese (Tabela 5).

Tabela 5 – Taxa fotossintética de goiabeiras inoculadas com *Meloidogyne enterolobii* e tratadas com *Bacillus methylotrophicus*, isolados e associados.

Fotossíntese ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)							
	26 DAI	44 DAI	56 DAI	68 DAI	92 DAI	104 DAI	118 DAI
T1	16,56 a	13,91 a	13,62 a	12,43 a	10,09 a	9,89 a	9,50 a
T2	14,72 a	12,88 a	12,90 a	14,21 a	8,55 a	9,43 a	6,50 a
T3	13,43 a	10,13 a	13,24 a	13,40 a	11,03 a	11,24 a	10,98 a
T4	14,18 a	11,49 a	13,16 a	13,19 a	10,08 a	9,96 a	8,39 a
T5	15,08 a	13,45 a	13,78 a	12,39 a	8,57 a	8,85 a	7,03 a
T6	16,10 a	13,08 a	13,83 a	14,87 a	11,54 a	10,22 a	9,04 a
T7	12,35 b	11,28 a	12,52 a	12,71 a	10,05 a	9,41 a	9,19 a
T8	12,91 b	11,80 a	12,90 a	13,00 a	10,54 a	9,83 a	9,37 a
CV%	9,32	8,27	8,19	12,00	11,55	12,00	14,48

T1: 'Pedro Sato' não inoculada e não tratada; T2: 'Paluma' não inoculada e não tratada; T3: 'Pedro Sato' não inoculada e tratada; T4: 'Paluma' não inoculada e tratada; T5: 'Paluma' inoculada e não tratada; T6: 'Pedro Sato' inoculada e não tratada; T7: 'Pedro Sato' inoculada e tratada e T8: 'Paluma' inoculada e tratada; DAI: dias após inoculação. Letras maiúsculas iguais na linha não apresentam diferença estatística. Letras minúsculas iguais na coluna não apresentam diferença estatística pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. (54, 85, 97, 110, 132 e 146 DAT).

Para a condutância estomática os tratamentos que receberam *M. enterolobii* e *B. met*, combinados apresentaram os menores valores aos 26 DAI e 44 DAI (Tabela 6).

Tabela 6 – Condutância estomática de goiabeiras inoculadas com *Meloidogyne enterolobii* e tratadas com *Bacillus methylotrophicus*, isolados e associados.

Condutância estomática (mol m ⁻² s ⁻¹)							
	26 DAI	44 DAI	56 DAI	68 DAI	92 DAI	104 DAI	118 DAI
T1	0,6210 a	0,5328 a	0,4688 a	0,4780 a	0,2336 a	0,3839 a	0,2458 a
T2	0,7242 a	0,6276 a	0,5735 a	0,5322 a	0,2217 a	0,4091 a	0,2014 a
T3	0,6382 a	0,5380 a	0,5493 a	0,5646 a	0,3380 a	0,5156 a	0,4724 a
T4	0,6272 a	0,5171 a	0,4526 a	0,3766 a	0,2572 a	0,4588 a	0,2821 a
T5	0,6451 a	0,5704 a	0,5709 a	0,5058 a	0,2967 a	0,3580 a	0,2019 a
T6	0,8205 a	0,6045 a	0,6090 a	0,6041 a	0,3739 a	0,4195 a	0,2536 a
T7	0,4533 b	0,3156 b	0,3603 a	0,4780 a	0,2337 a	0,3202 a	0,3001 a
T8	0,5377 b	0,4283 b	0,4526 a	0,4780 a	0,3272 a	0,4588 a	0,3794 a
CV%	4,61	4,81	4,79	6,20	5,00	6,00	6,68

T1: 'Pedro Sato' não inoculada e não tratada; T2: 'Paluma' não inoculada e não tratada; T3: 'Pedro Sato' não inoculada e tratada; T4: 'Paluma' não inoculada e tratada; T5: 'Paluma' inoculada e não tratada; T6: 'Pedro Sato' inoculada e não tratada; T7: 'Pedro Sato' inoculada e tratada e T8: 'Paluma' inoculada e tratada; DAI: dias após inoculação. Letras maiúsculas iguais na linha não apresentam diferença estatística. Letras minúsculas iguais na coluna não apresentam diferença estatística pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. (54, 85, 97, 110, 132 e 146 DAT).

Os tratamentos que receberam *M. enterolobii* e *B. met* isolados e combinados apresentaram redução na eficiência de uso da água aos 26 DAI e 44 DAI (Tabela 7).

Tabela 7 – Eficiência na utilização da água em goiabeiras inoculadas com *Meloidogyne enterolobii* e tratadas com *Bacillus methylophilicus*, isolados e associados.

Eficiência no uso da água ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)							
	26 DAI	44 DAI	56 DAI	68 DAI	92 DAI	104 DAI	118 DAI
T1	1850 a	1737 a	1604 a	1712 a	2139 a	1316 a	2272 a
T2	1676 a	1423 a	1213 a	1587 a	1930 a	1186 a	1571 a
T3	1072 b	1019 b	1359 a	1392 a	1841 a	1192 a	1407 a
T4	1177 b	1224 b	1561 a	1843 a	1967 a	1134 a	1644 a
T5	1117 b	1114 b	1344 a	1476 a	1687 a	1309 a	1644 a
T6	1152 b	1256 b	1315 a	1475 a	1880 a	1199 a	1854 a
T7	1385 b	1365 b	1691 a	1503 a	2108 a	1627 a	1639 a
T8	1332 b	1238 b	1612 a	1501 a	1963 a	1166 a	1830 a
CV%	12.94	12.43	10.39	8.86	8.50	11.02	17.58

T1: 'Pedro Sato' não inoculada e não tratada; T2: 'Paluma' não inoculada e não tratada; T3: 'Pedro Sato' não inoculada e tratada; T4: 'Paluma' não inoculada e tratada; T5: 'Paluma' inoculada e não tratada; T6: 'Pedro Sato' inoculada e não tratada; T7: 'Pedro Sato' inoculada e tratada e T8: 'Paluma' inoculada e tratada; DAI: dias após inoculação. Letras maiúsculas iguais na linha não apresentam diferença estatística. Letras minúsculas iguais na coluna não apresentam diferença estatística pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. (54, 85, 97, 110, 132 e 146 DAT).

Para o teor de clorofila total não houve diferença entre os tratamentos nos períodos avaliados (dados não apresentados).

3.2 Variáveis nematológicas

Não houve diferença entre os tratamentos no peso fresco da raiz (dados não apresentados). Índice de galhas, índice de massas de ovos e fator de reprodução foram significativamente maiores nos tratamentos que receberam os nematoides, como esperado. Assim, a bactéria não contribuiu para reduzir as variáveis nematológicas quando aplicada nos tratamentos que receberam o nematoide (Tabela 8).

Tabela 8 –Variáveis nematológicas em goiabeiras cv. Paluma e cv. Pedro Sato tratadas e não tratadas com *Bacillus methylothrophicus* aos 132 dias após a inoculação com 5000 ovos e eventuais juvenis de *Meloidogyne enterolobii*

	IG	IMO	FR
T1	0 b	0 b	0 b
T2	0 b	0 b	0 b
T3	0 b	0 b	0 b
T4	0 b	0 b	0 b
T5	3 a	5 a	3 a
T6	4 a	5 a	2 a
T7	4 a	5 a	2 a
T8	5 a	5 a	3 a

T1: 'Pedro Sato' não inoculada e não tratada; T2: 'Paluma' não inoculada e não tratada; T3: 'Pedro Sato' não inoculada e tratada; T4: 'Paluma' não inoculada e tratada; T5: 'Paluma' inoculada e não tratada; T6: 'Pedro Sato' inoculada e não tratada; T7: 'Pedro Sato' inoculada e tratada e T8: 'Paluma' inoculada e tratada; IG: índice de galhas; IMO: índice de massa de ovos; FR: fator de reprodução. Letras minúsculas iguais na coluna não apresentam diferença estatística pelo teste de Scott- Knott a 5% de probabilidade.

4 DISCUSSÃO

Meloidogyne enterolobii e *B.met* isolados não influenciaram na condutância estomática e transpiração das goiabeiras. Resultados semelhantes foram encontrados por Melakeberhan *et al.* (1990) na interação *M. incognita* e duas cultivares de uva, embora a infecção por *M. incognita* tenha reduzido a condutância estomática e a transpiração em tomateiro (Khanna *et al.*, 2019). *Meloidogyne exigua* Göldi, 1887 e *M. paranaensis* Carneiro, Carneiro, Abrantes, Santos & Almeida, 1996 reduziram a condutância e a transpiração de mudas de café. *Meloidogyne enterolobii* não influenciou na fotossíntese das goiabeiras, o mesmo comportamento foi observado em mudas de café com *M. exigua*. Resultados diferentes foram encontrados no cafeeiro inoculado com *M. paranaensis* (Goulart *et al.*, 2019).

Plantas infectadas com nematoides apresentam sistema radicular deficiente, influenciando negativamente na absorção de água e nutrientes essenciais ao processo fisiológico da planta (Goulart *et al.*, 2019). No presente estudo, *M. enterolobii* não influenciou na absorção de água pelas raízes e no transporte de água e nutrientes. A ausência de alterações na condutância estomática, fotossíntese e transpiração ocasionada pelo nematoide pode ser devido à baixa densidade populacional, influenciada pelo reduzido número de gerações do nematoide durante o ciclo da cultura. Cerca de 6000 ovos de *M. incognita* não foi suficiente para observar alterações na fisiologia do algodoeiro, e não reduziu o teor de clorofila (Lu *et al.*, 2014). *Meloidogyne ethiopica* Whitehead, 1968 causou danos significativos às raízes do tomateiro, somente após 102 dias da inoculação, conseqüentemente esses danos refletiram em alterações fisiológicas na planta (Strajnar *et al.*, 2012).

Estudos indicam que rizobactérias melhoram a taxa fotossintética indiretamente pois estimulam na planta a produção do hormônio citocinina que está associado a diferentes mecanismos da complexa cadeia fotossintética (Ahluwalia *et al.*, 2021). A ausência de alterações na condutância estomática, fotossíntese e transpiração nos tratamentos que receberam somente a bactéria pode ser resultado da forma de aplicação no solo. Entre as opções de aplicação do produto para culturas anuais está o tratamento de sementes e aplicação pós-emergência. Para culturas perenes, o produto não possui registro e talvez uma forma de investigar a eficiência do produto seria o tratamento das mudas, através da imersão ou pulverização com o bionematicida. Além disso, a concentração da bactéria, ou mesmo a umidade do solo, pode ter contribuído para ausência de resposta positiva da bactéria, uma vez que a rizobactéria necessita de capacidade de campo mínima de 50% de inoculação para incrementar respostas positivas na fisiologia de plantas (Castro *et al.*, 2019).

O esquema de combinação das aplicações da bactéria e a inoculação do nematoide é condição importante para a manifestação de respostas positivas da planta frente aplicação de rizobactérias. Nesse ensaio foi realizado quatro aplicações com a bactéria, sendo que entre a segunda e a terceira aplicação da bactéria (B) o nematoide (N) foi inoculado (B+B+N+B+B), e assim, esse fator também pode ter contribuído para os resultados observados. *Pseudomonas fluorescens* desencadeou respostas positivas no crescimento no tomateiro e na expressão de enzimas antioxidantes quando inoculado 15 dias antes da inoculação com *M. incognita* (Noureldeen *et al.*, 2021). Em tomateiro

inoculado com *Paecilomyces lilacinus* também foi observado maior expressão nas variáveis de crescimento quando o fungo foi aplicado uma semana antes da inoculação com o nematoide (Esfahani & Pour, 2006).

Tratamentos que receberam *M. enterolobii* e *B.met* combinados reduziram a condutância estomática, eficiência no uso da água, fotossíntese e transpiração. *Piriformospora indica* Verma *et al.*, 1998 e *M. incognita* combinados reduziram a fotossíntese em plantas de pepino (Atia *et al.*, 2020). *Meloidogyne incognita* e *Streptomyces* spp. combinados reduziram a condutância estomática e a transpiração de mudas de tomateiro (Ma *et al.*, 2017). A redução na condutância estomática causada por *M. enterolobii* em combinação com *B.met* nos períodos iniciais de avaliação pode ter contribuído para a redução na fotossíntese pois com estômatos fechados houve limitação na absorção de CO₂. A liberação de água pelos estômatos para a atmosfera também foi reduzida com o fechamento dos estômatos, diminuindo a transpiração nos tratamentos com *B. met* e *M. enterolobii*, combinados.

A energia para as rizobactérias suprirem suas necessidades vem dos fotoassimilados das plantas e podemos dizer que os fotoassimilados da goiabeira podem não ter sido suficientes para liberar energia para as rizobactérias, já que a goiabeira estava sob estresse induzido pela presença do nematoide. Isso pode ter refletido na incapacidade da bactéria de influenciar positivamente, na resposta fisiológica da planta uma vez que sob condições de estresse, as bactérias apresentaram baixo desempenho (Rampazzo *et al.*, 2018).

Meloidogyne enterolobii e *B.met* isolados e associados reduziram a eficiência de utilização da água mostrando ser a variável fisiológica mais sensível ao parasitismo de *M. enterolobii*. A redução na eficiência da utilização da água induzida pelo nematoide, não pode ser explicada por alterações na condutância estomática, fotossíntese e taxa transpiratória, já que não houve variações nesses parâmetros, quando os tratamentos receberam somente o nematoide, e assim a alteração na eficiência de utilização da água é explicada por fatores não-estomáticos, como a atividade da Rubisco, velocidade máxima de carboxilação de Rubisco, capacidade de regeneração da Ribulose mediada pela taxa máxima de transporte de elétrons e taxa de utilização de triose fosfato (Lu *et al.*, 2014; Jiao *et al.*, 2017). Resultados semelhantes foram encontrados por Atia *et al.* (2020) em que *M. incognita* isolado e em combinação com *Piriformospora indica* reduziram a

eficiência no uso da água em pepino. A quantidade de água disponível às plantas, a pressão de vapor, temperatura foliar e do ambiente, nitrogênio disponível às plantas são fatores que acima ou abaixo dos limites exigidos podem ter contribuído para a redução na utilização do uso da água e foram potencializados pelo nematoide e a bactéria isolados e em combinação (Hatfield & Dold, 2019; Atia *et al.*, 2020).

Nenhuma tendência foi observada no comportamento das variáveis fisiológicas em função das temperaturas diárias. O incremento de chuva concomitante ao aumento da umidade relativa do ar durante os meses de janeiro (265mm) e fevereiro (371mm) pode ter contribuído para a redução dos parâmetros fisiológicos nos tratamentos que receberam o nematoide e a bactéria combinados, mesmo em condições de casa de vegetação, já que características do material estrutural da casa de vegetação podem sofrer influência do ambiente externo e assim induzir alterações no interior da casa de vegetação (Guiselini *et al.*, 2004). A temperatura externa é considerada uma variável que exerce bastante influência na temperatura interna na casa de vegetação (Atarassi, 2000). O aumento da precipitação pluviométrica contribuiu para o aumento da taxa fotossintética de uma gramínea segundo Hui *et al.* (2018). Neste estudo devemos levar em consideração o comportamento da resposta fisiológica frente ao patossistema ambiente *versus* rizobactérias/nematoídes *versus* cultura hospedeira.

Meloidogyne enterolobii e *B.met* isolados e combinados não influenciaram no teor de clorofila, o que era esperado, já que o nematoide isoladamente não interferiu na taxa fotossintética, entretanto, tratamentos que receberam o nematoide e a bactéria combinados, outros fatores podem ter influenciado para que a alteração na fotossíntese aos 26 DAI não tenha refletido em alterações no teor de clorofila. A densidade de inóculo utilizada pode não ter sido suficiente para causar estresse significativo na goiabeira que também não refletiu em alteração no teor de clorofila total (Sharma & Sharma, 2016). *M. incognita* reduziu o teor de clorofila total em tomateiros e os teores de clorofila A e B em feijão-caupi (Abd-El-Khair *et al.*, 2019). A inoculação de *Pseudomonas fluorescens* (Flügge) Migula 15 dias após a inoculação com *M. incognita* não foi tão eficiente na manutenção do teor de clorofila comparado com a inoculação de *P. fluorescens* 15 dias antes da inoculação com o nematoide.

Aplicação da bactéria após inoculação com o nematoide foi ineficiente em manter os níveis de clorofila, uma vez que o nematoide multiplicou e manteve sua reserva

energética. Assim, é difícil para a bactéria concorrer com o nematoide já estabelecido no ambiente (Noureldeen *et al.*, 2021). No presente estudo, o método de inoculação e aplicação da bactéria não influenciaram no teor de clorofila das goiabeiras. Em tomateiro, o efeito do nematoide na clorofila total foi reduzido com a aplicação de *P. aeruginosa* (Schröter) Migula e *Burkholderia gladioli* (Zopf)Yabuuchi *et al.* 1993. Além disso, mesmo com o nematoide, *B. gladioli* estimulou a produção do pigmento fotossintético (Khanna *et al.*, 2019). Em feijão-caupi na presença do nematoide, *B. subtilis* Cohn, *B. pumilus* Meyer & Gottheil e *P. fluorescens* (Flügge) Migula aumentaram os teores de clorofilas A e B (Abd-El-Khair *et al.*, 2019).

Nenhuma variável fisiológica avaliada sofreu alteração a partir dos 56 DAI (84 DAT). A goiabeira é uma planta rústica que se adapta a diferentes condições ambientais (Silva *et al.*, 2010), e a planta em estágio avançado de desenvolvimento pode não sofrer tanto com a infecção de nematoides devido ao maior suporte energético para tolerar o ataque sem que reflita negativamente em seu desempenho fisiológico (Melakeberhan *et al.*, 1990). Além disso, nos estádios de desenvolvimento mais avançados, a frutífera pode sofrer menos com o ataque do nematoide, por possível mecanismo de tolerância que impossibilita alterações na condutância estomática, fotossíntese e transpiração.

Pode-se afirmar que nas condições do experimento, *B. met* não desencadeou mecanismos antagônicos sobre *M. enterolobii*, já que diferenças estatísticas observadas nas variáveis nematológicas foram entre os tratamentos inoculados e não inoculados. Não houve diferença entre os pesos frescos de raízes. O índice de galhas, índice de massas de ovos e fator de reprodução foram maiores nos tratamentos que receberam nematoides, independente da aplicação da bactéria.

A bactéria não contribuiu para reduzir o número de galhas e as massas de ovos. Da mesma forma, formulações com *Paecilomyces lilacinus* e *Arthrobotrys*, combinados e com três isolados de rizobactérias também não reduziram o número de galhas nas raízes e as massas de ovos de *M. enterolobii* em goiabeiras (Almeida *et al.*, 2011). *Pseudomonas aeruginosa* e *Burkholderia gladioli* isoladas e associadas com *M. incognita* também não influenciaram a massa de raízes de tomateiros, porém reduziram o número de galhas (Khanna *et al.*, 2019). De 27 cepas de bactérias promotoras de crescimento em plantas, cinco cepas *Bacillus firmus* T11, *Bacillus aryabhatai* A08, *Paenibacillus barcinonensis* A10, *Paenibacillus alvei* T30 e *Bacillus cereus* N10w diminuíram o número de galhas de

M. incognita (Viljoen *et al.*, 2019). *Bacillus subtilis* e *B. pumilus* reduziram os parâmetros nematológicos de *M. incognita* em feijão-caupi (Abd-El-Khair *et al.*, 2019).

Zhou *et al.* (2016) observaram pela primeira vez a capacidade nematicida de *B. met* sobre *M. incognita*, contudo a cepa utilizada no presente ensaio não mostrou atividade nematicida no controle de *M. enterolobii*. *Meloidogyne incognita* e *P. fluorescens* em inoculações simultâneas não reduziram com eficiência o número de massas de ovos em raiz de tomate, entretanto, a redução foi maior quando o esquema de inoculações foi *P. fluorescens* e após 15 dias inoculado *M. incognita* (Noureldeen *et al.*, 2021). O fator de reprodução foi maior em plantas de tomate inoculadas com *M. javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949 seguida de inoculação com *Paecilomyces lilacinus* Thom. com intervalo de 10 dias comparada as inoculações simultâneas dos organismos e a inoculação de *P. lilacinus* 10 dias antes da inoculação com *M. javanica* (Ganaie & Khan, 2010).

O modo e esquema das aplicações no tempo, a concentração e genótipos do nematoide e bactéria podem ter contribuído para a ineficiência da bactéria no controle de *M. enterolobii* (Zhou *et al.*, 2016). Estudos adicionais são necessários para identificar: (1) a influência de diferentes densidades populacionais do nematoide nos parâmetros fisiológicos e (2) influência de diferentes esquemas de aplicações do produto na eficiência da bactéria em mitigar os danos ocasionados pelo nematoide na fisiologia da planta.

5 CONCLUSÕES

Meloidogyne enterolobii e *Bacillus methylotrophicus* combinados reduziram a condutância estomática, fotossíntese e transpiração das goiabeiras durante a fase inicial do desenvolvimento da frutífera. *Meloidogyne enterolobii* e *B. met* isolados e combinados reduziram a eficiência no uso da água aos 26 e 44 DAI. A partir de 44 DAI não houve alteração nos parâmetros fisiológicos avaliados. Não houve diferença no teor de clorofila total e na massa fresca das raízes. Os parâmetros nematológicos não foram influenciados pela bactéria.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD-EL-KHAIR, H.; EL-NAGDI, W.M.A.; YOUSSEF, M.M.A.; ABD-ELGAWAD, M.M.M. & DAWOOD, M.G. 2019. Protective effect of *Bacillus subtilis*, *B. pumilus*, and *Pseudomonas fluorescens* isolates against root knot nematode *Meloidogyne incognita* on cowpea. *Bulletin of the National Research Centre* **43**:1–7.

AGROFIT. 2023. Sistemas de agrotóxicos fitossanitários. Disponível em: <https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso: 15 Jan 2023.

AHLUWALIA, O.; SINGH, P.C. & BHATIA, R. 2021. Resources, environment and sustainability, a review on drought stress in plants: implications, mitigation and the role of plant growth promoting rhizobacteria. *Resources, Environment and Sustainability* **5**:1-13.

ALMEIDA, A.M.; GOMES, V.M. & SOUZA, R.M. 2011. Greenhouse and field assessment of rhizobacteria to control guava decline. *Bragantia* **70**:837-842.

ALONSO, S. K. de; ALFENAS, A. C. 1998. Isoenzimas na taxonomia e na genética de fitonematóides. In: ALFENAS, A. C. (ed.). Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos. UFV. Viçosa. p. 26-543.

ATARASSI, R.T. 2000. Modelagem do microclima em casa-de-vegetação. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. Dissertação de Mestrado.

ATIA, M.A.M.; ABDELDAYM, E.A.; ABDELSATTAR, M.; IBRAHIM, D.S.S.; IBRAHIM, S.; ELWAHAB, M.A.; OSMAN, G.H.; ARIF, I.A. & ABDELAZIZ, M.E. 2020. *Piriformospora indica* promotes cucumber tolerance against root-knot nematode by modulating photosynthesis and innate responsive genes. *Saudi Journal of Biological Sciences* **27**:279–287.

BIRD, A.F. 1974. Plant response to root-knot nematode. *Annual Review of Phytopathology* **12**:69–85.

BONETTI, J.I. & FERRAZ, S. 1981. Modificações do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* em raízes de cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira* **6** (Resumo).

CARNEIRO, R.M.D.G.; ALMEIDA, M.R.A & QUÉNHERVÉ, P. 2000. Enzyme phenotype of *Meloidogyne* spp. populations. *Nematology* **2**:645-654.

CARNEIRO, R. & ALMEIDA, M.R.A. 2001. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematoides de galhas para identificação de espécies. *Nematologia Brasileira* **25**:35–44.

CASTRO, G.L.S.; SILVA JÚNIOR, D.D.; VIANA, R.G.; RÊGO, M.C.F. & SILVA, G.B. 2019. Photosynthetic apparatus protection and drought effect mitigation in açai palm seedlings by rhizobacteria. *Acta Physiologiae Plantarum* **419**:1–12.

DALASTRA, G.M.; ECHER, M.D.M.; GUIMARÃES, V.F.; HACHMANN, T.L. & INAGAKI, A.M. 2014. Trocas gasosas e produtividade de três cultivares de meloeiro conduzidas com um e dois frutos por planta. *Bragantia* **73**:365–371.

ESFAHANI, M.N. & POUR, B.A. 2006. The effect of *Paecilomyces lilacinus* on the pathogenesis of *Meloidogyne javanica* and tomato plant growth parameters. *Iran Agricultural Research* **24**:67-75.

GANAIE, M.A. & KHAN, T.A. 2010. Biological potential of *Paecilomyces lilacinus* on pathogenesis of *Meloidogyne javanica* infecting tomato plant. *European Journal of Applied Sciences* **2**:80–84.

GE, B.; LIU, B.; NWET, T.T.; ZHÃO, W.; SHI, L. & ZHANG, K. 2016. *Bacillus methylotrophicus* strain NKG-1, Isolated from changbai mountain, China, Has potential applications as a biofertilizer or biocontrol agent. *Plos One* **11**:1-13.

GOMES, M.M.A.; LAGÔA, A.M.M.A.; MEDINA, C.L.; MACHADO, E.C. & MACHADO, M.A. 2004. Interactions between leaf water potential, stomatal conductance and abscisic acid content of orange trees submitted to drought stress. *Brazilian Journal of Plant Physiology* **16**:155–161.

GOULART, R.R.; TERRA, W.C.; SALGADO, S.M.L.; ALVES, J.D.; CAMPOS, V.P.; FATOBENE, B.J.R.; MARCHIORI, P.E.R.; SOUZA, S.R. & OLIVEIRA, R.D.A.L. 2019. *Meloidogyne paranaensis* and *M. exigua* alter coffee physiology. *Nematology* **21**:459–467.

GUISELINI, G. & SENTELHAS, P.C. 2004. Uso de malhas de sombreamento em ambiente protegido I: efeito na temperatura e na umidade do ar. *Revista Brasileira de Agrometeorologia* **12**:9-17.

HATFIELD, J.L. & DOLD, C. 2019. Water-use efficiency: advances and challenges in a changing climate. *Frontiers in Plant Science* **10**:1–14.

HUI, D.; YU, C.L.; DENG, Q.; DZANTOR, E.K.; ZHOU, S.; DENNIS, S.; SAUVE, R.; JOHNSON, T.L.; FAY, P.A.; SHEN, W. & LUO, Y. 2018. Effects of precipitation changes on switchgrass photosynthesis, growth, and biomass: A mesocosm experiment. *Plos One* **13**:1-18.

HUSSEY, R.S. & BAKER, K.R.A. 1973. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. *Plant disease reporter* **57**:1025–1028.

HUSSEY, R.S. & WILLIAMSON, V.M. 1998. Physiological and molecular aspects of nematode parasitism. *Plant and Nematode interaction* **36**:87–108.

JENKINS, W.R. 1964. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant Disease Reporter* **48**:692.

JIAO, L.; WANG, L.; ZHOU, Q. & HUANG, X. 2017. Ecotoxicology and environmental safety stomatal and non-stomatal factors regulated the photosynthesis of soybean seedlings in the presence of exogenous bisphenol A. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **145**:150–160.

KHANNA, K.; SHARMA, A.; OHRI, P.; BHARDWAJ, R.; ABD-ALLAH, E.F.; HASHEM, A. & AHMAD, P. 2019. Impact of plant growth promoting rhizobacteria in the orchestration of *Lycopersicon esculentum* Mill. Resistance to plant parasitic nematodes: A metabolomic approach to evaluate defense responses under field conditions. *Biomolecules* **9**:1-30.

LU, P.; DAVIS, R.F.; KEMERAIT, R.C.; VAN IERSE, M.W. & SCHERM, H. 2014. Physiological effects of *Meloidogyne incognita* infection on cotton genotypes with differing levels of resistance in the greenhouse. *Journal of Nematology* **46**:352–359.

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

MELAKEBERHAN, H.; FERRIS, H. & DIAS, J.M. 1990. Physiological response of resistant and susceptible *Vitis vinifera* cultivars to *Meloidogyne incognita*. *Journal of Nematology* **22**:224–230.

MIORANZA, T.M.; INAGAKI, A.M.; MÜLLER, M.A.; STANGARLIN, J.R.; GUIMARÃES, V.F.; KLEIN, J. & KUHN, O.J. 2018. Gas exchange and photosynthetic light response curves in nematode-infected tomato plants treated with *Thuya occidentalis*. *Australian Journal of Crop Science* **12**:583–591.

NOURELDEEN, A.; ASIF, M.; ANSARI, T.; KHAN, F.; SHARIQ, M.; AHMAD, F.; MFARREJ, M.F.B.; KHAN, A.; TARIQ, M.; SIDDIQUI, M.A.; AL-BARTY, A. & DARWISH, H. 2021. Effect of individual, simultaneous and sequential inoculation of *Pseudomonas fluorescens* and *Meloidogyne incognita* on growth, biochemical, enzymatic and nonenzymatic antioxidants of tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Plants* **10**:1–15.

OOSTENBRINK, M. 1966. Major characteristics of the relation between nematodes and plants. *Mededelingen / Landbouwhogeschool Wageningen* **66**:1–46.

RAMPAZZO, P.E.; MARCOS, F.C.C.; CIPRIANO, M.A.P.; MARCHIOR, P.E.R.; FREITAS, S.S.; MACHADO, E.C.; NASCIMENTO, L.C.; BROCCHI, M. & RIBEIRO, R.V. 2018. Rhizobacteria improve sugarcane growth and photosynthesis under well-watered conditions. *Annals of Applied Biology* **172**:309-320.

SCOTT, A.A.J. & KNOTT, M. 1974. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance published by: International Biometric Society Stable URL: <http://www.jstor.org/stable/2529204>. *Biometrics* **30**:507–512.

SHARMA, I.P. & SHARMA, A.K. 2016. Physiological and biochemical changes in tomato cultivar PT-3 with dual inoculation of mycorrhiza and PGPR against root-knot nematode. *Symbiosis* **71**:175-183.

SILVA, L.S.; MENDES, A.M.S.; OLIVEIRA, A.R.; PARANHOS, B.A.J.; SANTOS, C.A.F.; SILVA, D.J.; BASTOS, D.C.; BATISTA, D.C. & BARBOSA, F.R. 2010. A cultura da goiaba. 2st ed. Embrapa Informação Tecnológica - Brasília.

STRAJNAR, P.; ŠIRCA, S.; UREK, G.; ŠIRCELJ, H.; ŽELEZNIK, P. & VODNIK, D. 2012. Effect of *Meloidogyne ethiopica* parasitism on water management and physiological stress in tomato. *European Journal of Plant Pathology* **132**:49–57.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MØLLER, I.M. & MURPHY, A. 2017. Fisiologia e desenvolvimento vegetal. 6st ed. Artmed. Porto Alegre - Rio Grande do Sul.

TAYLOR, A.L. & SASSER, J.N. 1978. Biology, identification and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species). Dep. of Plant Pathology, North Carolina State University 111p.

TIGANO, M.; SIQUEIRA, K.; CASTAGNONE-SERENO, P.; MULET, K.; QUEIROZ, P.; SANTOS, M.; TEIXEIRA, C.; ALMEIDA, M.; SILVA, J. & CARNEIRO, R. 2010. Genetic diversity of the root-knot nematode *Meloidogyne enterolobii* and development of a SCAR marker for this guava-damaging species. *Plant Pathology* **59**:1054-1061.

VILJOEN, J.J.F. & LABUSCHAGNE, N. 2019. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* on tomatoes and carrots by plant growth-promoting rhizobacteria. *Tropical Plant Pathology* **44**:284–291.

ZHANG, Y.; WANG, X.J.; CHEN, S.Y.; GUO, L.Y.; SONG, M.L.; FENG, H.; LI, C. & BAI, J.G. 2015. *Bacillus methylotrophicus* isolated from the cucumber rhizosphere degrades ferulic acid in soil and affects antioxidant and rhizosphere enzyme activities. *Plant and soil* **392**:309- 321.

ZIJLSTRA, C.; DONKERS-VENNE, D.T.H.M. & FARGETTE, M. 2000. Identification of *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria* using sequence characterised amplified region (SCAR) based PCR assays. *Nematology* **2**:847–853.

ZHOU, L.; YUEN, G.; WANG, Y.; WEI, L. & JI, G. 2016. Evaluation of bacterial biological control agents for control of root- knot nematode disease on tomato. *Crop Protection* **84**:8–13.

CAPÍTULO IV: Estresse biótico causado por *Meloidogyne enterolobii* na fisiologia de goiabeiras tratadas com *Bacillus methylophilus* em campo

RESUMO

Os nematoides-das-galhas podem influenciar na fisiologia de plantas. Rizobactérias podem atuar sobre diferentes estádios do ciclo de vida do nematoide. Identificar espécies de rizobactérias com capacidade de neutralizar os efeitos prejudiciais dos nematoides sobre a fisiologia de plantas pode contribuir para o manejo mais eficiente do nematoide. O objetivo desta pesquisa foi monitorar alterações fisiológicas em goiabeiras cultivadas a campo e parasitadas por *Meloidogyne enterolobii* e tratadas com o bionemático Onix[®], ingrediente ativo *Bacillus methylophilus* (*B.met*) através do acompanhamento da condutância estomática, eficiência no uso da água, eficiência de carboxilação, fotossíntese e transpiração. O experimento foi instalado em campo e os tratamentos representados por: 1) goiabeira cv. Pedro Sato não inoculada e não tratada com *B. met* (testemunha); 2) goiabeira cv. Paluma não inoculada e não tratada com *B. met* (testemunha); 3) 'Pedro Sato' não inoculada e tratada com *B. met*; 4) 'Paluma' não inoculada e tratada com *B. met*; 5) 'Paluma' inoculada e não tratada com *B. met*; 6) 'Pedro Sato' inoculada e não tratada com *B. met*; 7) 'Pedro Sato' inoculada e tratada com *B. met* e 8) 'Paluma' inoculada e tratada com *B.met*. Foram realizadas quatro aplicações do bionemático na dosagem de 1 mL/L de água por planta. Entre a segunda e a terceira aplicação as plantas foram inoculadas com 6000 ovos e eventuais juvenis (J2) de *M. enterolobii*. Foram realizadas 10 avaliações dos parâmetros fisiológicos das goiabeiras (23, 184, 224, 275, 318, 369, 421, 465, 527 e 574 DAI) e foi estimada a produtividade. Para todos os tratamentos não houve diferença ao longo do tempo para as variáveis fisiológicas analisadas. Não houve padrão nas alterações ocasionados por *M. enterolobii* e *B.met* isolados e combinados. *Meloidogyne enterolobii* reduziu a condutância estomática em oito avaliações, a fotossíntese e eficiência no uso da água em três avaliações e a transpiração em sete avaliações. O único aumento foi observado na eficiência no uso da água aos 369 DAI. *Bacillus methylophilus* reduziu a fotossíntese aos 421 DAI, contudo aos 527 DAI houve aumento, aos 318 e 360 DAI observou-se aumento na eficiência no uso da água. *Meloidogyne enterolobii* e *B. met* combinados reduziram a condutância estomática em 8 avaliações e a transpiração em 4 avaliações. Os dois isolados combinados reduziram a fotossíntese e a eficiência no uso da água aos 421 DAI. *Meloidogyne enterolobii* e *B. met* combinados aumentaram a eficiência no uso da

água aos 369 DAI e a eficiência de carboxilação aos 224 e 465 DAI. A aplicação de *B. met* não atenuou os efeitos negativos do nematoide sobre a atividade fisiológica da goiabeira. *Meloidogyne enterolobii* e *B. met* isolados e combinados não alteraram a produtividade das goiabeiras.

Palavras-chave: controle biológico, fotossíntese, nematoide das galhas, *Psidium guajava*, rizobactérias.

Biotic stress caused by *Meloidogyne enterolobii* on the physiology of guava trees treated with *Bacillus methylotrophicus* in field conditions.

ABSTRACT

Root-knot nematodes can influence plant physiology. Rhizobacteria can act at different stages of the nematode life cycle. Identifying species of rhizobacteria capable of neutralizing the harmful effects of nematodes on plant physiology can contribute to more efficient nematode management. The objective of this study was to monitor physiological changes in guava trees parasitized by *Meloidogyne enterolobii* and treated with the bionematicide Onix[®], whose active ingredient is *Bacillus methylotrophicus* (*B.met*). This monitoring was done by assessing stomatal conductance, water use efficiency, carboxylation efficiency, photosynthesis, and transpiration. The experiment was conducted in the field, and the treatments consisted of the following: 1) guava cv. Pedro Sato non-inoculated and not treated with *B. met* (control), 2) guava cv. Paluma non-inoculated and not treated with *B. met* (control), 3) 'Pedro Sato' non-inoculated and treated with *B. met*, 4) 'Paluma' non-inoculated and treated with *B. met*, 5) 'Paluma' inoculated and not treated with *B. met*, 6) 'Pedro Sato' inoculated and not treated with *B. met*, 7) 'Pedro Sato' inoculated and treated with *B. met* and 8) 'Paluma' inoculated and treated with *B.met*. Four applications of the bionematicide were made at a dosage of 1 mL/L of water per plant. Between the second and third application, the plants were inoculated with 6000 eggs and eventual juveniles (J2) of *M. enterolobii*. Ten evaluations of the physiological parameters of the guava trees were conducted, and productivity was estimated. For all treatments, there were no significant differences over time for the analyzed physiological variables. There was no consistent pattern in the changes caused by *M. enterolobii* and *B.met*, whether isolated or combined. *Meloidogyne enterolobii* reduced stomatal conductance in eight evaluations, photosynthesis, and water use efficiency in three evaluations, and transpiration in seven evaluations. The only increase conditioned by the nematode was observed in water use efficiency at 369 days after inoculation (DAI). *Bacillus methylotrophicus* reduced photosynthesis at 421 DAI, but an increase was observed at 527 DAI. Increases in water use efficiency were observed at 318 and 360 DAI. When *M. enterolobii* and *B. met* were combined, they reduced stomatal conductance in 8 evaluations and transpiration in 4 evaluations. The two combined isolates reduced photosynthesis and water use efficiency at 421 DAI. However, when combined, *M.*

enterolobii and *B. met* increased water use efficiency at 369 DAI and carboxylation efficiency at 224 and 465 DAI. The application of *B. met* did not attenuate the negative effects of the nematode on the physiological activity of the guava trees. Neither *M. enterolobii* nor *B. met*, whether isolated or combined, altered the productivity of the guava trees.

Keywords: biological control, photosynthesis, root-knot nematode, *Psidium guajava*, rhizobacteria.

1 INTRODUÇÃO

Em determinadas condições climáticas e sob alta densidade populacional de *Meloidogyne* spp., as plantas podem enfrentar estresse hídrico e, para compensar a deficiência hídrica, os estômatos são parcialmente fechados. A absorção e a fixação de CO₂ é reduzida, resultando em alteração no processo fotossintético (Bird, 1974). O processo fotossintético é uma variável que influencia no rendimento das culturas uma vez que a produtividade é resultado da concentração interna de CO₂ e da energia solar interceptada. O aumento da taxa fotossintética proporciona maiores ganhos de produtividade, e é regulada através das trocas gasosas (Hussey & Williamson, 1998).

A condutância estomática é outra variável fisiológica que pode sofrer desequilíbrio pelo parasitismo de nematoides. É regulada pela abertura e fechamento dos estômatos e é monitorada pelo fluxo de CO₂ em direção aos cloroplastos. À medida que o potencial de água nas folhas diminui, os estômatos tornam-se mais sensíveis e a condutância estomática é reduzida pelo fechamento dos estômatos (Gomes *et al.*, 2004; Mioranza *et al.*, 2018).

A transpiração é outra variável que é controlada pela condutância estomática e envolve a água presente no xilema que é puxada para células do mesófilo e evapora para os espaços intercelulares, sob a forma de vapor é liberada no ambiente (Taiz *et al.*, 2017). Em condições ótimas de suprimento de água as plantas possuem alta taxa transpiratória, à medida que a água se torna escassa, a taxa transpiratória é reduzida a fim de economizar a água disponível na planta. Alta taxa de transpiração na planta demanda aumento evaporativo e para compensar a baixa taxa de transpiração as plantas necessitam de maior fluxo de água (Beardsell & Cohen, 1975; Karimi *et al.*, 1995; Popova *et al.*, 1996; Domiciano *et al.*, 2009).

Eficiência no uso da água é uma variável fisiológica de plantas e é resultado da relação da fotossíntese e transpiração de plantas. *Meloidogyne* spp., pode desencadear estresse hídrico em plantas e muitas vezes, a eficiência no uso da água é considerada a variável fisiológica determinante nessas condições (Blum, 2009). A relação da fotossíntese e a concentração interna de CO₂ determina o coeficiente de eficiência de carboxilação da enzima rubisco, considerada a principal enzima requerida nos processos fotossintéticos (Ikejiri *et al.*, 2007).

A fotossíntese, a transpiração e a condutância estomática são parâmetros fisiológicos que podem ser monitorados durante as trocas gasosas. A eficiência no uso da água e a eficiência de carboxilação podem ser calculadas a partir dos parâmetros fisiológicos. Alterações na fisiologia de plantas infectadas por *Meloidogyne* spp. dependem das características interativas do patossistema e pesquisas nessa área são escassas, principalmente pesquisas que abordem frutíferas. O entendimento da interferência do nematoide na fisiologia de plantas pode contribuir para otimizar as práticas de manejo.

Existem 64 nematicidas biológicos registrados pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Entretanto, nenhum dos nematicidas biológicos possuem registro para o controle de *M. enterolobii*. Cerca de 90% dos bionematicidas registrados possuem *Bacillus* spp. como ingrediente ativo (AGROFIT, 2023). Essa bactéria integra o complexo de espécies denominadas rizobactérias que atuam, principalmente na região de maior concentração de raízes e podem ser nocivas a organismos fitopatogênicos. A principal importância das rizobactérias está no controle de doenças, atribuída à sua capacidade de despertar na planta mecanismos de defesa (Ramamoorthy *et al.*, 2001; Khanna *et al.*, 2019). As rizobactérias são capazes de mitigar alterações na fisiologia de plantas induzidas por nematoides, uma vez que podem estimular a planta a aumentar o teor de pigmentos fotossintetizantes e a melhorar a absorção e translocação de nutrientes (Abd-El-Khair *et al.*, 2019; Khanna *et al.*, 2019).

O conhecimento da capacidade de *M. enterolobii* afetar a taxa fotossintética e outros parâmetros fisiológicos é importante, uma vez que grande parte do conteúdo de matéria seca e da produtividade são determinadas pela atividade fotossintética (Dalastra *et al.*, 2014). Há uma escassez de pesquisas visando entender a capacidade do nematoide de interferir na fisiologia de frutíferas e, do mesmo modo, o efeito de bionematicidas nas plantas desafiadas por nematoides. O objetivo desta pesquisa foi monitorar alterações fisiológicas em goiabeiras cultivadas a campo e parasitadas pelo nematoide *M. enterolobii* e tratadas com o bionematicida Onix[®], ingrediente ativo *Bacillus methylotrophicus* Madhaiyan *et al.*, 2010 (*B.met*) através do acompanhamento da condutância estomática, eficiência no uso da água, eficiência de carboxilação, fotossíntese e transpiração.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Localização do experimento

O experimento foi instalado em área experimental do Instituto Federal Goiano, Campus Morrinhos (Figura 5), cujas coordenadas geográficas são 17°49'10.83" de latitude Sul, 49°12'13.46" de longitude oeste, à altitude de 901 metros, no período de dezembro de 2020 a agosto de 2022. O solo da área experimental foi classificado como latossolo vermelho. Anteriormente, a área foi cultivada com pastagem para pastejo de bovinos e não possui histórico de infestação de *M. enterolobii*. Foi instalado um sistema de irrigação por gotejamento.

O clima da região, segundo a classificação de KÖPPEN, trata-se de *Aw*, equatorial/tropical com inverno seco (Kottek *et al.*, 2006).



Figura 5. Superior - Localização da área experimental situado no Instituto Federal Goiano – Campus - Morrinhos onde foi instalado o ensaio com mudas de goiabeiras. **Inferior** – Pomar com plantas de goiabeiras com 383 dias após o transplante (DAT).

2.2 Multiplicação de *Meloidogyne enterolobii*

Uma população de *M. enterolobii* oriunda de um pomar de goiabeira, variedade Cortibel RM com 7 anos de cultivo localizado em uma propriedade rural no município de Jaraguá – GO foi mantida e multiplicada em tomateiro (*Solanum lycopersicum*) cv. Santa Clara com 20-30 dias de cultivo, em casa de vegetação.

Sementes de tomate foram semeadas em sacos de polietileno de 2 L contendo mistura de solo e areia na proporção de 1:2, previamente esterilizada a 120 °C/60 min. Após 20-30 dias as mudas foram inoculadas com cerca de 8000 ovos e J2 de *M. enterolobii*. As plantas foram mantidas em casa de vegetação com regas diárias e temperatura entre 20° e 27°C.

O inóculo foi renovado a cada três meses, mediante extração de ovos e J2 das raízes de pimentão pela técnica de Hussey & Baker (1973) modificada por Bonetti & Ferraz (1981). Para isso, as raízes foram trituradas em liquidificador com solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 0,5%. A suspensão foi transferida para peneiras de 100 (0,149 mm) e 500 mesh (0,025 mm), sendo ovos e J2 recolhidos da peneira de 500 mesh e inoculados no tomateiro.

2.3 Identificação e confirmação da espécie *Meloidogyne enterolobii*

O nematoide *Meloidogyne enterolobii* foi identificado pela técnica de eletroforese de isoenzimas com base no fenótipo das esterases e por PCR, mediante o uso de *primers* específicos (Tigano *et al.*, 2010).

2.3.1 Eletroforese de Isoenzimas

Fêmeas leitosas foram extraídas das raízes de tomateiro sob microscópio estereoscópico com auxílio de pinça e estilete. Em seguida, foram colocadas em microtubos de 0,5 ml com a solução tampão de extração (20% sacarose, 2% de Triton X-100, 0,01% de azul de bromofenol e 78% de água destilada). Os microtubos foram mantidos em isopor com gelo durante todo o processo.

Cerca de 10 µl de cada amostra foram colocados, com auxílio de micropipeta, em cavidades do gel de poliacrilamida 8%. A amostra padrão consistiu em fêmeas de *M.*

javanica com perfil J3, conforme descrito por Alonso & Alfenas (1998). A corrida de eletroforese vertical foi conduzida em aparelho Mini-PROTEAN da Bio-Rad, a 200 volts, sendo a cuba mantida sob refrigeração a 4 °C por 1 hora. Após a corrida, o gel foi imerso em solução reveladora para esterase (100 mL de solução tampão fosfato de potássio 0,05M pH 6,0, 100 mg de Fast Blue RR Salt e 4,5 mL de I-naftilacetato 1%), mantido em estufa a 37 °C por 30 minutos. Em seguida, o gel foi lavado em água destilada e transferido para uma solução fixativa (45% de metanol, 9% de ácido acético e 45% de água destilada) onde permaneceu por 20 minutos em estufa a 37 °C.

O perfil de esterase revelou o fenótipo (M2) com duas bandas mais fortes e duas bandas secundárias mais fracas, como descrito por Carneiro *et al.* (2001) para *M. enterolobii*. Para *M. javanica* observaram-se três bandas fortes (J3).

2.3.2 PCR

Marcadores SCAR espécie-específicos desenvolvidos por Tigano *et al.* (2010) foram usados para confirmação da população de *Meloidogyne enterolobii* utilizada nesse estudo. O DNA genômico foi extraído de fêmeas leitosas, de formas J2 ou de ovos. Foi utilizado DNA genômico de *M. javanica* e de *M. enterolobii* como controle positivo. Os *primers* específicos, sequência MK7-F (5'-GATCAGAGGCGGGCGCATTGCGA-3') e MK7-R (5'-CGAACTCGCTCGAACTCGAC-3') para identificação de *M. enterolobii* e FJAV (5'-GGTGC GCGATTGAACTGAGC-3') e RJAV (5'-CAGGCCCTTCAGTGGAACTATAC-3') para *M. javanica* (Zijlstra *et al.*, 2000). Para cada uma das duas espécies foram misturados em quantidades equimolares e utilizados em reação Duplex-PCR. As reações foram realizadas em volume final de 25 µl contendo: 10X MgCl₂; 4 µl (1,25mM) de cada um dos dNTPs (Pharmacia Biotec), 1 µl de cada *primer* SCAR (10 µM) e 14,25 µl de água Milli-Q. As amplificações foram realizadas em termociclador (Biocycler) usando o seguinte programa: desnaturação inicial do DNA por 5 min a 94 °C; 35 ciclos de 30s a 94 °C, 45s a 64 °C e 1 min a 70 °C e período final de extensão de 8 min a 70 °C. Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose (1,4%) e visualizados sob luz ultravioleta, após coloração com brometo de etídio a 0,3 µg/ml. Os fragmentos amplificados foram de 520 pb e 670 pb para *M. enterolobii* e *M. javanica*, respectivamente.

2.4 Tratamentos e delineamento experimental

Foram avaliadas as cultivares de goiaba Paluma e Pedro Sato, distribuídas em 8 tratamentos (Tabela 9).

Tabela 9 – Cultivares de goiaba Paluma’ e ‘Pedro Sato’ distribuídas em oito tratamentos avaliados em condições de campo.

	Tratamentos
1	`Pedro Sato´ não inoculada com <i>Meloidogyne enterolobii</i> e não tratada com <i>Bacillus methylophilus</i> (<i>B. met</i>) (testemunha)
2	`Paluma´ não inoculada e não tratada com <i>B. met</i> (testemunha)
3	`Pedro Sato´ não inoculada e tratada com <i>B. met</i>
4	`Paluma´ não inoculada e tratada com <i>B. met</i>
5	`Paluma´ inoculada e não tratada com <i>B. met</i>
6	`Pedro Sato´ inoculada e não tratada com <i>B. met</i>
7	`Pedro Sato´ inoculada e tratada com <i>B. met</i>
8	`Paluma´ inoculada e tratada com <i>B.met</i>

As mudas utilizadas foram produzidas por estaquia e adquiridas de um viveiro situado no município de Morrinhos, GO cadastrado no Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento, que garantiu a sanidade das mudas.

Foi utilizado o delineamento em blocos ao acaso, com quatro repetições. Cada unidade experimental (tratamento) foi composta por três plantas de goiaba, totalizando 96 plantas de goiaba. Foi realizado o transplântio manual das mudas em covas de aproximadamente 60 x 60 x 60 cm, espaçadas 5 x 5 m entre plantas e entre linhas. Totalizando 1925 m² de área experimental (Figura 6).

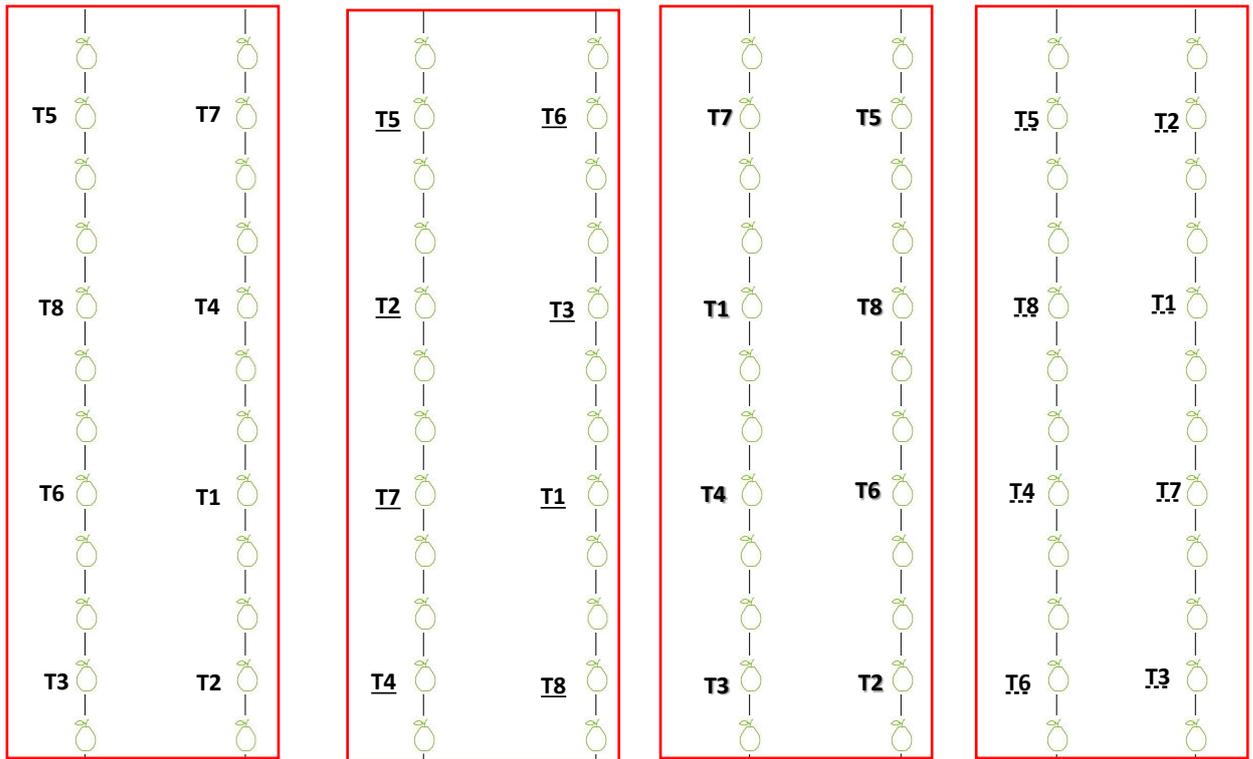


Figura 6. Representação da área experimental de goiabas com oito tratamentos e quatro blocos. Cada bloco está delimitado pelo quadrado vermelho.

2.5 Aplicações da bactéria e inoculação do nematoide

O bionemático utilizado foi cedido por um colaborador da empresa titular do registro do produto e acondicionado lacrado em refrigerador até o momento da utilização. A dosagem utilizada foi proposta por um profissional da mesma empresa com experiência no manejo de nematoides em frutíferas.

Cerca de 15 dias após o transplante (DAT) foi realizada uma aplicação ao solo de *B. met* na quantidade mínima de 1×10^9 UFC/g. Ao todo foram realizadas quatro aplicações, a intervalos de 15-20 dias, na dosagem de 1 mL/L de água, com auxílio de um regador (Figura 7). Cada planta recebeu 2 L de água. As aplicações foram realizadas entre 08:00 e 11:00 horas. Após as aplicações a irrigação foi suspensa por 24 horas e o bionemático foi fechado e acondicionado em refrigerador em temperatura de aproximadamente 5°C.



Figura 7. Direita: Dosagem do bionematicida utilizado no ensaio. Esquerda: Aplicação do produto no solo ao redor das plantas de goiabeiras.

Foi realizada a inoculação de *M. enterolobii*, com intervalos de 10 dias após a segunda aplicação (30 DAT) e 10 dias antes da terceira aplicação (50 DAT) do produto. Para as inoculações, foram extraídos os ovos e J2 de *M. enterolobii* de raízes de tomateiro de acordo com a metodologia proposta por Hussey & Baker (1973), modificada por Bonetti & Ferraz (1981). As raízes foram trituradas em liquidificador, com uma solução de hipoclorito de sódio (0,5%). As suspensões obtidas foram vertidas em peneira de 60 mesh (0,250 mm) acoplada sobre uma peneira de 500 mesh (0,025 mm). Em tubos de centrífuga contendo a suspensão de material coletado, foram adicionados 2 mL de caulim. A suspensão foi homogeneizada com bastão de vidro e, os tubos, balanceados com água.

Os nematoides foram separados dos resíduos radiculares pela técnica proposta por Jenkins (1964), com centrifugação de 1800 rpm por 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se solução de sacarose na concentração de 0,454 Kg/L ao precipitado. Após a homogeneização com o bastão de vidro e balanceamento com a solução de sacarose, levou-se novamente à centrífuga de 1800 rpm por 1 minuto. As suspensões obtidas foram vertidas em peneira de 500 mesh, lavadas cuidadosamente com água corrente, para retirar o excesso de sacarose. Em seguida, as amostras foram recolhidas em recipientes plásticos de 50 mL, para posterior contagem e calibração em

Lâmina de Peter, sob microscópio óptico. Procedeu-se, então, a inoculação das plantas com suspensões 6000 ovos e juvenis de *M. enterolobii*. As inoculações foram realizadas vertendo-se 1 mL da suspensão em quatro orifícios, de aproximadamente 8 cm abaixo da superfície do solo, equidistantes e próximos ao colo das plantas.

Foram instalados gotejadores ao longo das linhas de plantio e a irrigação seguiu conforme as condições climáticas, em épocas seca e de baixa umidade relativa do ar os gotejadores foram acionados quatro vezes ao dia nos seguintes horários: 08:00, 10:00, 14:00 e 17:00 horas, em épocas de temperaturas mais amenas e com maior umidade relativa do ar os gotejadores foram acionados três vezes ao dia nos seguintes horários: 08:00, 12:00 e 17:00 horas.

Aproximadamente 30 dias após a inoculação foram realizada coleta de solo em todos os tratamentos, em 30-40 cm de profundidade, ao redor das goiabeiras e em diferentes intervalos de tempo, para a posterior a extração e contagem dos nematoides com objetivo de atestar se o inóculo entrou em contato com as raízes das goiabeiras e acompanhar a multiplicação do nematoide.

Foi realizada uma poda de formação nas goiabeiras com 120-130 DAT. Foram realizadas aplicações com inseticidas a base dos princípios ativos Piriproxifem, Tiametoxam e Lambda-Cialotrina para controle do besouro amarelo da goiaba (*Costalimaita ferruginea vulgata* Lefèvre, 1885) e do psílideo (*Triozoida limbata* Enderlein, 1918). As aplicações foram realizadas de acordo com observações após inspeções periódicas na área de injúrias nas folhas ocasionadas pelos insetos e a constatação da presença deles. Para o controle de plantas daninhas próximas às goiabeiras foram feitas aplicações de herbicidas, e para o controle de daninhas entre as linhas utilizou-se roçadeira manual e acoplada a um trator.

2.6 Avaliações

Foi realizada uma avaliação aos 23 dias da inoculação (DAI), equivalentes aos 63 dias do transplante (63 DAT), um dia antes da última aplicação da bactéria.. As aplicações subsequentes foram aos 5 meses após a primeira avaliação, totalizando 10 avaliações, a intervalos de 40-45 dias. As avaliações foram realizadas com analisador de gás infravermelho portátil (Infrared Gas Analyser – IRGA – modelo: LI-6800) e as variáveis analisadas foram: A= fotossíntese líquida ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); E = transpiração ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), gs = condutância estomática ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), EUA = eficiência instantânea no uso da água

(A/E) [$(\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}) (\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1})$] e Eficiência de carboxilação (A/Ci) [$(\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}) (\mu\text{mol mol}^{-1})^{-1}$] em três diferentes folhas totalmente expandidas, localizadas no terço superior da planta e posicionadas entre o 3° e o 5° par de folhas a partir do ápice. No final, foram calculadas as médias. Todas as avaliações foram realizadas entre as 7h30 e 10h30 da manhã, até aos 574 DAI (614 DAT).

Nas tabelas 10 e 11 seguem as médias das condições climáticas das 07:30 às 11:00 horas durante os dias de avaliação e a precipitação pluvial mensal de 2021 e 2022.

Tabela 10 – Variáveis climáticas, registrados na estação meteorológica Agrosystem do Instituto Federal Goiano Campus Morrinhos – Goiás, nos dias de avaliações das variáveis fisiológicas.

	Temperatura média (°C)	Temperatura máxima (°C)	Temperatura mínima (°C)	UR (%)	Evapotranspiração
23 DAI	22	23	22	82	0.067
184 DAI	20	20	19	51	0.126
224 DAI	23	23	22	43	0.178
275 DAI	24	24	23	76	0.196
318 DAI	25	25	24	71	0.118
369 DAI	26	26	25	61	0.195
421 DAI	24	24	23	76	0.123
465 DAI	24	24	23	59	0.143
527 DAI	19	19	18	71	0.108
574 DAI	23	23	22	50	0.146

Tabela 11 – Precipitação pluviométrica mensal de 2021 e 2022, registrados na estação meteorológica Agrosystem do Instituto Federal Goiano Campus Morrinhos – Goiás, nos dias de avaliações das variáveis fisiológicas.

Ano	Avaliação		Precipitação pluvial (mm)
	(DAI)	Mês	
2021	-	Jan	265
	23	Fev	371
	-	Mar	94
	-	Abr	71
	-	Mai	2.8
	-	Jun	4.4
	184	Jul	0.0
	224	Ago	0.0

	-	Set	20
	275	Out	260
	318	Nov	276
	-	Dez	251
Total			1620

Ano	Avaliação (DAI)	Mês	Precipitação pluvial (mm)
2022	369	Jan	260
	-	Fev	241
	421	Mar	157
	465	Abr	43
	-	Mai	48
	527	Jun	1
	-	Jul	0
	574	Ago	2
	-	Set	66
Total			818

Para avaliação da produtividade, foram realizadas colheitas dos frutos durante a primeira frutificação das goiabeiras que se concentraram entre os meses de maio e agosto/2022 (514 DAT e 636 DAT). Foram coletados todos os frutos no estágio maduro, caracterizado pela coloração amarela sem perda de firmeza. Posteriormente os frutos foram pesados e calculadas as médias.

2.7 Análise estatística

Os dados fisiológicos foram submetidos à análise de variância, e confirmadas as pressuposições, foi aplicado o teste de Scott & Knott (1974) a 5% de probabilidade para o agrupamento das médias, utilizando o programa estatístico RStudio.

Os dados de produtividade foram transformados por $\sqrt{x} + 1$ e submetidos e à análise de variância. Foi aplicado o teste de Scott- Knott (1974) a 5% de probabilidade para o agrupamento das médias, utilizando o programa estatístico RStudio.

3 RESULTADOS

3.1 Variáveis fisiológicas

A tabela 12 abaixo mostra o número de juvenis por cm³ encontrados no solo circunvizinho a cada tratamento, em diferentes intervalos de tempo. Assim, pode-se deduzir que o inóculo infestou as raízes das goiabeiras.

Tabela 12 – Média de juvenis (J2) de *Meloidogyne enterolobii* por cm³ de solo da rizosfera de goiabeiras tratadas e não tratadas com *Bacillus methilotrophicus* em diferentes períodos (DAI – dias após a inoculação).

	105 DAI	211 DAI	261 DAI	497 DAI	532 DAI	584 DAI	623 DAI
T1	0	0	0	0	0	0	0
T2	0	0	0	0	0	0	0
T3	0	0	0	0	0	0	0
T4	0	0	0	0	0	0	0
T5	1	6	18	27	63	23	27
T6	7	6	12	24	37	14	21
T7	10	13	24	42	47	10	12
T8	12	12	20	26	58	21	48

T1: 'Pedro Sato' não inoculada e não tratada; T2: 'Paluma' não inoculada e não tratada; T3: 'Pedro Sato' não inoculada e tratada; T4: 'Paluma' não inoculada e tratada; T5: 'Paluma' inoculada e não tratada; T6: 'Pedro Sato' inoculada e não tratada; T7: 'Pedro Sato' inoculada e tratada e T8: 'Paluma' inoculada e tratada. Aos 145, 251, 301, 537, 572, 624, 663 DAT (dias após o transplante), respectivamente.

Para todos os tratamentos não houve diferença ao longo do tempo para condutância estomática, eficiência de carboxilação, eficiência no uso da água, fotossíntese e transpiração (dados não apresentados), ou seja, cada variável fisiológica em cada tratamento não se diferenciou ao longo do tempo e foram estatisticamente iguais em todos os períodos de avaliação.

Para a condutância estomática aos 184, 224, 275, 318, 369, 421, 465 e 527 DAI os tratamentos que receberam o nematoide, isolado e em combinação com a bactéria

apresentaram redução na condutância estomática e não houve diferença entre os tratamentos aos 23 e 574 DAI (Tabela 13).

Tabela 13 – Condutância estomática de goiabeiras inoculadas com *Meloidogyne enterolobii* e tratadas com *Bacillus methylotrophicus*, isolados e associados.

Condutância estomática (mol m ⁻² s ⁻¹)										
	23 DAI	184 DAI	224 DAI	275 DAI	318 DAI	369 DAI	421 DAI	465 DAI	527 DAI	574 DAI
T1	0,86 a	0,33 a	0,35 a	0,47 a	0,52 a	0,63 a	0,46 a	0,45 a	0,29 a	0,19 a
T2	0,69 a	0,32 a	0,31 a	0,50 a	0,55 a	0,53 a	0,51 a	0,42 a	0,31 a	0,21 a
T3	0,81 a	0,37 a	0,39 a	0,48 a	0,51 a	0,56 a	0,48 a	0,42 a	0,31 a	0,19 a
T4	0,71 a	0,39 a	0,36 a	0,46 a	0,50 a	0,56 a	0,53 a	0,41 a	0,28 a	0,22 a
T5	0,71 a	0,27 b	0,26 b	0,41 b	0,49 b	0,46 b	0,44 b	0,30 b	0,20 b	0,17 a
T6	0,74 a	0,24 b	0,23 b	0,43 b	0,46 b	0,44 b	0,44 b	0,35 b	0,24 b	0,16 a
T7	0,82 a	0,24 b	0,22 b	0,45 b	0,44 b	0,40 b	0,37 b	0,33 b	0,24 b	0,21 a
T8	0,71 a	0,27 b	0,34 b	0,41 b	0,42 b	0,44 b	0,42 b	0,34 b	0,22 b	0,15 a
CV(%)	19,63	26,50	26,84	22,29	27,96	31	19,10	22,48	19,10	17,25

T1: 'Pedro Sato' não inoculada e não tratada; T2: 'Paluma' não inoculada e não tratada; T3: 'Pedro Sato' não inoculada e tratada; T4: 'Paluma' não inoculada e tratada; T5: 'Paluma' inoculada e não tratada; T6: 'Pedro Sato' inoculada e não tratada; T7: 'Pedro Sato' inoculada e tratada e T8: 'Paluma' inoculada e tratada; DAI: dias após inoculação. Letras minúsculas iguais na coluna não apresentam diferença estatística pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Dias após a inoculação (DAI) equivalentes a dias após o transplato (DAT): 63, 224, 264, 315, 358, 409, 461, 505, 567 e 614.

Na eficiência de carboxilação houve diferença nos tratamentos aos 224 e 465 DAI onde os tratamentos que receberam o nematoide e a bactéria combinados apresentaram aumento na eficiência de carboxilação (Tabela 14).

Tabela 14 – Eficiência de carboxilação de goiabeiras inoculadas com *Meloidogyne enterolobii* e tratadas com *Bacillus methylotrophicus*, isolados e associados.

Eficiência de carboxilação										
	23 DAI	184 DAI	224 DAI	275 DAI	318 DAI	369 DAI	421 DAI	465 DAI	527 DAI	574 DAI
T1	0,075 a	0,053 a	0,058 b	0,076 a	0,083 a	0,089 a	0,067 a	0,060 b	0,054 a	0,040 a
T2	0,080 a	0,050 a	0,061 b	0,082 a	0,084 a	0,072 a	0,067 a	0,060 b	0,053 a	0,049 a
T3	0,086 a	0,062 a	0,065 b	0,079 a	0,089 a	0,080 a	0,073 a	0,067 b	0,055 a	0,042 a
T4	0,084 a	0,058 a	0,059 b	0,071 a	0,084 a	0,084 a	0,067 a	0,063 b	0,062 a	0,053 a

T5	0,077 a	0,057 a	0,057 b	0,067 a	0,090 a	0,081 a	0,075 a	0,061 b	0,052 a	0,043 a
T6	0,084 a	0,055 a	0,064 b	0,073 a	0,089 a	0,082 a	0,074 a	0,065 b	0,059 a	0,044 a
T7	0,080 a	0,056 a	0,068 a	0,077 a	0,082 a	0,075 a	0,082 a	0,079 a	0,056 a	0,044 a
T8	0,089 a	0,053 a	0,072 a	0,072 a	0,084 a	0,083 a	0,078 a	0,074 a	0,050 a	0,034 a

CV

(%)	16,51	27,83	13,02	14,77	14,97	20,46	11,07	12,00	18,80	16,69
------------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

T1: 'Pedro Sato' não inoculada e não tratada; T2: 'Paluma' não inoculada e não tratada; T3: 'Pedro Sato' não inoculada e tratada; T4: 'Paluma' não inoculada e tratada; T5: 'Paluma' inoculada e não tratada; T6: 'Pedro Sato' inoculada e não tratada; T7: 'Pedro Sato' inoculada e tratada e T8: 'Paluma' inoculada e tratada; DAI: dias após inoculação. Letras minúsculas iguais na coluna não apresentam diferença estatística pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Dias após a inoculação (DAI) equivalentes a dias após o transplântio (DAT): 63, 224, 264, 315, 358, 409, 461, 505, 567 e 614.

Na eficiência no uso da água os tratamentos que receberam o nematoide isolado apresentaram redução na eficiência de uso da água aos 224 e 275 DAI. Aos 318 DAI a bactéria isolada aumentou a eficiência no uso da água. Com exceção dos tratamentos controle, o nematoide e a bactéria, isolados e combinados apresentaram aumento na eficiência de uso da água aos 369 DAI. Aos 421 DAI, o nematoide, isolado e combinado com a bactéria reduziram a eficiência de uso da água das goiabeiras. Não houve diferença entre os tratamentos aos 23, 184, 465, 527 e 574 DAI (Tabela 15).

Tabela 15 – Eficiência no uso da água de goiabeiras inoculadas com *Meloidogyne enterolobii* e tratadas com *Bacillus methylotrophicus*, isolados e associados

Eficiência no uso da água ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1} \cdot \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)										
	23 DAI	184 DAI	224 DAI	275 DAI	318 DAI	369 DAI	421 DAI	465 DAI	527 DAI	574 DAI
T1	1,64 a	3,04 a	2,87 a	2,87 a	2,42 b	1,98 b	2,12 a	2,36 a	3,58 a	3,10 a
T2	1,90 a	3,02 a	2,57 a	2,92 a	2,41 b	2,13 b	2,21 a	2,32 a	3,46 a	3,29 a
T3	1,86 a	3,05 a	2,93 a	3,04 a	2,65 a	2,33 a	2,17 a	2,68 a	2,76 a	3,28 a
T4	1,98 a	2,99 a	2,78 a	2,79 a	2,52 a	2,31 a	2,09 a	2,31 a	3,30 a	3,51 a
T5	1,88 a	2,87 a	2,11 b	2,59 b	2,38 b	2,24 a	2,07 b	2,54 a	3,51 a	3,54 a
T6	1,95 a	3,06 a	2,12 b	2,41 b	2,40 b	2,44 a	2,06 b	2,30 a	3,22 a	3,66 a
T7	1,80 a	3,10 a	3,15 a	3,02 a	2,34 b	2,28 a	2,05 b	2,65 a	3,32 a	3,15 a
T8	2,10 a	2,80 a	2,72 a	2,98 a	2,4 b	2,17 a	1,99 b	2,38 a	3,03 a	3,06 a
CV(%)	14,65	12,95	15,72	17,74	11,67	16,28	16,70	18,04	15,98	11,03

T1: 'Pedro Sato' não inoculada e não tratada; T2: 'Paluma' não inoculada e não tratada; T3: 'Pedro Sato' não inoculada e tratada; T4: 'Paluma' não inoculada e tratada; T5: 'Paluma' inoculada e não tratada; T6: 'Pedro Sato' inoculada e não tratada; T7: 'Pedro Sato' inoculada e tratada e T8: 'Paluma' inoculada e tratada; DAI: dias após inoculação. Letras minúsculas iguais na coluna não apresentam diferença estatística pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Dias após a inoculação (DAI) equivalentes a dias após o transplântio (DAT): 63, 224, 264, 315, 358, 409, 461, 505, 567 e 614.

Para a fotossíntese aos 184 e 465 DAI os tratamentos que receberam o nematoide isolado apresentaram redução na fotossíntese. Aos 224 DAI os tratamentos que receberam a bactéria e o nematoide, isolados e combinados apresentaram aumento na fotossíntese, entretanto aos 421 DAI a bactéria e o nematoide, isolados e combinados reduziram a fotossíntese. Aos 527 DAI os tratamentos que receberam a bactéria isolada apresentaram aumento na fotossíntese. Não houve diferença entre os tratamentos aos 23, 275, 318, 369 e 574 DAI (Tabela 16).

Tabela 16 – Taxa fotossintética de goiabeiras inoculadas com *Meloidogyne enterolobii* e tratadas com *Bacillus methylotrophicus*, isolados e associados

Fotossíntese ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)										
	23 DAI	184 DAI	224 DAI	275 DAI	318 DAI	369 DAI	421 DAI	465 DAI	527 DAI	574 DAI
T1	23,60 a	15,84 a	15,58 b	22,03 a	23,86 a	25,71 a	21,36 a	18,38 a	13,56 b	11,39 a
T2	24,00 a	15,59 a	17,13 b	23,40 a	24,14 a	20,44 a	21,04 a	20,41 a	13,59 b	13,30 a
T3	26,26 a	16,33 a	19,31 a	22,64 a	24,92 a	22,38 a	18,53 b	18,64 a	15,85 a	11,63 a
T4	25,09 a	15,77 a	19,91 a	20,53 a	23,90 a	23,27 a	17,66 b	20,38 a	16,85 a	14,26 a
T5	23,53 a	14,72 b	15,63 a	19,42 a	25,87 a	22,63 a	17,00 b	17,32 b	13,58 b	11,64 a
T6	25,40 a	14,95 b	18,46 a	21,33 a	25,24 a	22,32 a	19,77 b	16,99 b	14,93 b	11,61 a
T7	24,68 a	15,09 a	18,05 a	21,72 a	23,66 a	20,65 a	18,96 b	19,18 a	15,00 b	12,32 a
T8	26,33 a	15,96 a	19,53 a	20,23 a	23,92 a	23,79 a	19,74 b	17,98 a	13,52 b	9,68 a
CV										
(%)	15,15	24,15	12,98	15,27	13,74	20,35	8,67	11,03	16,35	17,66

T1: 'Pedro Sato' não inoculada e não tratada; T2: 'Paluma' não inoculada e não tratada; T3: 'Pedro Sato' não inoculada e tratada; T4: 'Paluma' não inoculada e tratada; T5: 'Paluma' inoculada e não tratada; T6: 'Pedro Sato' inoculada e não tratada; T7: 'Pedro Sato' inoculada e tratada e T8: 'Paluma' inoculada e tratada; DAI: dias após inoculação. Letras minúsculas iguais na coluna não apresentam diferença estatística pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade entre os tratamentos. Dias após a inoculação (DAI) equivalentes a dias após o transplântio (DAT): 63, 224, 264, 315, 358, 409, 461, 505, 567 e 614.

Aos 184, 224 e 275 DAI os tratamentos que receberam o nematoide, isolado e em combinação com a bactéria apresentaram redução na transpiração. O nematoide isolado reduziu a transpiração aos 318, 369, 421 e 465 DAI. Entretanto, os 421 DAI, os tratamentos que receberam o nematoide e a bactéria combinados, a redução na transpiração foi acentuada. Não houve diferença entre os tratamentos aos 23, 527 e 574 DAI (Tabela 17).

Tabela 17 – Transpiração de goiabeiras inoculadas com *Meloidogyne enterolobii* e tratadas com *Bacillus methylotrophicus*, isolados e associados

Transpiração (mol m ⁻² s ⁻¹)										
	23 DAI	184 DAI	224 DAI	275 DAI	318 DAI	369 DAI	421 DAI	465 DAI	527 DAI	574DAI
T1	14,41 a	5,77 a	5,48 a	7,94 a	9,80 a	12,98 a	10,07 a	7,82 a	3,90 a	3,74 a
T2	12,74 a	5,58 a	6,67 a	8,81 a	10,12 a	9,80 a	9,58 a	9,03 a	4,18 a	4,05 a
T3	14,11 a	5,58 a	6,60 a	7,93 a	9,45 a	9,91 a	9,83 a	8,02 a	5,79 a	3,58 a
T4	12,63 a	5,85 a	5,75 a	8,00 a	9,45 a	10,11 a	11,32 a	8,86 a	5,30 a	4,07 a
T5	12,83 a	4,45 b	5,10 b	7,16 b	8,86 b	9,11 b	9,14 b	7,01 b	4,07 a	3,38 a
T6	13,20 a	4,00 b	5,26 b	7,58 b	8,63 b	9,65 b	9,33 b	7,61 b	4,78 a	3,20 a
T7	13,77 a	4,89 b	5,08 b	7,86 b	10,22 a	9,99 a	8,93 c	7,44 a	4,69 a	3,93 a
T8	12,52 a	4,39 b	4,31 b	7,09 b	9,62 a	11,71 a	9,06 c	7,59 a	4,59 a	3,12 a
CV(%)	15,62	20,86	20,57	19,54	23,48	25,13	16,86	17,82	18,29	15,23

T1: 'Pedro Sato' não inoculada e não tratada; T2: 'Paluma' não inoculada e não tratada; T3: 'Pedro Sato' não inoculada e tratada; T4: 'Paluma' não inoculada e tratada; T5: 'Paluma' inoculada e não tratada; T6: 'Pedro Sato' inoculada e não tratada; T7: 'Pedro Sato' inoculada e tratada e T8: 'Paluma' inoculada e tratada; DAI: dias após inoculação. Letras minúsculas iguais na coluna não apresentam diferença estatística pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Dias após a inoculação (DAI) equivalentes a dias após o transplântio (DAT): 63, 224, 264, 315, 358, 409, 461, 505, 567 e 614 DAT.

3.2 Produtividade

Não houve diferença entre os tratamentos para a produtividade. O nematoide e a bactéria, isolados e combinados não alteraram a produtividade das goiabeiras. A produção média das goiabeiras foi de 1,98 Kg para o tratamento Pedro Sato inoculada e não tratada e 3,45 kg para o tratamento Pedro Sato não inoculada e tratada. O formato, o tamanho e a coloração dos frutos conservaram-se o padrão comercial em todos os tratamentos.

4 DISCUSSÃO

Os tratamentos não tiveram um padrão de alteração das variáveis analisadas. Em determinados períodos *M. enterolobii* e *B. met.*, isolados e combinados aumentaram ou reduziram as variáveis fisiológicas analisadas. Possivelmente, essa ausência de padrões foi em detrimento da influência de fatores ambientais, densidade de inóculos, modo de aplicação da bactéria e combinações das aplicações do nematoide e bactéria no tempo

Houve redução na fotossíntese induzidas por *M. enterolobii* aos 184, 421 e 465 DAI, na condutância estomática a redução foi aos 184, 224, 275, 318, 369, 421, 465 e 527 DAI e na transpiração a redução foi observada aos 184, 224, 275, 318, 369, 421 e 465 DAT. Dos três períodos de redução na fotossíntese, dois períodos (184 e 465 DAT) coincidiram com o período de menor precipitação pluviométrica (0 e 43mm, respectivamente). Mais estudos precisam ser realizados com o objetivo de confirmar se a redução na fotossíntese foi devido ao nematoide ou a baixa precipitação pluviométrica que induziu a baixa umidade relativa do ar e ao mesmo tempo e conduziu a planta a um estresse que contribuiu para a redução fotossintética. Ou, talvez a redução na fotossíntese foi resultado da associação do nematoide e de baixa precipitação pluviométrica/baixa umidade relativa do ar.

Goulart *et al.* (2019), também observaram redução na fotossíntese, condutância e a transpiração aos 150 DAI de mudas de cafeeiro inoculadas com *Meloidogyne paranaensis* Carneiro, Carneiro, Abrantes, Santos & Almeida, 1996. *Meloidogyne* spp. parasita a raiz e dificulta a absorção de água e a assimilação de nutrientes, como o manganês, importante micronutriente da molécula de clorofila. Também prejudica a absorção e o transporte de água pela planta, em virtude disto, podem ser observadas alterações na fotossíntese (Strajnar *et al.*, 2012; Lu *et al.*, 2014; Ma *et al.*, 2017; Goulart *et al.*, 2019).

Meloidogyne enterolobii aumentou a fotossíntese das goiabeiras aos 224 DAI. A quantidade de inóculo do nematoide pode ter contribuído no comportamento das alterações na resposta fisiológica da goiabeira. Aos 3, 5 e 7 DAI 1000 J2s de *M. incognita* inoculados em plantas de trigo aumentaram a taxa fotossintética e aos 5 DAI 300 J2 foram capazes de induzir aumento na fotossíntese (Shi *et al.*, 2022). Diferentes concentrações

de *M. javanica* proporcionaram diferentes padrões de alterações nas variáveis fisiológicas de tomateiro avaliado aos 45 DAI. Na menor concentração de inóculo (5815 ovos) foi observado redução menos significativa na condutância estomática, eficiência de carboxilação e fotossíntese por outro lado, inoculação de 21755 ovos proporcionou redução acentuada e foi observado menor valor na condutância estomática, eficiência de carboxilação e fotossíntese. Em concentrações maiores que 21755 ovos foi observado um aumento padrão nas variáveis fisiológicas (Figueiredo *et al.*, 2020). Além disso, quanto mais precoce a planta é inoculada as alterações na resposta fisiológica são mais expressivas (Asmus & Ferraz, 2001).

Segundo Shi *et al.* (2022) o aumento na fotossíntese decorrente do parasitismo do nematoide pode ser em decorrência mecanismos de tolerância que a planta conseguiu induzir, além disso, em determinadas condições as plantas conseguem reservar energia para tolerar condições estressantes. Volume adequado de água disponível para a planta e alta intensidade luminosa podem induzir maior condutância estomática, refletindo em maior abertura estomática e conseqüentemente maior assimilação de CO₂ para a fotossíntese e maior perda de água pela transpiração e maiores valores de fotossíntese e transpiração podem ser observados (Castro *et al.*, 2019).

Aos 150 DAI *M. exigua* Göldi, 1887 não alterou a fotossíntese do cafeeiro (Goulart *et al.*, 2019), da mesma forma que *M. enterolobii* não alterou a fotossíntese das goiabeiras aos 23, 275, 318, 369 e 574 DAI. Também não houve alteração na condutância estomática aos 23 e aos 574 DAI e na transpiração aos 23, 527 e 574 DAI. *Meloidogyne paranaensis* também não alterou as trocas gasosas de cultivares de café em diferentes intervalos de tempo (Pasqualotto *et al.*, 2020).

Em cada período avaliado a goiabeira sofreu influência de fatores externos, como temperatura, excesso ou falta de água, presença de sais solúveis no solo, incidência de radiação solar e ataque de insetos e micro-organismos (Chaves *et al.*, 2009; Schock *et al.*, 2014). Os J2s de *M. enterolobii* apresentam maior eficiência no processo de penetração nas raízes em temperatura ambiente de 30°C (Velloso, *et al.*, 2022). Essa temperatura também contribui para reduzir o ciclo de vida do nematoide, e assim, o número de gerações do nematoide é maior (Velloso, *et al.*, 2022). Neste ensaio a média da temperatura nos dias de avaliação foi menor que 26°C. Talvez essa condição climática seja um dos fatores que contribuiu para ausência de alterações nas variáveis fisiológicas desencadeadas pelo nematoide, uma vez que o número de J2 que penetraram na raiz foi

reduzido e assim não provocou alterações significativas nos parâmetros fisiológicos analisados.

A menor temperatura média observada (19°C) foi aos 527 DAT e a temperatura máxima (26°C) foi observada aos 369 DAT. A maior e menor umidade relativa do ar (%) foi aos 23 e 224 DAT, respectivamente, e conseqüentemente foram nos meses de maior (fevereiro) e menor (julho/agosto) precipitação pluviométrica. Não podemos considerar que os resultados sofreram influência significantes das condições climáticas porque não se observou um padrão de alterações ou uma relação direta nas variáveis fisiológicas em função das condições climáticas vigentes. Além das condições climáticas, características químicas e físicas do solo podem influenciar na densidade populacional de *Meloidogyne* spp. (Noronha *et al.*, 2020).

Aos 421 DAI *B. met* isolado reduziu a fotossíntese da goiabeira. Possivelmente, essa redução pontual foi ocasionada por algum estresse, uma vez que em condições de estresse hídrico rizobactérias não mostram efeitos positivos na condutância estomática. E em condições em que as plantas estejam com limitação hídrica a rizobactéria não consegue sobressair para manter os níveis fotossintéticos e de condutância estomática adequados (Liu *et al.*, 2019; Rampazzo *et al.*, 2018).

Bacillus methylophilus isolado aumentou a fotossíntese das goiabeiras aos 224 e 527 DAI. *Bacillus methylophilus* também estimulou a fotossíntese e a transpiração de plantas de tabaco (Begum *et al.*, 2022). A transpiração e a condutância estomática de goiabeiras não sofreram influência da bactéria isolada nos tempos avaliados. *Bacillus methylophilus* isolado não alterou a fotossíntese aos 23, 184, 275, 318, 369, 465 e 574 DAI. *Bacillus subtilis* na capacidade de campo de 25% não influenciou positivamente na fotossíntese, condutância estomática e transpiração de mudas de açaí. Porém, quando a saturação do solo com bactérias aumentou para 75% de capacidade houve incrementos na fotossíntese, condutância estomática e transpiração (Castro *et al.*, 2019). Presume-se que a concentração de rizobactérias seja fator determinante sobre alterações na fotossíntese, condutância estomática e transpiração e a quantidade de *B. met* aplicada nas goiabeiras pode não ter sido suficiente para a bactéria expressar todo seu potencial sobre o desempenho fisiológico da frutífera (Castro *et al.*, 2019). Além disso, a qualidade do inóculo e a capacidade de competição das rizobactérias podem exercer influência sobre o comportamento e atividade sobre as plantas (Zarei *et al.*, 2022).

Meloidogyne enterolobii combinado com *B. met* reduziram a fotossíntese aos 421 DAI, a transpiração aos 184, 224, 275 e 421 DAI e redução na condutância foi observada em todos os tempos, exceto aos 23 e 574 DAI, no qual não houve diferença com os tratamentos controle. Da mesma forma, *M. incognita* combinado com *Pseudomonas aeruginosa* reduziram a fotossíntese e a transpiração do tomateiro aos 45 DAI (Khanna *et al.*, 2019).

O único aumento observado nos tratamentos que receberam o *M. enterolobii* e *B. met* combinados foi na fotossíntese aos 224 DAI. Em tomateiro inoculado com *M. incognita* e *Burkholderia gladioli* (Zopf) Yabuuchi *et al.*, 1993 houve aumento na fotossíntese e condutância estomática aos 45 DAI (Khanna *et al.*, 2019). Bactérias podem estimular o crescimento do sistema radicular e assim neutralizar os efeitos do nematoide sobre a fotossíntese, uma vez que plantas com sistema radicular bem desenvolvido podem compensar os danos dos nematoides na fisiologia de plantas (Strajnar *et al.*, 2012; Lu *et al.*, 2014; Ma *et al.*, 2017; Goulart *et al.*, 2019; Pasqualotto *et al.*, 2020).

O método de combinação das inoculações do nematoide e do agente de controle biológico podem exercer influência sobre a eficiência de controle. *Pseudomonas fluorescens* e *M. incognita* inoculados simultaneamente reduziram o teor de clorofila do tomateiro aos 60 DAI. Quando a bactéria foi inoculada 15 dias antes da inoculação do nematoide houve redução na clorofila, porém menos significativa. Quando o nematoide foi inoculado 15 dias antes da bactéria a redução na clorofila foi mais acentuada (Noureldeen *et al.*, 2021).

O modo de aplicação também é outro fator importante que determina os efeitos do nematoide sobre as variáveis fisiológicas. Foi o que encontraram Gözel & Gökbayrak (2022) ao investigarem a variação no teor de clorofila em tomateiro através das aplicações em imersão, irrigação e pulverização de um hormônio vegetal seguida pela inoculação de *M. incognita*. Os autores observaram-se que o método de aplicação influencia na concentração do hormônio vegetal. Isto sugere que a combinação das aplicações da bactéria e a inoculação com *M. enterolobii*, assim como o modo de aplicação da bactéria podem ter influenciado nos resultados.

Meloidogyne enterolobii isolado reduziu a eficiência no uso da água aos 224, 275 e 421 DAI, do mesmo modo *M. incognita* aos 35 DAI reduziu a eficiência no uso da água de plantas de pepino (Atia *et al.*, 2020). Houve aumento na eficiência no uso da água aos

369 DAI nos tratamentos que receberam o nematoide isolado. *Bacillus methylotrophicus* isolado aumentou a eficiência no uso da água aos 318 e 369 DAI.

Aos 421 DAI *M. enterolobii* em combinação com *B. met* reduziram a eficiência no uso da água e aumentaram aos 369 DAI do mesmo modo que plantas de tomate inoculadas com *M. javanica* e tratadas com vermicomposto de *Trichoderma asperellum* e *T. virens* aumentaram a eficiência no uso da água aos 50 DAI (Pereira *et al.*, 2021). *Meloidogyne incognita* em combinação com *Piriformospora indica* reduziram a eficiência no uso da água em plantas de pepino avaliados aos 35 DAI (Atia *et al.*, 2020).

Meloidogyne enterolobii combinado com *B. met* aumentaram a eficiência de carboxilação aos 224 e 465 DAI, esse período coincidiu com o menor índice pluviométrico para o mês em questão (0mm e 43mm). O aumento na eficiência de carboxilação é motivado pelo aumento na concentração interna de CO₂ e na taxa de assimilação de CO₂ (Ferraz *et al.*, 2012). Tomateiro e pimentão inoculados com *M. javanica* e tratados com vermicomposto enriquecido com *Trichoderma asperellum* e *T. virens* também apresentaram aumento na eficiência de carboxilação aos 50 DAI (Pereira *et al.*, 2021).

Independente do período avaliado *M. enterolobii* e *B. met* isolados não influenciaram na eficiência de carboxilação. Bulegon *et al.* (2016) não observaram variação na eficiência de carboxilação nos estágios fenológicas iniciais (V2, V4 e V6) da cultura da soja que foi submetida ao tratamento de sementes com inoculação e co-inoculação *Bradyrhizobium* e *Azospirillum*. A temperatura é uma condição climática que influencia na máxima eficiência de carboxilação e os maiores valores são encontrados nos horários em que a temperatura atinge a faixa de 20°C a 30°C (Ferraz *et al.*, 2012; Schock *et al.*, 2014). Não houve diferença na eficiência de carboxilação em três cultivares de feijoeiro avaliados por Ferraz *et al.* (2012), entretanto houve variação na eficiência de carboxilação durante o dia e incremento na eficiência de carboxilação foi observado no intervalo de 10 às 11 horas.

Com relação à produtividade, *M. enterolobii* e *B. met* isolados e combinados não alteraram a produtividade das goiabeiras. Formulações com *Paecilomyces lilacinus* e *Arthrobotrys*, combinados e com espécies de rizobactérias associadas e três isolados também não reduziram os danos causados por *M. enterolobii* em goiabeiras e não influenciaram na produtividade (Almeida *et al.*, 2011).

5 CONCLUSÕES

Em todas as avaliações não houve padrão nas alterações ocasionados por *M. enterolobii* e *B. met* isolados e combinados. *Meloidogyne enterolobii* isolado reduziu a condutância estomática a partir dos 184 DAI até aos 527 DAI, na fotossíntese houve redução aos 184, 421, 465 DAI e na transpiração a redução foi de 184 até 465 DAI. A redução na eficiência de uso da água foi observada as 224, 275 e 421 DAI. O nematoide isolado aumentou a eficiência no uso da água aos 369 DAI.

Bacillus methylotrophicus isolado reduziu a fotossíntese aos 421 DAI, houve aumento na fotossíntese aos 527 DAI. Aos 318 e 369 DAI *B. met* aumentou a eficiência no uso da água. *Meloidogyne enterolobii* e *B. met* combinados reduziram a condutância estomática dos 184 aos 527 DAI e a fotossíntese foi reduzida aos 421 DAI. Na transpiração houve redução dos 184 até 275 e 421 DAI. Na eficiência de uso da água foi observada aumento aos 369 DAI e redução aos 421 DAI. *Meloidogyne enterolobii* e *B. met* combinados aumentaram a eficiência de carboxilação aos 224 e 465 DAI. *Meloidogyne enterolobii* e *B. met* isolados e combinados não alteraram a produtividade das goiabeiras.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABD-EL-KHAIR, H.; EL-NAGDI, W.M.A.; YOUSSEF, M.M.A.; ABD-ELGAWAD, M.M.M. & DAWOOD, M.G. 2019. Protective effect of *Bacillus subtilis*, *B. pumilus*, and *Pseudomonas fluorescens* isolates against root knot nematode *Meloidogyne incognita* on cowpea. *Bulletin of the National Research Centre* **43**:1–7.
- AGROFIT. 2023. Sistemas de agrotóxicos fitossanitários. Disponível em: <https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso: 15 mai 2023.
- ALMEIDA, A.M.; GOMES, V.M. & SOUZA, R.M. 2011. Greenhouse and field assessment of rhizobacteria to control guava decline. *Bragantia* **70**:837-842.
- ALONSO, S. K. de; ALFENAS, A. C. 1998. Isoenzimas na taxonomia e na genética de fitonematóides. In: ALFENAS, A. C. (ed.). Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos. UFV. Viçosa. p. 26-543.
- ASMUS, G.L. & FERRAZ, L.C.C.B. 2001. Relações entre a densidade populacional de *Meloidogyne javanica* e a área foliar, a fotossíntese e os danos causados a variedades de soja. *Nematologia Brasileira* **25**:01–13.
- ATIA, M.A.M.; ABDELDAYM, E.A.; ABDELSATTAR, M.; IBRAHIM, D.S.S.; SALEH, I.; ELWAHAB, M.A.; OSMAN, G.H.; ARIF, I.A. & ABDELAZIZ, M.E. 2020. *Piriformospora indica* promotes cucumber tolerance against Root-knot nematode by modulating photosynthesis and innate responsive genes. *Saudi Journal of Biological Sciences* **27**:279–287.
- BEARDSELL, M.F. & COHEN, D. 1975. Relationships between leaf water status, abscisic acid levels, and stomatal resistance in maize and sorghum. *Plant Physiology* **56**:207–212.
- BEGUM, N.; WANG, L.; AHMAD, H.; AKHTAR, K.; ROY, R. & KHAN, M.I.; ZHAO, T. 2022. Co-inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi and the plant growth-promoting rhizobacteria improve growth and photosynthesis in tobacco under drought stress by up-regulating antioxidant and mineral nutrition metabolism. *Microbial Ecology* **4**:971-988.
- BIRD, A.F. 1974. Plant response to root-knot nematode. *Annual Review of Phytopathology* **12**:69–85.
- BLUM, A. 2009. Effective use of water (EUW) and not water-use efficiency (WUE) is the target of crop yield improvement under drought stress. *Field Crops Research* **112**:119–123.

BONETTI, J.I. & FERRAZ, S. 1981. Modificações do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* em raízes de cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira* **6** (Resumo).

BULEGON, L.G.; GUIMARÃES, V.F.; EGEWARTH, V.A. SANTOS, M.G.; HELING, A.L.; FERREIRA, S.D.; WENGRAT, A.P.G. & BATTISTUS, A.G. 2016. Crescimento e trocas gasosas no período vegetativo da soja inoculada com bactérias diazotróficas. *Nativa* **4**:277–286.

CARNEIRO, R.M.D.G.; ALMEIDA, M.R.A & QUÉNHERVÉ, P. 2000. Enzyme phenotype of *Meloidogyne* spp. populations. *Nematology* **2**:645-654.

CARNEIRO, R.M.D & ALMEIDA, M.R.A. 2001. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematóides de galhas para identificação de espécie. *Nematol Bras* **25**:35-44.

CASTRO, G.L.S.; SILVA JÚNIOR, D.D.; VIANA, R.G.; RÊGO, M.C.F. & SILVA, G.B. 2019. Photosynthetic apparatus protection and drought effect mitigation in açai palm seedlings by rhizobacteria. *Acta Physiologiae Plantarum* **41**:1–12.

CHAVES, M.M.; FLEXAS, J. & PINHEIRO, C. 2009. Photosynthesis under drought and salt stress: Regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany* **103**:551–560.

DALASTRA, G.M.; ECHER, M.D.M.; GUIMARÃES, V.F.; HACHMANN, T.L. & INAGAKI, A.M. 2014. Trocas gasosas e produtividade de três cultivares de meloeiro conduzidas com um e dois frutos por planta. *Bragantia* **73**:365–371.

DOMICIANO, G.P.; RESENDE, R.S. & RODRIGUES, F.A. 2009. Alteração na fotossíntese de plantas infectadas por patógenos. *Revista Anual Patologia de Plantas* **17**:305-339.

FERRAZ, R.L. S.; MELO, A.S.; SUASSUNA, J.F.; BRITO, M.E.B.; FERNANDES, P.D. & NUNES JÚNIOR, E. S. 2012. Trocas gasosas e eficiência fotossintética em ecótipos de feijoeiro cultivados no semiárido. *Pesquisa Agropecuária Tropical* **42**:181–188.

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

GOMES, M.M.A.; LAGÔA, A.M.M.A.; MEDINA, C.L.; MACHADO, E.C. & MACHADO, M.A. 2004. Interactions between leaf water potential, stomatal conductance and abscisic acid content of orange trees submitted to drought stress. *Brazilian Journal of Plant Physiology* **16**:155–161.

GOULART, R.R.; TERRA, W.C.; SALGADO, S.M.L.; ALVES, J.D.; CAMPOS, V.P.; FATOBENE, B.J.R.; MARCHIORI, P.E.R.; SOUZA, S.R. & OLIVEIRA, R.D.A.L. 2019. *Meloidogyne paranaensis* and *M. exigua* alter coffee physiology. *Nematology* **21**:459–467.

GÖZEL, Ç. & GÖKBAYRAK, Z. 2022. Influence of 24-epibrassinolide on physiological characteristics of tomato seedlings infested with root-knot nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949 (Tylenchida:Meloidogynidae). *Journal of Agricultural Sciences* **28**:650–65.

HATFIELD, J.L. & DOLD, C. 2019. Water-use efficiency: advances and challenges in a changing climate. *Frontiers in Plant Science* **10**:1–14.

HUSSEY, R.S. & BAKER, K.R.A. 1973. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. *Plant disease reporter* **57**:1025–1028.

HUSSEY, R.S. & WILLIAMSON, V.M. 1998. Physiological and molecular aspects of nematode parasitism. *Plant and Nematode interaction* **36**:87–108.

IKEJIRI, L.; CAMILLI, L.; KLEIN, J.; RODRIGUES, J. D. & BOARO, C. S. F. 2007. Avaliação da limitação estomática e mesofílica da assimilação de CO₂ em girassol ornamental cultivado com lodo de esgoto. *Revista Brasileira de Biociências* **5**:855-857.

JENKINS, W.R. 1964. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant Disease Reporter* **48**:692.

KARIMI, M; MONTAGU, M.V. & GHEYSEN, G. 1995. Exogenous application of abscissic acid to potato plants suppresses reproduction of *Meloidogyne incognita*. *Mededelingen Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen Universiteit Gent (Belgium)*.

KHANNA, K.; SHARMA, A.; OHRI, P.; BHARDWAJ, R.; ABD-ALLAH, E.F.; HASHEM, A. & AHMAD, P. 2019. Impact of plant growth promoting rhizobacteria in the orchestration of *Lycopersicon esculentum* Mill. resistance to plant parasitic nematodes: A metabolomic approach to evaluate defense responses under field conditions. *Biomolecules* **9**:1-30.

KOTTEK, M.; GRIESER, J.; BECK, C.; RUDOLF, B. & RUBEL, F. 2006. World Map of Koppen-Geiger Climate Classification updated. *Meteorologische Zeitschrift* **15**:259-263.

LIU, F.; MA, H.; PENG, L.; DU, Z.; MA, B. & LIU, X. 2019. Effect of the inoculation of plant growth-promoting rhizobacteria on the photosynthetic characteristics of *Sambucus williamsii* Hance container seedlings under drought stress. *AMB Express* **9**:1-9.

LU, P.; DAVIS, R.F.; KEMERAIT, R.C.; VAN IERSE, M.W. & SCHERM, H. 2014. Physiological effects of *Meloidogyne incognita* infection on cotton genotypes with differing levels of resistance in the greenhouse. *Journal of Nematology* **46**:352–359.

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

MIORANZA, T.M.; INAGAKI, A.M.; MÜLLER, M.A.; STANGARLIN, J.R.; GUIMARÃES, V.F.; KLEIN, J. & KUHN, O.J. 2018. Gas exchange and photosynthetic light response curves in nematode-infected tomato plants treated with *Thuya occidentalis*. *Australian Journal of Crop Science* **12**:583–591.

NORONHA, M.A.; FERNANDES, M.F.; MUNIZ, M.F.S.; PEDROSA, E.M.R.; ASSUNÇÃO, M.C. & CALHEIROS, L.C. 2020. Soil abiotic factors associated with *Meloidogyne* spp. and *Pratylenchus* spp. populations in sugarcane. *Nematology* **23**:125–137.

NOURELDEEN, A.; ASIF, M.; ANSARI, T.; KHAN, F.; SHARIQ, M.; AHMAD, F.; MFARREJ, M.F.B.; KHAN, A.; TARIQ, M.; SIDDIQUI, M.A.; AL-BARTY, A. & DARWISH, H. 2021. Effect of individual, simultaneous and sequential inoculation of *Pseudomonas fluorescens* and *Meloidogyne incognita* on growth, biochemical, enzymatic and nonenzymatic antioxidants of tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Plants* **10**:1–15.

PASQUALOTTO, A.T.; SALGADO, S.M.L.; TERRA, W.C.; FATOBENE, B.J.R.; SILVEIRA, H.R.O.; SANTOS, M.O.; CAMPOS, V.C. & SILVA, V.A. 2020. Root morphology, gas exchange and chlorophyll fluorescence of coffee cultivars and progenies are altered by *Meloidogyne paranaensis* infestation and water deficit. *Journal of Phytopathology* **168**:220–227.

PEREIRA, T.S.; PAULA, A.M.; FERRARI, L.H.; SILVA, J.; PINHEIRO, J.B.; CAJAMARCA, M.N.; JINDO, K.; SANTOS, M.P.; ZANDONADI, D.B. & BUSATO, J.G. 2021. Trichoderma-enriched vermicompost extracts reduces nematode biotic stress in tomato and bell pepper crops. *Agronomy* **11**:1–13.

POPOVA, L.P.; TSONEV, T.D.; LAZOVA, G.N. & STOINOVA, Z.G. 1996. Drought- and ABA-induced changes in photosynthesis of barley plants. *Physiologia Plantarum* **96**:623–629.

RAMAMOORTHY, V.; VISWANATHAN, R.; RAGUCHANDER, T.; PRAKASAM, V.; SAMIYAPPAN, R. 2001. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. *Crop Protection* **20**:1–11.

RAMPAZZO, P.E.; MARCOS, F.C.C.; CIPRIANO, M.A.P.; MARCHIOR, P.E.R.; FREITAS, S.S.; MACHADO, E.C.; NASCIMENTO, L.C.; BROCCHI, M. & RIBEIRO,

R.V. 2018. Rhizobacteria improve sugarcane growth and photosynthesis under well-watered conditions. *Annals of Applied Biology* **172**:309-320.

SCHOCK, A.A.; RAMM, A.; MARTINAZZO, E.G.; SILVA, D.M. & BACARIN, M.A. 2014. Crescimento e fotossíntese de plantas de pinhão-mansão cultivadas em diferentes condições de luminosidade. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* **18**:3-9.

SCOTT, A.A.J. & KNOTT, M. 1974. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance published by: International Biometric Society Stable URL: <http://www.jstor.org/stable/2529204>. *Biometrics* **30**:507-512.

SHI, J.; LIU, H.; PHAM, TH.C.; HU, X.; LIU, L.; WANG, C.; FOBA, C.N.; WANG, S. & WANG, M. 2022. Volatiles and hormones mediated root-knot nematode induced wheat defense response to foliar herbivore aphid. *Science of the Total Environment* **815**:1-12.

STRAJNAR, P.; ŠIRCA, S.; UREK, G.; ŠIRCELJ, H.; ŽELEZNIK, P. & VODNIK, D. 2012. Effect of *Meloidogyne ethiopica* parasitism on water management and physiological stress in tomato. *European Journal of Plant Pathology* **132**:49-57.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MØLLER, I.M. & MURPHY, A. 2017. Fisiologia e desenvolvimento vegetal. 6th ed. Artmed. Porto Alegre - Rio Grande do Sul.

TIGANO, M.; SIQUEIRA, K.; CASTAGNONE-SERENO, P.; MULET, K.; QUEIROZ, P.; SANTOS, M.; TEIXEIRA, C.; ALMEIDA, M.; SILVA, J. & CARNEIRO, R. 2010. Genetic diversity of the root-knot nematode *Meloidogyne enterolobii* and development of a SCAR marker for this guava-damaging species. *Plant Pathology* **59**:1054-1061.

VELLOSO, J.A.; MAQUILAN, M.A.; CAMPOS, V.P.; BRITO, J.A. & DICKSON, D.W. 2022. Temperature Effects on Development of *Meloidogyne enterolobii* and *M. floridensis*. *Journal of Nematology* **54**:1-11.

ZAREI, T. 2022. Balancing water deficit stress with plant growth-promoting rhizobacteria: A case study in maize. *Rhizosphere* **24**:100621.

ZIJLSTRA, C.; DONKERS-VENNE, D.T.H.M. & FARGETTE, M. 2000. Identification of *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria* using sequence characterised amplified region (SCAR) based PCR assays. *Nematology* **2**:847-853.

ANEXO

BIOTIC STRESS CAUSED BY *MELOIDOGYNE ENTEROLOBII* IN THE PHYSIOLOGY OF GUAVA TREE TREATED WITH *BACILLUS* *METHYLOTROPHICUS*

Karoliny de Almeida Souza

Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Fitopatologia

Brasília-DF

0000-0001-6736-160X

Nadson de Carvalho Pontes

Instituto Federal Goiano Campus Morrinhos

Morrinhos-GO

0000-0003-2850-8415

Cleber Furlanetto

Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Fitopatologia

Brasília-DF

0000-0003-0575-0487

Juvenil Enrique Cares

Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Fitopatologia

Brasília-DF

0000-0003-3325-5221

ABSTRACT: The interference of nematodes in the physiology of plants is little studied, as well as the ability of rhizobacteria to mitigate the physiological damage caused by nematodes. The objectives of this studies were to monitor physiological changes in guava plants parasitized by *Meloidogyne enterolobii* and treated with bionematicide, active ingredient: *Bacillus methylophilus* (*B.met*) and to evaluate the efficiency of the bionematicide in controlling the nematode. The experiment was installed in a greenhouse and the treatments represented by: 1) 'Pedro Sato' guava non-inoculated and not treated with *B. met* (control); 2) 'Paluma' guava non-inoculated and not treated with *B. met* (control); 3) 'Pedro Sato' non-inoculated and treated with *B. met*; 4) 'Paluma' not inoculated and treated with *B. met*; 5) 'Paluma' inoculated and not treated with *B. met*; 6) 'Pedro

Sato´ inoculated and not treated with *B. met*; 7) `Pedro Sato´ inoculated and treated with *B. met* and 8) `Paluma´ inoculated and treated with *B. met*. Four applications of bionematicide were performed at a dosage of 3 mL/L of water per plant. Between the second and third application, the plants were inoculated with 5000 eggs and juveniles of *M. enterolobii*. Seven assessments of the physiological parameters were performed. At 132 days after inoculation (DAI) the roots were weighed and the gall index, egg mass index and the reproduction factor were determined. *Meloidogyne enterolobii* and *B. met* combined reduced the stomatal conductance and transpiration at 26 and 44 DAI, respectively. Photosynthesis was lower at 26 DAI in treatments that received the nematode and bacteria combined. *Meloidogyne enterolobii* and *B. met* isolated and combined reduced water use efficiency at 26 and 44 DAI. In root mass there was no difference between treatments. Gall index, egg mass index and reproduction factor were higher in treatments that received nematodes, regardless of the application with the bacteria.

KEY WORDS: alternative control, biological control, photosynthesis, root-knot nematode, rhizobacteria

1.INTRODUCTION

The guava plant (*Psidium guajava*) belongs to the *Myrtaceae* family and is native to tropical America and, among the 150 species of the genus, it is considered the species of greatest economic importance. Guava is among the most nutritious fruits, being rich in vitamin C and a source of vitamins A, B1, B2 and B3 (Pereira & Nachtigal, 2002; Oliveira et al., 2012).

A species of root-knot nematode, identified as *Meloidogyne mayaguensis*, which later became synonymous with *M. enterolobii*, is currently the main phytosanitary problem for guava in Brazil (EPPO, 2023). *Meloidogyne enterolobii* causes significant losses in production and frequently, the grower is obliged to eradicate the orchard, once present in the area, the nematode control is not efficient (Pereira et al., 2009). *Meloidogyne enterolobii*, in addition to being a polyphagous nematode, it is an aggressive species and differs from other *Meloidogyne* species for being able to overcome the resistance of dominant genes used to control *Meloidogyne* spp., such as the Mh gene in potatoes, the Mir1 gene in soybeans, the N gene in pepper, the Mi gene in tomato (Abrão & Mazzafera, 2001; Kiewnick et al., 2009).

The main direct symptom in plants infected by *Meloidogyne* spp. is the formation of galls on the roots (Collett et al., 2021). The galls influence the uptake and flow of water from the roots to the shoot, reduce water conductivity, induce

morphological changes in the xylem and phloem cells, and make the functioning of conductive vessels unfeasible and, as a consequence, the plant suffers water stress. In addition, the presence of the nematode can trigger physiological and biochemical changes in plants. All these modifications are able to induce changes in the optimal conditions of photosynthetic rate, stomatal conductivity and transpiration rate (Abrão & Mazzafera, 2001; Domiciano et al., 2009; Azam et al., 2011; Strajnar et al., 2012).

In order to seek new means of controlling nematodes, products based on fungi and bacteria with nematicidal properties and which, in addition, induce resistance mechanisms in the plant, have been growing in importance and use worldwide (Mioranza et al., 2018). *Bacillus* spp. are part of the complex of rhizobacteria species that act mainly in the region with the highest root concentration and have negative effects against phytopathogenic organisms. Rhizobacteria can mitigate changes in photosynthesis, stomatal conductance and transpiration induced by root-knot nematodes, since they can contribute to an increase in the amount of photosynthetic pigments by protecting the biochemical mechanisms involved in the synthesis of the photosynthetic process and improving the absorption and translocation of nutrients by the plant (Abd-El-Khair et al., 2019; Khanna et al., 2019).

Knowing the ability of *M. enterolobii* to influence the photosynthetic rate, stomatal conductance and transpiration is important since a large part of the dry matter content and productivity are determined by the photosynthetic machinery (Dalastra et al., 2014). There are still no studies that seek to understand the capacity of the nematode to interfere in these physiological processes, as well as the treatment with *Bacillus* can counteract the negative effects of the nematode on guava. The objectives of this study were to monitor physiological changes in guava plants parasitized by the nematode *Meloidogyne enterolobii* and treated with the bionematicide Onix©, active ingredient *Bacillus methylophilus* (*B. met*) by monitoring stomatal conductance, efficiency in water use, photosynthesis and transpiration and evaluating the efficiency of the bionematicide in controlling the nematode.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Multiplication of *Meloidogyne enterolobii*

A population of *M. enterolobii* from the Department of Phytopathology of ``Universidade de Brasília`` maintained in tomato (*Solanum lycopersicum*) cv. Santa Clara was used in this study. Before inoculation, this population was multiplied in tomato for three months under greenhouse conditions. The nematode was identified by the esterase phenotype technique (Carneiro & Almeida, 2001) and through specific *primers* MK7-F and MK7-R (Tigano et al., 2010).

2.2 Treatments and experimental design

The guava cultivars Paluma and Pedro Sato were evaluated, distributed in 8 treatments represented by: 1) `Pedro Sato´ non-inoculated and not treated with *B. met* (control); 2) `Paluma´ non-inoculated and not treated with *B. met* (control); 3) `Pedro Sato´ non-inoculated and treated with *B. met*; 4) `Paluma´ non-inoculated and treated with *B. met*; 5) `Paluma´ inoculated and not treated with *B. met*; 6) `Pedro Sato´ inoculated and not treated with *B. met*; 7) `Pedro Sato´ inoculated and treated with *B. met* and 8) `Paluma´ inoculated and treated with *B. met*. Clonal seedlings were obtained from a nursery located in the municipality of Morrinhos, GO registered with the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply.

The experiment was installed in a greenhouse and conducted from January 2021 to July 2021. A completely randomized design was used, with five replications, with the experimental unit represented by one plant per pot. The seedlings were transplanted into polyethylene bags measuring 35 x 40cm, with an approximate volume of 11L, filled with autoclaved soil in a 2:1 ratio (sand: soil).

2.3 Bacterial applications, nematode inoculation and evaluations

Seven days after transplanting (DAT) the bacterium was applied to the soil in the minimum amount of 1×10^9 UFC/mL. Four applications were performed at a dosage of 3 mL of the commercial product per liter of suspension per plant with

the aid of a watering can. Subsequent applications were performed at intervals of 15 days.

Between the second (21 DAT) and the third (35 DAT) application, inoculation was performed with 5000 eggs and eventual juveniles (J2) of *M. enterolobii* in an interval of one week after and before the applications of the bacteria, respectively. The eggs and J2 were extracted from the roots according to the method of Hussey & Baker (1973) modified by Bonetti & Ferraz (1981). Inoculation was performed by pouring 1 mL of the suspension into four equidistant orifices, close to the plant.

From five days after the last application of the product with the bacteria and 26 DAI (days after inoculation), fortnightly evaluations were carried out with a portable infrared gas analyzer (Infrared Gas Analyzer – IRGA – model: LI-6800) of the variables: A = liquid photosynthesis ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); E = transpiration ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), gs = stomatal conductance ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and USA = Water use efficiency ($A/E - \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1} \cdot \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) in a fully expanded leaf located in the upper third of the plant and positioned between the 3rd and 5th pair of leaves from apex. All assessments were carried out between 7:30 am and 10:30 am until 118 DAI (146 DAT).

At 132 DAI the roots were washed in running water, weighed and stained with Phloxin B (Taylor & Sasser, 1978). The counting of galls and egg mass was carried out, according to the scale of notes established by Taylor & Sasser (1978). For calculation of gall index (GI) and egg mass index (IMO) (1: 1-2 galls or egg mass; 2: 3-10 galls or egg mass; 3: 11-30 galls or egg masses; 4: 31-100 galls or egg masses; and 5: over 100 galls or egg masses per root system). After counting, the nematodes were extracted from the roots following the method of Hussey & Barker (1973), modified by Bonetti & Ferraz (1981). The reproduction factor (FR) was obtained by the relation between final and initial population densities ($FR = P_f/P_i$) according to Oostenbrink (1966).

2.4 Statistical analysis

The data were transformed by $\sqrt{x} + 1$ and submitted to analysis of variance. The Scott-Knott test (1974) was applied at 5% probability for grouping the means, using the statistical program RStudio.

3.RESULTS

3.1 Physiological variables

For transpiration at 26 and 44 DAI, the treatments that received the nematode and the bacteria, combined, showed a lower transpiration rate, differing from the other treatments (Table 1).

Table 1 – Transpiration rate of guava trees inoculated with *Meloidogyne enterolobii* and treated with *Bacillus methylotrophicus*, separately and associated.

Transpiration (mol m ⁻² s ⁻¹)							
	26 DAI	44 DAI	56 DAI	68 DAI	92 DAI	104 DAI	118 DAI
T1	12.0 a	11.1 a	8.9 a	7.3 a	4.8 a	7.6 a	4.9 a
T2	12.6 a	11.6 a	10.6 a	9.1 a	4.6 a	8.0 a	4.3 a
T3	11.6 a	10.2 a	10.1 a	10. a	6.1 a	9.7 a	8.4 a
T4	11.4 a	11.0 a	8.8 a	7.4 a	5.1 a	9.0 a	5.5 a
T5	11.9 a	11.2 a	10.4 a	8.6 a	5.2 a	6.9 a	4.5a
T6	14.1 a	11.0 a	11.0 a	10.3 a	6.2 a	8.5 a	5.1 a
T7	9.10 b	6.6 b	7.5 a	8.8 a	4.8 a	6.8 a	6.2 a
T8	10.1 b	8.9 b	8.1 a	8.7 a	5.8 a	8.7 a	6.8 a
CV%	0.11	0.11	0.11	0.13	0.07	0.12	0.13

T1: `Pedro Sato´ uninoculated and untreated; T2: Uninoculated and untreated `Paluma´; T3: `Pedro Sato´ not inoculated and treated; T4: `Paluma´ not inoculated and treated; T5: `Paluma´ inoculated and untreated; T6: `Pedro Sato´ inoculated and not treated; T7: `Pedro Sato´ inoculated and treated and T8: `Paluma´ inoculated and treated; DAI: days after inoculation. DAT days after transplantation. Equal capital letters on the line do not show statistical difference. Equal lowercase letters in the column do not show statistical difference by the Scott-Knott test at 5% probability. (54, 85, 97, 110, 132 and 146 DAT).

Regarding photosynthesis, the only difference observed was at 26 DAI, treatments `Pedro Sato´ and `Paluma´ inoculated and treated with *B. met* showed the lowest photosynthetic rates (Table 2).

Table 2 - Photosynthetic rate of guava trees inoculated with *Meloidogyne enterolobii* and treated with *Bacillus methylotrophicus*, separately and associated.

Photosynthesis (µmol m ⁻² s ⁻¹)							
	26 DAI	44 DAI	56 DAI	68 DAI	92 DAI	104 DAI	118 DAI
T1	16.56 a	13.91 a	13.62 a	12.43 a	10.09 a	9.89 a	9.50 a
T2	14.72 a	12.88 a	12.90 a	14.21 a	8.55 a	9.43 a	6.50 a

T3	13.43 a	10.13 a	13.24 a	13.40 a	11.03 a	11.24 a	10.98 a
T4	14.18 a	11.49 a	13.16 a	13.19 a	10.08 a	9.96 a	8.39 a
T5	15.08 a	13.45 a	13.78 a	12.39 a	8.57 a	8.85 a	7.03 a
T6	16.10 a	13.08 a	13.83 a	14.87 a	11.54 a	10.22 a	9.04 a
T7	12.35 b	11.28 a	12.52 a	12.71 a	10.05 a	9.41 a	9.19 a
T8	12.91 b	11.80 a	12.90 a	13.00 a	10.54 a	9.83 a	9.37 a
CV%	9.32	8.27	8.19	12.00	11.55	12.00	14.48

T1: `Pedro Sato` uninoculated and untreated; T2: Uninoculated and untreated `Paluma`; T3: `Pedro Sato` not inoculated and treated; T4: `Paluma` not inoculated and treated; T5: `Paluma` inoculated and untreated; T6: `Pedro Sato` inoculated and not treated; T7: `Pedro Sato` inoculated and treated and T8: `Paluma` inoculated and treated; DAI: days after inoculation. Equal capital letters on the line do not show statistical difference. Equal lowercase letters in the column do not show statistical difference by the Scott-Knott test at 5% probability. (54, 85, 97, 110, 132 and 146 DAT).

For stomatal conductance, treatments with `Pedro Sato` and `Paluma` inoculated and treated, showed lower conductance at 26 DAI and 44 DAI (Table 3).

Table 3 – Stomatal conductance of guava trees inoculated with *Meloidogyne enterolobii* and treated with *Bacillus methylotrophicus*, separately and associated.

Stomatal conductance (mol m⁻² s⁻¹)							
	26 DAI	44 DAI	56 DAI	68 DAI	92 DAI	104 DAI	118 DAI
T1	0.6210 a	0.5328 a	0.4688 a	0.4780 a	0.2336 a	0.3839 a	0.2458 a
T2	0.7242 a	0.6276 a	0.5735 a	0.5322 a	0.2217 a	0.4091 a	0.2014 a
T3	0.6382 a	0.5380 a	0.5493 a	0.5646 a	0.3380 a	0.5156 a	0.4724 a
T4	0.6272 a	0.5171 a	0.4526 a	0.3766 a	0.2572 a	0.4588 a	0.2821 a
T5	0.6451 a	0.5704 a	0.5709 a	0.5058 a	0.2967 a	0.3580 a	0.2019 a
T6	0.8205 a	0.6045 a	0.6090 a	0.6041 a	0.3739 a	0.4195 a	0.2536 a
T7	0.4533 b	0.3156 b	0.3603 a	0.4780 a	0.2337 a	0.3202 a	0.3001 a
T8	0.5377 b	0.4283 b	0.4526 a	0.4780 a	0.3272 a	0.4588 a	0.3794 a
CV%	4.61	4.81	4.79	6.20	5.00	6.00	6.68

T1: `Pedro Sato` uninoculated and untreated; T2: Uninoculated and untreated `Paluma`; T3: `Pedro Sato` not inoculated and treated; T4: `Paluma` not inoculated and treated; T5: `Paluma` inoculated and untreated; T6: `Pedro Sato` inoculated and not treated; T7: `Pedro Sato` inoculated and treated and T8: `Paluma` inoculated and treated; DAI: days after inoculation. Equal capital letters on the line do not show statistical difference. Equal lowercase letters in the column do not show statistical difference by the Scott-Knott test at 5% probability. (54, 85, 97, 110, 132 and 146 DAT).

The treatments that received the isolated and combined nematode and bacteria showed a reduction in water use efficiency values at 26 and 44 DAI (Table 4).

Table 4 - Efficiency in the use of water in guava trees inoculated with *Meloidogyne enterolobii* and treated with *Bacillus methylotrophicus*, separately and associated

Efficiency in the use of water ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)							
	26 DAI	44 DAI	56 DAI	68 DAI	92 DAI	104 DAI	118 DAI
T1	1850 a	1737 a	1604 a	1712 a	2139 a	1316 a	2272 a
T2	1676 a	1423 a	1213 a	1587 a	1930 a	1186 a	1571 a
T3	1072 b	1019 b	1359 a	1392 a	1841 a	1192 a	1407 a
T4	1177 b	1224 b	1561 a	1843 a	1967 a	1134 a	1644 a
T5	1117 b	1114 b	1344 a	1476 a	1687 a	1309 a	1644 a
T6	1152 b	1256 b	1315 a	1475 a	1880 a	1199 a	1854 a
T7	1385 b	1365 b	1691 a	1503 a	2108 a	1627 a	1639 a
T8	1332 b	1238 b	1612 a	1501 a	1963 a	1166 a	1830 a
CV%	12.94	12.43	10.39	8.86	8.50	11.02	17.58

T1: ` Pedro Sato´ non-inoculated and untreated; T2: Uninoculated and untreated `Paluma´; T3: `Pedro Sato´ not inoculated and treated; T4: `Paluma´ not inoculated and treated; T5: 'Paluma' inoculated and untreated; T6: `Pedro Sato´ inoculated and not treated; T7: `Pedro Sato´ inoculated and treated and T8: `Paluma´ inoculated and treated; DAI: days after inoculation. Equal capital letters on the line do not show statistical difference. Equal lowercase letters in the column do not show statistical difference by the Scott-Knott test at 5% probability. (54, 85, 97, 110, 132 and 146 DAT).

3.2 Nematological variables

There was no difference between treatments in root mass. Gall index, egg mass index and reproduction factor were higher in treatments that received nematodes regardless of the bacteria application (Table 5).

Table 5 – Nematological variables in guava cv. Paluma and cv. Pedro Sato in soil treated or not treated with *Bacillus methylotrophicus* at 132 days after inoculation with 5000 eggs and eventual juveniles of *Meloidogyne enterolobii*.

	IG	IMO	FR
T1	0 b	1 b	0 b
T2	0 b	0 b	0 b
T3	1 b	1 b	0 b
T4	1 b	2 b	0 b

T5	3 a	5 a	3 a
T6	4 a	5 a	2 a
T7	4 a	5 a	2 a
T8	5 a	5 a	3 a

T1: `Pedro Sato` uninoculated and untreated; T2: Uninoculated and untreated `Paluma`; T3: `Pedro Sato` not inoculated and treated; T4: `Paluma` not inoculated and treated; T5: `Paluma` inoculated and untreated; T6: `Pedro Sato` inoculated and not treated; T7: `Pedro Sato` inoculated and treated and T8: `Paluma` inoculated and treated; GI: gall index; IMO: egg mass index; FR: reproduction factor. Equal lowercase letters in the column do not show statistical difference by the Scott-Knott test at 5% probability.

4. DISCUSSION

Meloidogyne enterolobii and *B. met* isolates did not influence the stomatal conductance and transpiration of guava trees. Similar results were found by Melakeberhan et al. (1990) in the interaction: *M. incognita* and two grape cultivars, however *M. incognita* reduced stomatal conductance and transpiration of tomato (Khanna et al., 2019). *Meloidogyne exigua* and *M. paranaensis* reduced conductance and transpiration of coffee seedlings. *Meloidogyne enterolobii* did not influence the photosynthesis of guava trees, the same behavior was observed in coffee seedlings with *M. exigua*, However, different results were found in coffee plants inoculated with *M. paranaensis* (Goulart et al., 2019).

Plants infected with nematodes have a deficient root system, negatively influencing the absorption of water and nutrients essential to the plant physiological processes (Goulart et al., 2019). In the present study, *M. enterolobii* isolated did not influence water absorption by the roots and water and nutrient transport by the conducting vessels, due to the absence of changes in stomatal conductance, photosynthesis and transpiration, possibly as a result of the low population density of the nematode. About 6000 eggs of *M. incognita* were not enough to change the physiology of the cotton plant and did not reduce the chlorophyll content (Lu et al., 2014). *Meloidogyne ethiopica* caused significant damage to tomato roots 102 days after inoculation, consequently this damage reflected in physiological changes in the plant (Strajnar et al., 2012).

Studies indicate that rhizobacteria improve the photosynthetic rate indirectly, as they stimulate the production of the plant hormone cytokinin, which is associated with different mechanisms of the complex photosynthetic chain

(Ahluwalia et al., 2021). The absence of alterations in stomatal conductance, photosynthesis and transpiration in the treatments that received only the bacteria may be a result of the form of application in the soil, and/or the concentration of the bacteria, or even the humidity of the soil, since it requires a minimum field capacity of 50% after inoculation with rhizobacteria to increase positive responses in plant physiology (Castro et al., 2019).

Treatments that received *M. enterolobii* and *B.met* combined reduced stomatal conductance, water use efficiency, photosynthesis and transpiration. *Piriformospora indica* and *M. incognita* combined reduced photosynthesis in cucumber plants (Atia et al., 2020a). *Meloidogyne incognita* e *Streptomyces* spp. combined reduced stomatal conductance and transpiration of tomato seedlings (Ma et al., 2017). The reduction in stomatal conductance caused by *M. enterolobii* in combination with *B.met* may have contributed to the reduction in photosynthesis, since with closed stomata there is limitation in the absorption of CO₂. The release of water by the stomata to the atmosphere was also reduced with the closure of the stomata, decreasing transpiration in the treatments with *B. met* and *M. enterolobii*, combined.

The energy for the rhizobacteria to supply their needs comes from the plant photoassimilates. We can say that the guava tree photoassimilates may not have been sufficient to release energy for the rhizobacteria, since the guava tree was under stress induced by the presence of the nematode. This may have reflected in the bacteria's inability to positively influence the plant's physiological response, since under stress conditions, the bacteria performed poorly (Rampazzo et al., 2018).

Meloidogyne enterolobii and *B.met* isolated and associated, reduced the efficiency of water use, proving to be the most sensitive physiological variable to the attack of *M. enterolobii*. The reduction in water use efficiency induced by the nematode cannot be explained by changes in stomatal conductance, photosynthesis and transpiration rate, since there were no variations in these parameters when treatments received only the nematode, and thus the change in water efficiency and water utilization may be explained by non-stomatal factors such as Rubisco activity, maximum Rubisco carboxylation rate, Ribulose regeneration capacity mediated by maximum electron transport rate, and the rate of triose phosphate utilization (Lu et al., 2014; Jiao et al., 2017).

Similar results were found by Atia et al. (2020) in which *M. incognita* alone and in combination with *Piriformospora indica* reduced water use efficiency in cucumber. The amount of water available to the plants, vapor pressure, leaf and ambient temperature, nitrogen available to the plants are factors that above or below the required limits may have contributed to the reduction in the use of water and were potentiated by the nematode and the bacteria alone and in combination (Hatfield & Dold, 2019; Atia et al., 2020).

No physiological variable evaluated has changed after 56 DAI (84 DAT). The guava tree is a rustic plant that adapts to different environmental conditions (Silva et al., 2010), and the plant in an advanced stage of development may not suffer so much from nematode infection due to the greater energy supply to tolerate the attack without reflecting negatively on their physiological performance (Melakeberhan et al., 1990). Furthermore, in subsequent stages of development the fruit tree may be able to develop tolerance mechanisms that preclude changes in stomatal conductance, photosynthesis and transpiration.

It can be stated that under the conditions of the experiment, *B. met* did not trigger antagonistic mechanisms on *M. enterolobii*, since statistical differences observed in nematological variables were only between inoculated and non-inoculated treatments. There was no difference between root masses. The gall index, egg mass index and reproduction factor were higher in treatments that received nematodes, regardless of the application of the bacteria. In some guava roots that did not receive nematodes, small galls were noticed, but eggs were not recovered.

The bacteria did not contribute to reducing the number of galls and egg masses. *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia gladioli* separately and associated with *M. incognita* also did not influence tomato root mass, but reduced the number of galls (Khanna et al., 2019). Of 27 isolates of plant growth-promoting bacteria, five led to an increase in the number of plant galls induced by *M. incognita* (Viljoen & Labuschagne, 2019). *Bacillus subtilis* e *B. pumilus* reduced *M. incognita* in cowpea (Abd-El-Khair et al., 2019). Zhou et al. (2016) observed for the first time, the nematicidal capacity of *B. met* against *M. incognita*, however, the strain used in the present assay did not show nematicidal activity in the control of *M. enterolobii*. *Pseudomonas fluorescens* in simultaneous inoculations with *M. incognita* did not reduce efficiently the number of egg mass

in tomato root, however, the reduction was greater when the inoculation scheme was *P. fluorescens* and after 15 days inoculated *M. incognita* (Noureldeen *et al.*, 2021). The reproduction factor was higher in tomato plants inoculated with *M. javanica* followed by inoculation with *Paecilomyces lilacinus* with an interval of 10 days compared to the simultaneous inoculations of the organisms and the inoculation of *P. lilacinus* 10 days before inoculation with *M. javanica* (Ganaie & Khan, 2010).

The mode and scheme of the applications of the bacteria in time, the concentration and genotypes of the nematode and bacteria may have contributed to the inefficiency of the bacteria in controlling *M. enterolobii*.

5. CONCLUSIONS

Meloidogyne enterolobii and *Bacillus methylotrophicus* combined reduced stomatal conductance, photosynthesis and transpiration of guava trees during the initial phase of the plant development. *Meloidogyne enterolobii* and *B. met* isolated and combined reduced water use efficiency from 26 to 44 DAI. After 44 DAI, there was no change in the evaluated physiological parameters. There was no difference in root mass. The nematological parameters were not influenced by the bacteria.

6. REFERENCES

- Abd-El-Khair H, El-Nagdi WMA, Youssef MMA, Abd-Elgawad MMM, Dawood MG, 2019. Protective effect of *Bacillus subtilis*, *B. pumilus*, and *Pseudomonas fluorescens* isolates against root knot nematode *Meloidogyne incognita* on cowpea. *Bulletin of the National Research Centre* **43**, 1–7.
- Ahluwalia O, Singh PC, Bhatia R, 2021. Resources , Environment and Sustainability A review on drought stress in plants : Implications , mitigation and the role of plant growth promoting rhizobacteria. *Resources, Environment and Sustainability* **5**.
- Asmus GL, Ferraz LCCB, 2001. Relações entre a densidade populacional de *Meloidogyne javanica* e a área foliar, a fotossíntese e os danos causados a

- variedades de soja. *Nematologia Brasileira* **25**, 01–13.
- Atia MAM indica promotes cucumber tolerance against R nematode by modulating photosynthesis and innate responsive genes, Abdeldaym EA, Abdelsattar M *et al.*, 2020a. *Piriformospora indica* promotes cucumber tolerance against Root-knot nematode by modulating photosynthesis and innate responsive genes. *Saudi Journal of Biological Sciences* **27**, 279–287.
- Atia MAM, Abdeldaym EA, Abdelsattar M *et al.*, 2020b. *Piriformospora indica* promotes cucumber tolerance against Root-knot nematode by modulating photosynthesis and innate responsive genes. *Saudi Journal of Biological Sciences* **27**, 279–287.
- Bezerra JEF, Lederman IE, Silva-Júnior JF da *et al.*, 2013. Capítulo 5 - alimentícias. In: *Plantas para o futuro-Região Centro-Oeste*. 294–314.
- Bird AF, 1974. Plant response to root-knot nematode. *Annu Rev Phytopathol*, 69–85.
- Bonetti JI, Ferraz S, 1981. Modificações do método de Hussey& Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* em raízes de cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira* **6**.
- Bulegon LG, Guimarães VF, Egewarth VA *et al.*, 2016. Crescimento e Trocas Gasosas no Período Vegetativo da Soja Inoculada com Bactérias Diazotróficas. *Nativa* **4**, 277–286.
- Castaneda Alvarez C, Aballay E, 2016. Rhizobacteria with nematicide aptitude : enzymes and compounds associated. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **32**, 1–7.
- Castro GLS, Silva Júnior DD, Viana RG, Rêgo MCF, Silva GB, 2019. Photosynthetic apparatus protection and drought effect mitigation in açai palm seedlings by rhizobacteria. *Acta Physiologiae Plantarum* **41**, 1–12.
- Chavarria-Quicaño E, De la Torre-González F, González-Riojas M, Rodríguez-González J, Asaff-Torres A, 2023. Nematicidal lipopeptides from *Bacillus paralicheniformis* and *Bacillus subtilis*: A comparative study. *Applied*

- Chaves MM, Flexas J, Pinheiro C, 2009. Photosynthesis under drought and salt stress: Regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany* **103**, 551–560.
- Chen SY, Dickson DW, 2000. A technique for determining live second-stage juveniles of *Heterodera glycines*. *Journal of Nematology* **32**, 117–121.
- Chen W, Wang J, Huang D *et al.*, 2022. Volatile Organic Compounds from *Bacillus aryabhattai* MCCC 1K02966 with Multiple Modes against *Meloidogyne incognita*. *moleculres* **27**, 1–11.
- Cheng W, Yang J, Nie Q *et al.*, 2017. Volatile organic compounds from *Paenibacillus polymyxa* KM2501-1 control *Meloidogyne incognita* by multiple strategies. *Scientific Reports* **7**, 1–11.
- Chinheya CC, Yobo KS, Laing MD, 2017. Biological control of the rootknot nematode, *Meloidogyne javanica* (Chitwood) using *Bacillus* isolates, on soybean. *Biological Control* **109**, 37–41.
- Dalastra GM, Echer MDM, Guimarães VF, Hachmann TL, Inagaki AM, 2014. Trocas gasosas e produtividade de três cultivares de meloeiro conduzidas com um e dois frutos por planta. *Bragantia* **73**, 365–371.
- Engelbrecht G, Claassens S, Mienie CMS, Fourie H, 2022. Filtrates of mixed *Bacillus* spp inhibit second-stage juvenile motility of root-knot nematodes. *Rhizosphere* **22**, 100528.
- Engelbrecht G, Horak I, Jansen van Rensburg PJ, Claassens S, 2018. *Bacillus*-based bionematicides: development, modes of action and commercialisation. *Biocontrol Science and Technology* **28**, 629–653.
- EPPO, 2023. *Meloidogyne enterolobii*. *EPPO Bulletin* **44**, 159–163.
- Ferraz RL de S, Melo AS de, Suassuna JF, Brito MEB de, Fernandes PD, Nunes Júnior E da S, 2012. Trocas gasosas e eficiência fotossintética em ecótipos de feijoeiro cultivados no semiárido. *Pesquisa Agropecuária Tropical* **42**, 181–188.

- Figueiredo FRA, Nóbrega JS, Ribeiro JE da S *et al.*, 2020. Physiological changes in *Solanum lycopersicum* L. In the presence of root-knot nematodes and salicylic acid. *Bioscience Journal* **36**, 2032–2040.
- Ganaie MA, Khan TA, 2010. Biological Potential of *Paecilomyces lilacinus* on Pathogenesis of *Meloidogyne javanica* Infecting Tomato Plant. *European Journal of Applied Sciences* **2**, 80–84.
- Ganeshan K, Poornima K, Renukadevi P, Nakkeeran S, 2019. Characterisation of Antinematic and Antimicrobial Compounds of *Bacillus amyloliquefacien* (VB7), against Nematode-Disease Complex Causing Guava Decline in Tamil Nadu. *International Journal of Agriculture Sciences* **11**.
- Geng C, Nie X, Tang Z *et al.*, 2016. A novel serine protease, Sep1, from *Bacillus firmus* DS-1 has nematicidal activity and degrades multiple intestinal-associated nematode proteins. *Scientific Reports* **6**, 1–12.
- Gomes M de M de A, Lagôa AMMA, Medina CL, Machado EC, Machado MA, 2004. Interactions between leaf water potential, stomatal conductance and abscisic acid content of orange trees submitted to drought stress. *Brazilian Journal of Plant Physiology* **16**, 155–161.
- Gonçalves AB da S, Azevedo CDV, Oliveira MT de, Romualdo MA de F, Fernandes MRR, 2019. Perfil da Fruticultura 2019.
- Gonzaga Neto L, 2007. Produção de goiaba. , 64.
- Goulart RR, Terra WC, De Salgado SML *et al.*, 2019. *Meloidogyne paranaensis* and *M. exigua* alter coffee physiology. *Nematology* **21**, 459–467.
- Gözel Ç, Gökbayrak Z, 2022. Influence of 24-Epibrassinolide on Physiological Characteristics of Tomato Seedlings Infested with Root-knot Nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White , 1919) Chitwood , 1949 (Tylenchida : Meloidogynidae). *Journal of Agricultural Sciences* **28**, 650–655.
- Hatfield JL, Dold C, 2019. Water-Use Efficiency : Advances and Challenges in a Changing Climate. *Frontiers in Plant Science* **10**, 1–14.
- Huang Y, Xu CK, Ma L, Zhang KQ, Duan CQ, Mo MH, 2010. Characterisation of

- volatiles produced from *Bacillus megaterium* YFM3.25 and their nematicidal activity against *Meloidogyne incognita*. *European Journal of Plant Pathology* **126**, 417–422.
- Hussey RS, Baker KRA, 1973. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. *Plant Dis. Rep.* **57**, 1025–1028.
- Hussey RS, Williamson VM, 1998. Physiological and Molecular Aspects of Nematode Parasitism. In: *Plant and Nematode interaction*. 87–108.
- IBGE, 2020. Área plantada ou destinada à colheita, área colhida, quantidade produzida, rendimento médio e valor da produção das lavouras temporárias e permanentes. *Instituto Brasileiro de geografia e estatística*.
- Jamal Q, Cho J-Y, Moon J-H, Munir S, Anees M, Kim KY, 2017. Identification for the First Time of Cyclo(D-Pro-L-Leu) Produced by *Bacillus amyloliquefaciens* Y1 as a Nematocide for Control of *Meloidogyne incognita*. *Molecules* **22**.
- Jang JY, Choi YH, Shin TS *et al.*, 2016. Biological control of *Meloidogyne incognita* by *Aspergillus niger* F22 producing oxalic acid. *PLoS ONE* **11**, 1–15.
- Ji X, Li J, Meng Z, Zhang S, Dong B, Qiao K, 2019. Synergistic effect of combined application of a new fungicide fluopimomide with a biocontrol agent *Bacillus methylotrophicus* TA-1 for management of gray mold in tomato. *Plant Disease* **103**, 1991–1997.
- Jiao L, Wang L, Zhou Q, Huang X, 2017. Ecotoxicology and Environmental Safety Stomatal and non-stomatal factors regulated the photosynthesis of soybean seedlings in the present of exogenous bisphenol A. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **145**, 150–160.
- Khanna K, Sharma A, Ohri P *et al.*, 2019. Impact of plant growth promoting rhizobacteria in the orchestration of *Lycopersicon esculentum* mill. Resistance to plant parasitic nematodes: A metabolomic approach to evaluate defense responses under field conditions. *Biomolecules* **9**.

- Lee YS, Kim KY, 2016. Antagonistic Potential of *Bacillus pumilus* L1 Against Root-Knot Nematode, *Meloidogyne arenaria*. *Journal of Phytopathology* **164**, 29–39.
- Liang Y, Ariyawansa HA, Becker JO, Yang J, 2020. The Evaluation of Egg-Parasitic Fungi *Paraboeremia taiwanensis* and *Samsoniella* sp . for the Biological Control of *Meloidogyne enterolobii* on Chinese Cabbage. *Microorganisms* **8**.
- Liu H, Guanghan F, Yujie L, Shouan Z, Xiaoxue J, Qiao K, 2023. Biocontrol Efficacy of *Bacillus methylotrophicus* TA-1 Against *Meloidogyne incognita* in Tomato. *Plant Disease*.
- Lu P, Davis RF, Kemerait RC, Van Ierse MW, Scherm H, 2014. Physiological effects of *Meloidogyne incognita* infection on cotton genotypes with differing levels of resistance in the greenhouse. *Journal of Nematology* **46**, 352–359.
- Ma Y, Li Y, Lai H, Guo Q, Xue Q, 2017. Effects of two strains of Streptomyces on root-zone microbes and nematodes for biocontrol of root-knot nematode disease in tomato. *Applied Soil Ecology* **112**, 34–41.
- Machado V, Berlitz DL, Santos Matsumura AT *et al.*, 2012. Bactérias Como Agentes de Controle Biológico de Fitonematóides. *Oecologia Australis* **16**, 165–182.
- Melakeberhan H, Ferris H, Dias JM, 1990. Physiological Response of Resistant and Susceptible *Vitis vinifera* Cultivars to *Meloidogyne incognita*. *Journal of nematology* **22**, 224–30.
- Mendoza AR, Kiewnick S, Sikora RA, 2008. *In vitro* activity of *Bacillus firmus* against the burrowing nematode *Radopholus similis*, the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* and the stem nematode *Ditylenchus dipsaci*. *Biocontrol Science and Technology* **18**, 377–389.
- Mioranza TM, Inagaki AM, Müller MA *et al.*, 2018. Gas exchange and photosynthetic light response curves in nematode-infected tomato plants treated with *Thuya occidentalis*. *Australian Journal of Crop Science* **12**, 583–591.

- Moghaddam MR, Moghaddam EM, Ravari SB, Rouhani H, 2013. The nematicidal potential of local *Bacillus* species against the root-knot nematode infecting greenhouse tomatoes. *Biocontrol Science and Technology*.
- Niu Q, Huang X, Zhang L *et al.*, 2010. A Trojan horse mechanism of bacterial pathogenesis against nematodes. *PNAS* **107**, 16631–16636.
- Noureldeen A, Asif M, Ansari T *et al.*, 2021. Effect of Individual , Simultaneous and Sequential Inoculation of *Pseudomonas fluorescens* and *Meloidogyne incognita* on Growth, Biochemical, Enzymatic and Nonenzymatic Antioxidants of Tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Plants* **10**, 1–15.
- Oliveira IP De, Oliveira LC, Moura CSFT, Lima Júnior AF de, Rosa SRA da, 2012. Cultivo da goiabeira: do plantio ao manejo. *Revista Faculdade Montes Belos* **5**, 137–156.
- Oostenbrink M, 1966. *Major characteristics of the relation between nematodes and plants*. 38, Laboratorium voor Nematologie, : Veenman.
- Pasqualotto AT, Salgado SM de L, Terra WC *et al.*, 2020. Root morphology, gas exchange and chlorophyll fluorescence of coffee cultivars and progenies are altered by *Meloidogyne paranaensis* infestation and water deficit. *Journal of Phytopathology* **168**, 220–227.
- Pereira FM, Muhammad U, Mayer NA, Nachtigal CJ, Maphanga ORM, Willemse S, 2016. Advances in guava propagation. *Rev. Bras. Frutic.* **39**, 1–24.
- Pereira TS, Paula AM, Ferrari LH *et al.*, 2021. Trichoderma-enriched vermicompost extracts reduces nematode biotic stress in tomato and bell pepper crops. *Agronomy* **11**, 1–13.
- Pereira FOM, Souza RM, Souza PM, Dolinski C, Santos GK, 2009. Estimativa do impacto econômico e social direto de *Meloidogyne mayaguensis* na cultura da goiaba no Brasil. *Nematologia Brasileira* **33**, 176–181.
- Pommer CV, Murakami KRN, 2006. Goiaba no mundo. *O Agrônomo* **58**, 22–26.
- Ramamoorthy V, Viswanathan R, Raguchander T, Prakasam V, Samiyappan R,

2001. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. *Crop Protection* **20**, 1–11.
- Rampazzo PE, Marcos FCC, Cipriano MAP *et al.*, 2018. Rhizobacteria improve sugarcane growth and photosynthesis under well-watered conditions. *Annals of Applied Biology*.
- Risterucci AM, Duval MF, Rohde W, Billotte N, 2005. Isolation and characterization of microsatellite loci from *Psidium guajava* L. *Molecular Ecology Notes* **5**, 745–748.
- Schock AA, Ramm A, Martinazzo EG, Silva DM, Bacarin MA, 2014. Crescimento e fotossíntese de plantas de pinhão-manso cultivadas em diferentes condições de luminosidade. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* **18**, 3–9.
- Scott AAJ, Knott M, 1974. A Cluster Analysis Method for Grouping Means in the Analysis of Variance Published by: International Biometric Society Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/2529204>. *Biometrics* **30**, 507–512.
- Seenivasan N, David PMM, Vivekanandan P, Samiyappan R, 2012. Biocontrol Science and Technology Biological control of rice root-knot nematode , *Meloidogyne graminicola* through mixture of *Pseudomonas fluorescens* strains. *Biocontrol Science and Technology* **22**, 611–632.
- Sharma IP, Sharma AK, 2016. Physiological and biochemical changes in tomato cultivar PT-3 with dual inoculation of mycorrhiza and PGPR against root-knot nematode. *Symbiosis*.
- Silva LS, Mendes AMS, Oliveira AR *et al.*, 2010. *A cultura da goiaba*.
- Strajnar P, Širca S, Urek G, Šircelj H, Železnik P, Vodnik D, 2012. Effect of *Meloidogyne ethiopica* parasitism on water management and physiological stress in tomato. *European Journal of Plant Pathology* **132**, 49–57.
- Taiz, L.; Zeiger E, 2016. *Fisiologia e desenvolvimento vegetal*.
- Taiz L, Zeiger E, 2007. *Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal .pdf*.

- Taylor A I, Sasser JN, 1978. *Biology, Identification and Control of Root-knot Nematodes (Meloidogyne species)*.
- Tran TPH, Wang SL, Nguyen VB, Tran DM, Nguyen DS, Nguyen AD, 2019. Study of Novel Endophytic Bacteria for Biocontrol of Black Pepper Root-knot Nematodes in the Central Highlands of Vietnam. *Agronomy* **9**.
- Vieira de Carvalho Júnior O, de Sá AV, Peixoto AR, da Paz CD, da Cunha e Castro JM, Gava CAT, 2022. Local Bacillus species as potential biocontrol agents for *Meloidogyne enterolobii* in melon (*Cucumis melo* L.). *Biocontrol Science and Technology* **32**, 314–328.
- Viljoen JJF, Labuschagne N, 2019. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* on tomatoes and carrots by plant growth-promoting rhizobacteria. *Trop. plant pathol.* **44**, 284–291.
- Vitti KA, de Lima LM, Filho-Martines JG, 2020. Agricultural and economic characterization of guava production in Brazil. *Revista Brasileira de Fruticultura* **42**, 1–11.
- Zhao D, Zhao H, Zhao D *et al.*, 2018. Isolation and identification of bacteria from rhizosphere soil and their effect on plant growth promotion and root-knot nematode disease. *Biological Control* **119**, 12–19.
- Zhou L, Yuen G, Wang Y, Wei L, Ji G, 2016. Evaluation of bacterial biological control agents for control of root- knot nematode disease on tomato. *Crop Protection* **84**, 8–13.