



**Unive**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOPATOLOGIA**

**Seleção de estirpes de *Bacillus* spp. e produtos comerciais para o biocontrole de *Meloidogyne incognita* em algodoeiro**

**CAIO AUGUSTO ROSADO TORRES**

**BRASÍLIA – DF**

**2019**

**CAIO AUGUSTO ROSADO TORRES**

**SELEÇÃO DE ESTIRPES DE *Bacillus* spp. E PRODUTOS COMERCIAIS PARA  
BIOCONTROLE DE *Meloidogyne incognita* EM ALGODOEIRO**

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

**Orientador:** Prof. Dr. Juvenil Enrique Cares

**Coorientadora:** Dra. Regina M. D. G. Carneiro

**BRASÍLIA – DF**

**2019**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

T T693s Torres, Caio Augusto Rosado  
Seleção de estirpes de Bacillus spp. e produtos comerciais para o biocontrole de Meloidogyne incognita em algodoeiro em duas épocas de avaliação / Caio Augusto Rosado Torres; orientador Juvenil Enrique Cares; co-orientador Regina M. D. G. Carneiro. -- Brasília, 2019.  
59 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Fitopatologia) --  
Universidade de Brasília, 2019.

1. Controle biológico. 2. Algodão. 3. Nematóide das galhas. 4. Bacillus. 5. Rizocompetência. I. Cares, Juvenil Enrique, orient. II. Carneiro, Regina M. D. G., co-orient. III. Título.

*Dedico a minha família, amigos e a Ludmila.  
Por não me abandonarem no vale da sombra da morte.*

*In memoriam*  
*Girl Von Klein Flandenbrot*

Trabalho realizado junto ao Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação do **Professor Juvenil Enrique Cares**, e coorientação da **Dra. Regina M. D. G. Carneiro** com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia).

**Seleção de estirpes de *Bacillus* spp. e produtos comerciais para o biocontrole de *Meloidogyne incognita***

CAIO AUGUSTO ROSADO TORRES

DISSERTAÇÃO APROVADA em 10/07/2019 por:

Dr. Rogério Biaggioni Lopes, DSc  
Examinador (membro externo)

Dr. Reinaldo Rodrigues Pimentel, DSc  
Examinador (membro externo)

Prof. Juvenil Enrique Cares, Ph.D  
Orientador (Presidente)

BRASÍLIA – DF  
2019

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	iii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	vi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. ALGODÃO.....	4
2.2. DOENÇAS.....	5
2.3. O GÊNERO <i>MELOIDOGYNE</i> .....	8
2.3.1. CLASSIFICAÇÃO DO GÊNERO <i>MELOIDOGYNE</i> .....	8
2.3.2. BIOLOGIA E PATOGENICIDADE DE <i>MELOIDOGYNE</i> SPP. ....	9
2.4. CONTROLE.....	11
3. MATERIAL.....	E
MÉTODOS.....	18
3.1. CULTIVO DE <i>BACILLUS</i> SPP. ....	18
3.2. AVALIAÇÃO DE QUALIDADE DE PRODUTOS COMERCIAIS.....	19
3.3. OBTENÇÃO E MULTIPLICAÇÃO DE NEMATÓIDES DO GÊNERO <i>MELOIDOGYNE</i> .....	19
3.4. ENSAIOS EM CONDIÇÃO DE CASA DE VEGETAÇÃO.....	20
3.5. BIOENSAIOS DE RIZOCOMPETÊNCIA.....	23
4. RESULTADOS.....	24
4.1. ENSAIO DE AVALIAÇÃO DE ESTIRPES DE <i>BACILLUS</i> SPP. EM CONDIÇÕES DE CASA DE VEGETAÇÃO.....	24
4.2. ENSAIOS COM PRODUTOS COMERCIAIS BIOLÓGICOS EM CONDIÇÃO DE CASA DE VEGETAÇÃO.....	26
4.3. ENSAIO DE RIZOCOMPETÊNCIA.....	31
4.4. AVALIAÇÃO DE QUALIDADE DE PRODUTOS COMERCIAIS.....	33
5. DISCUSSÃO.....	34
6. CONCLUSÕES GERAIS.....	38
7. REFERÊNCIAS.....	39

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Produtos biológicos à base de bactérias registrados no Brasil para o controle de fitonematoídeos.....15
- Tabela 2** – Ensaio com *Bacillus* spp. para o controle de *Meloidogyne incognita* em plantas de algodão FM 966 in vivo em condições de casa de vegetação (1.º ensaio: avaliado aos 60 e 150 dias após inoculação, instalado em junho de 2017 ).....21
- Tabela 3** – Ensaio com *Bacillus* spp. para o controle de *Meloidogyne incognita* em plantas de algodão da TMG 47 b2rf in vivo em condições de casa de vegetação (2.º ensaio: avaliado aos 60 e 120 dias após inoculação, instalado em abril de 2018).....22
- Tabela 4** – Ensaio com *Bacillus* spp. para o controle de *Meloidogyne incognita* em plantas de algodão da cultivar TMG 47 b2rf in vivo em condições de casa de vegetação (3.º ensaio: avaliado aos 60 e 120 dias após a inoculação, instalado em novembro de 2018).....22
- Tabela 5** – Escala de notas Hartman & Sasser (1985).....23
- Tabela 6** – Ensaio in vivo em casa de vegetação, no período do inverno, para avaliar o efeito de *Bacillus* spp. em tratamento de semente de algodão da cultivar FM 966 sobre a formação de galha e massas de ovos de *Meloidogyne incognita*, em plântulas suscetíveis inoculadas aos 21 dias com 8.000 ovos do nematoíde e avaliadas aos 60 e 150 dias após inoculação. ....24
- Tabela 7** – Ensaio in vivo em casa de vegetação, no período de inverno, para avaliar o efeito do tratamento de sementes de algodão da cultivar FM 966 com *Bacillus* spp. sobre a reprodução de *Meloidogyne incognita* e o desenvolvimento de planta suscetível inoculada aos 21 dias com 8.000 ovos do nematoíde e avaliadas aos 60 e 150 dias após inoculação.....25
- Tabela 8** – Ensaio in vivo em casa de vegetação, na primavera, para avaliar o efeito de uma estirpe de *Bacillus* sp. e produtos comerciais à base de *Bacillus* spp. em tratamento de sementes de algodão da cultivar TMG 47 b2rf sobre a formação de galha e massas de ovos de *Meloidogyne incognita*, em plântulas suscetíveis inoculadas aos 21 dias com 5.000 J2 do



nematoide e avaliadas aos 60 e 120 dias após inoculação.....27

**Tabela 9** – Ensaio in vivo em casa de vegetação, na primavera, para avaliar o efeito do tratamento de sementes de algodão da cultivar TMG 47 b2rf com uma estirpe de *Bacillus* sp. e produtos comerciais à base de *Bacillus* spp. sobre a reprodução de *Meloidogyne incognita* e o desenvolvimento de planta suscetível inoculada aos 21 dias com 5.000 J2do nematoide e avaliadas aos 60 e 120 dias após inoculação.....28

**Tabela 10** – Ensaio in vivo em casa de vegetação, no verão, para avaliar o efeito de uma estirpe de *Bacillus* sp. e produtos comerciais à base de *Bacillus* spp. em tratamento de sementes de algodão da cultivar TMG 47 b2rf e aplicação no sulco sobre a formação de galha e massas de ovos de *Meloidogyne incognita*, em plântulas suscetíveis inoculadas aos 21 dias com 10.000 ovos do nematoide e avaliadas aos 60 e 120 dias após inoculação. ....29

**Tabela 11** – Ensaio in vivo em casa de vegetação, no verão, para avaliar o efeito de uma estirpe de *Bacillus* sp. e produtos comerciais à base de *Bacillus* spp. em tratamento de sementes de algodão da cultivar TMG 47 b2rf e aplicação no sulco sobre a reprodução de *Meloidogyne incognita* e o desenvolvimento de planta suscetível inoculada aos 21 dias com 10.000 ovos do nematoide e avaliadas aos 60 e 120 dias após inoculação.....30

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Ciclo de vida de <i>Meloidogyne</i> sp. ....	11
<b>Figura 2</b> – Efeito fitotóxico de fluensulfone (Nimitz®) em algodoeiro TMG 47 b2rf. Plantas com mais de 50 dias após o plantio.....	28
<b>Figura 3</b> – Colonização das raízes em algodoeiro TMG 47 b2rf com diferentes produtos biológicos à base de <i>Bacillus</i> spp., em diferentes períodos de tempo.....	29
<b>Figura 4</b> – Colonização das raízes de algodoeiro TMG 47 b2rf com diferentes produtos biológicos a base de <i>Bacillus</i> spp., em diferentes períodos de tempo.....	32
<b>Figura 5</b> – Halo bacteriano característico de rizocompetência aos 21 dias de observação.....	32

## RESUMO

TORRES, Caio Augusto Rosado. **Seleção de estirpes de *Bacillus* spp. e produtos comerciais para o biocontrole de *Meloidogyne incognita***. 2019. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília, DF. 59 p.

O nematoide das galhas (NG) *Meloidogyne incognita* é um patógeno de importância para o algodoeiro. Há estudos evidenciando o potencial de bactérias do gênero *Bacillus* no controle da meloidoginose, contudo as avaliações da eficácia desses organismos ocorreram, em geral, até 60 dias após inoculação do nematoide (DAI), não contemplando o ciclo total da cultura. Este trabalho objetivou avaliar isolados de *Bacillus* spp. da Coleção de Bactérias de Invertebrados (CBI) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e alguns produtos comerciais registrados no Brasil, no controle de *M. incognita* em algodoeiro em duas épocas distintas de avaliação. Inicialmente foram realizados ensaios de rizocompetência *in vitro*, em que sementes de algodoeiro foram superficialmente esterilizadas e tratadas com três produtos comerciais: Onix<sup>®</sup>, Rizos<sup>®</sup> e Quartzo<sup>®</sup> e uma estirpe de bactéria da CBI (S2538). Essas sementes foram incubadas individualmente em tubo de ensaio com meio Phytigel<sup>®</sup> e tiveram seu sistema radicular avaliado visualmente quanto à colonização bacteriana semanalmente. As plantas apresentaram colonização radicular aos 21 dias. Em seguida foi avaliada a atividade das bactérias no controle do nematoide, em plantas de algodão em casa de vegetação. Os experimentos foram conduzidos em blocos casualizados com oito repetições. O primeiro experimento foi constituído de seis tratamentos sendo: quatro isolados de bactérias da CBI, previamente selecionados *in vitro*, o nematicida biológico comercial Votivo<sup>®</sup> e a testemunha. As sementes foram tratadas anteriormente ao plantio. As plantas, com aproximadamente 21 dias, foram inoculadas com 8.000 ovos de *M. incognita*, de população oriunda de lavoura de algodão, avaliadas aos 60 e 150 DAI. O segundo experimento constou de seis tratamentos, um isolado da bactéria da CBI (S2538) e três produtos comerciais: Onix<sup>®</sup>, Rizos<sup>®</sup>, Quartzo<sup>®</sup> e

Nimitz®. As plantas foram inoculadas com 5.000 J2 de *M. incognita*. No terceiro experimento foram utilizados os mesmos 4 tratamentos do segundo ensaio, exceto Nimitz®, com a adição do produto Quartzo® em sulco. Foram inoculados 10.000 ovos de *M. incognita* em plântulas de 15 cm de altura. Tanto o segundo quanto o terceiro ensaios foram avaliados aos 60 e 120 DAI. Em todos os ensaios as plantas foram avaliadas quanto ao índice de galhas (IG), índice de massa de ovos (IMO), fator de reprodução (FR), massa fresca de raiz (MFR), massa seca de parte aérea (MSA) e número de ovos por grama de raiz (OR). No primeiro ensaio aos 60 DAI todos os tratamentos apresentaram IG = 4 e IMO = 4. Já aos 150 DAI tanto IG quanto IMO foram iguais a 5. Quanto às demais variáveis, sobretudo FR e OR, não houve diferença estatística entre os tratamentos. No segundo ensaio, aos 60 DAI todos os tratamentos obtiveram nota 4 quanto ao IG e IMO. Já aos 120 DAI todos os tratamentos obtiveram IG = 5 e apenas Quartzo® e S2538 obtiveram IMO = 4, enquanto os demais obtiveram IMO = 5. Para as demais variáveis, aos 60 DAI, MFR apresentou incremento para Onix®, Quartzo® e Rizos®. Já aos 120 DAI, tanto o FR quanto o OR apresentaram redução para S2538, Onix® e Quartzo®. No terceiro ensaio, todos os tratamentos obtiveram nota 5 quanto a IG e IMO, tanto aos 60 DAI e 120 DAI. Para demais variáveis, aos 60 DAI, apenas FR e OR apresentaram redução em S2538, Onix®, Quartzo® em sulco e Quartzo® em tratamento de semente. Já aos 120 DAI não houve redução de FR e OR tampouco o incremento das demais variáveis. A inconsistência de controle nos resultados indica que nenhum dos tratamentos testados pode ser considerado nematocida. Demonstra que IG e IMO não são as variáveis ideais para determinar o sucesso de uma estirpe de *Bacillus* sp. no controle de *Meloidogyne*. Houve diferença entre as datas de avaliação, indicando que do ponto de vista fitopatológico a época ideal de avaliação do algodoeiro quanto ao controle da doença é ao final do ciclo da cultura (de 120 a 150 dias).

**Palavras-chave:** Controle biológico, bactérias, *Gossypium hirsutum*, nematoide das galhas

---

Orientador - Prof. Dr. Juvenil Enrique Cares – Universidade de Brasília;

Coorientadora - Dra. Regina M. D. G. Carneiro – Embrapa – CENARGEN.

## ABSTRACT

TORRES, Caio Augusto Rosado. **Selection of *Bacillus* spp. strains and commercial products for the biocontrol of *Meloidogyne incognita* on cotton.** 2019. Dissertation (Master in Plant Pathology) – Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil. 59 p.

The root knot nematode (NG) *Meloidogyne incognita* is an important pathogen to cotton crop. There are studies evidencing the potential of some bacteria on the control of this pathogen, however the evaluations of these pathogen efficacy is usually performed up to 60 days after inoculation of the nematode (DAI), not comprising the total cycle of the culture. This study aimed to evaluate *Bacillus* strains from the Embrapa Genetic Resources and Biotechnology Collection of Invertebrate-pathogenic Bacteria (CBI) and commercial products registered in Brazil whose active ingredient is *Bacillus* spp., for the control of *M. incognita* on cotton in two distinct periods of evaluation. Firstly, *in vitro* rhizocompetence assays were performed. Cotton seeds were superficially sterilized and treated with three commercial products: Onix<sup>®</sup>, Rizos<sup>®</sup> and Quartzo<sup>®</sup> and one *Bacillus* strain from CBI (S2538). Seeds were individually incubated in a test tube with Phytigel<sup>®</sup> medium and had their radicular system visually assessed for bacterial colonization weekly. In general, the plants showed visible root colonization at 21 days. Next, the efficacy of the bacteria against the nematode on cotton plants was evaluated under greenhouse conditions. The experiments were conducted in a randomized block with eight replicates. The first experiment consisted of six treatments: four bacterial strains from CBI previously selected *in vitro*; the commercial biological nematicide product Votivo<sup>®</sup> and the control. The seeds were treated prior to planting. The plants were inoculated with 8,000 eggs of *M. incognita* collected from cotton roots. Plants were evaluated at 60 and 150 DAI. The second experiment consisted of six treatments, including the S2538

strain and four commercial biological and chemical products: Onix<sup>®</sup>; Rizos<sup>®</sup>; Quartzo<sup>®</sup> and Nimitz<sup>®</sup>. The plants were inoculated with 5,000 eggs of *M. incognita*. In the third experiment, the same five treatments of the second test were used with the addition of Quartzo<sup>®</sup> in furrow treatment. Cotton seedlings at 15 cm height were inoculated with 10,000 eggs of *M. incognita*. Both, the second and the third assays were evaluated at 60 and 120 DAI. In all trials the plants were evaluated for gall (GI) and egg mass index (EMI), reproduction factor (RF), fresh root mass (FRM), dry shoot mass (DSM), number of eggs per gram of root (ER). In the first trial at 60 DAI all treatments presented IG = 4 and IMO = 4, and at 150 DAI, both IG and IMO were equal to 5. For the other variables, there was no statistical difference among treatments, neither at 60 DAI nor at 150 DAI. In the second trial, at 60 DAI, all treatments obtained score 4 for GI and IMO. At 120 DAI, all treatments obtained IG = 5 and only Quartzo<sup>®</sup> and S2538 showed IMO = 4, while the others obtained IMO = 5. For the other variables, at 60 DAI, MFR increased for Onix<sup>®</sup>, Quartzo<sup>®</sup> and Rizos<sup>®</sup>. At 120 DAI, both RF and ER presented reduction for S2538, Onix<sup>®</sup> and Quartzo<sup>®</sup>. In the third trial, all treatments scored 5 for GI and IMO at both 60 DAI and 120 DAI. For other variables, at 60 DAI, only RF and ER presented reduction for S2538, Onix<sup>®</sup>, Quartzo<sup>®</sup> furrow and Quartzo<sup>®</sup> seed treatment. At 120 DAI there was no reduction of RF and ER. No increment was observed for the other variables. The inconsistency of nematode control in the results indicates that none of the treatments tested can be considered as a nematicide. It demonstrates that IG and IMO are not the ideal variables to determine the success of a strain of *Bacillus* sp. for the control of *Meloidogyne*. There was difference between dates of evaluation, indicating that from the phytopathological point of view, the ideal time for evaluation of disease control was at the end of the crop cycle.

**Keywords:** bacteria, biological control, *Gossypium hirsutum*, root-knot nematode

## 1. INTRODUÇÃO

O algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.), cultivado em mais de 60 países, ocupa no Brasil uma área acima de um milhão e quatrocentos mil hectares, produzindo mais de dois milhões de toneladas de pluma e mais de três milhões de toneladas de caroço, tornando o Brasil o segundo maior exportador de algodão do mundo, com destaque para os estados de Mato Grosso e da Bahia, que somados são responsáveis por mais de 80% da produção brasileira dessa fibra. Atualmente a receita bruta da cotonicultura brasileira está estimada em torno dos 14 bilhões de reais (OECD/FAO, 2016; CONAB, 2018).

Sendo o algodão um dos principais produtos de exportação do Brasil, a cotonicultura é uma atividade que exige um manejo cada vez mais tecnificado. A implementação de novas tecnologias é uma exigência da atividade para suprir a demanda mundial de fibra vegetal (FREIRE, 2015).

A alta tecnificação da cultura somada ao alto potencial de lucro faz com que muitos agricultores utilizem poucas variedades com alto desempenho agrônômico, de tal forma que muitas vezes os agricultores optem pela monocultura em áreas muito extensas. Dessa forma a monocultura, associada à pouca diversidade entre cultivares adotadas e condições edafoclimáticas, cria um ambiente propício ao aparecimento de pragas e doenças, que atualmente já somam mais de 250 agentes patogênicos ao algodoeiro (BRADBURY, 1986; GOTO, 1990; CIA & SALGADO, 2005; IAMAMOTO, 2005; AMORIM *et al.*, 2011b; SUASSUNA & COUTINHO, 2015). Vale notar que a grande maioria desses agentes não causam danos significativos à produção, contudo, dentre esses 250 agentes, o grupo dos nematoides fitopatogênicos do algodoeiro, sobretudo *Meloidogyne incognita* (Kofoid & Whaite, 1919) Chitwood, 1949 e *Rotylenchulus reniformis* Linford & Oliveira, 1940 é problemático (ASMUS *et al.*, 2015). Destaque deve ser dado a *M. incognita*, conhecido como a espécie mais importante do grupo dos nematoides das galhas, causador da meloidoginose no algodoeiro e responsável por perdas superiores a 40% em altas infestações (ASMUS *et al.*,

2015). Outro problema frequente é a associação entre *M. incognita* e *Fusarium oxysporum* Schlechtend.:*Fr. f. sp. vasinfectum* (Atk.) W.C. Snyder & H.N. Hans conhecido também como o complexo Fusnem, que causa ainda mais danos às plantas infectadas (JEFFERS & ROBERTS, 1993).

*Meloidogyne incognita* é um nematoide endoparasita sedentário, uma espécie cosmopolita de maior impacto na agricultura mundial pela sua alta capacidade de reprodução e ampla gama de hospedeiras (SASSER, 1979). Sendo a espécie mais importante na cultura do algodão (LORDELLO *et al.*, 1984; CARNEIRO *et al.*, 1990) é de ocorrência expressiva nos estados produtores dessa cultura (SUASSUNA *et al.*, 2006). Tem como sintoma principal, a formação de pequenas galhas nas raízes, que agem como dreno energético levando a sintomas secundários, como o amarelecimento foliar e raquitismo (ABAD *et al.*, 2003). O controle desse nematoide é tradicionalmente baseado em quatro métodos: prevenção da entrada do patógeno na área cultivada; rotação com plantas não hospedeiras; uso de variedades resistentes; e aplicação de nematicidas. A rotação de culturas é um dos métodos mais eficientes de controle da doença, contudo a ampla gama de hospedeiras do nematoide faz com que essa seja uma tarefa árdua, de tal maneira, que boa parte dessas plantas usadas na rotação não gera retorno financeiro imediato. Isso somado ao fato de boa parte das variedades de alto valor agrônomico não possuírem resistência genética ao patógeno, faz com que o principal método de controle seja o químico. Na década de 1990, os nematicidas usados na cultura do algodão eram não fumigantes sistêmicos dos grupos carbamatos e organofosforados. Esses grupos eram conhecidos pela sua alta periculosidade ao meio ambiente e saúde humana (RUANO *et al.*, 1997). Atualmente, vários desses inseticidas foram banidos do mercado dando lugar a produtos menos tóxicos, tais como Nemix<sup>®</sup>, Rugby<sup>®</sup> e Nemacur<sup>®</sup>. Nesse contexto, o uso de nematicidas, desassociado a outros métodos de controle, apresenta alto risco ambiental e à saúde humana (BRASIL, 2017), reduzindo ainda mais o leque de alternativas para o controle dessa doença. O controle biológico, se efetivo, pode



apresentar menor toxidez e, por sua vez, passível de se tornar uma ferramenta importante no manejo desse fitopatógeno. Atualmente, no Brasil já existem produtos biológicos para diversas pragas e doenças, inclusive para o controle de nematoides (MAPA, 2019). Além de serem permitidos na agricultura orgânica, ainda possuem forma de utilização muito próxima a dos agrotóxicos químicos, fazendo com que a adoção dessa ferramenta seja mais conveniente ao produtor por não serem necessárias mudanças drásticas no manejo cultural já em prática.

Dentre os vários agentes de controle biológico, as rizobactérias do gênero *Bacillus* Ehrenberg têm posição destaque. Essas bactérias atuam como agente de controle biológico basicamente através de dois mecanismos distintos, antagonismo e indução de resistência (SIDDIQUI & MAHMOOD, 1999; XIANG *et al.*, 2017). Vários estudos evidenciaram o potencial dessas bactérias para controle da meloidoginose e promoção de crescimento de plantas (ZUCKERMAN *et al.*, 1993; CHEN *et al.*, 2000; PADGHAM & SIKORA 2007; MENDOZA *et al.*, 2008; TEREFE *et al.*, 2009; HU *et al.*, 2017; XIANG *et al.*, 2017). Contudo, vários desses trabalhos se resumem a ensaios *in vitro* ou ensaios *in vitro* e *in vivo* de curta duração, sendo as plantas avaliadas em torno de 50 dias após a inoculação (DAI), desconsiderando dessa forma o tempo real que a cultura fica no campo e o número de possíveis ciclos do nematoide, o que leva a subestimar a população final do patógeno e a superestimar a real eficácia desses micro-organismos como agentes de controle propriamente dito.

Estudos mais aprofundados quanto à rizocompetência, eficácia no controle e promoção de crescimento devem ser realizados a fim de garantir a utilização dessas bactérias como agentes de controle biológico. Dessa forma o presente trabalho objetivou confirmar em casa de vegetação o efeito nematicida, de estirpes *Bacillus spp.* previamente selecionadas *in vitro* em algodoeiro em duas épocas, confirmar o efeito nematicida de produtos biológicos a base de *Bacillus* registrados para *Meloidogyne*, em dois momentos do ciclo do algodoeiro e estudar *in vitro* a rizocompetência de produtos à base de *Bacillus* na cultura do algodoeiro.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. ALGODÃO

Atualmente o algodoeiro é a principal fonte de fibra vegetal do mundo, sendo uma importante cultura para esse fim. Cultivado em mais de 60 países, no Brasil ocupa uma área maior que 1,4 milhões de hectares, produzindo mais de dois milhões de toneladas de pluma e mais de três milhões de toneladas de caroço. Isso faz do Brasil, o segundo maior exportador de algodão do mundo, atrás apenas dos Estados Unidos da América. Vale destacar que os estados de Mato Grosso e da Bahia são responsáveis por mais de 80% da produção brasileira de algodão. Atualmente, a receita bruta da cotonicultura brasileira está estimada na casa dos 14 bilhões de reais (OECD/FAO, 2016; CONAB, 2018). Essa planta tem suas primeiras referências datadas de mais de 2.800 anos atrás, e os primeiros achados de algodão utilizado pelo homem datam de mais de 3.000 anos antes de Cristo. O algodoeiro é uma planta dicotiledônea, de ciclo anual ou perene, de porte arbustivo ou arbóreo, pertencente à família *Malvaceae*, gênero *Gossypium*, que conta com mais de 50 espécies descritas (LAWS, 2013). Das espécies do gênero *Gossypium* destaca-se, por sua maior concentração de fibra e características agronômicas desejáveis, *G. hirsutum* (LEE, 1984). Essa espécie é conhecida como algodão herbáceo ou anual, caule com cor variando entre o verde e o marrom, pouco ramificada, de ramos frutíferos e vegetativos, folhas com duas estípulas sem bainha, dois tipos de glândulas e ao menos duas gemas na base das folhas; ainda possui flores completas, brácteas promovendo proteção extra, podendo ter nectários internamente ou externamente à base (BORÉM & FREIRE, 2014).

A fibra extraída das plumas é utilizada, principalmente, na confecção de tecidos, já as sementes são ricas em óleo utilizado principalmente na alimentação humana. A extração de óleo tem como subproduto a torta ou farelo de algodão que possui entre 40% e 45% de teor de

proteína bruta, fazendo com que esse subproduto seja amplamente utilizado na alimentação animal (LAWS, 2013).

Uma grande mudança na cotonicultura brasileira ocorreu a partir de 1996. A cultura migrou do Sul e Sudeste do Brasil, onde ocupava pequenas propriedades, para o Centro-Oeste e Oeste baiano, onde as propriedades são em torno de 25 vezes maiores, ultrapassando os 2.500 ha por propriedade. Essa mudança forçou a adoção de uma agricultura altamente tecnificada e empresarial (BORÉM & FREIRE, 2014); vale a pena ressaltar que uma das grandes causas que forçaram essa migração foram os problemas fitossanitários, destacando os nematoides fitoparasitas (LORDELLO, 1981; GALBIERI *et al.*, 2014).

Atualmente, a alta tecnificação empregada na cultura e o grande potencial de lucro faz com que os agricultores optem pela utilização de poucas variedades e muitas vezes optam pela monocultura, de forma que a baixa diversidade do agrossistema, associada a condições edafoclimáticas cria um ambiente propício ao surgimento de pragas e doenças de tal modo que hoje já são mais de 250 agentes patogênicos ao algodoeiro (BRADBURY, 1986; GOTO, 1990; CIA & SALGADO, 2005; IAMAMOTO, 2005; AMORIM *et al.*, 2011b; SUASSUNA & COUTINHO, 2015).

## **2.2. DOENÇAS**

Dos 250 agentes fitopatogênicos ocorrentes na cultura do algodão, a grande maioria é secundária. No Brasil, a presença de algumas viroses com destaque para o Mosaico Comum, cujo agente causal é o *Abutilon mosaic virus* – AbMV, descrita em 1934 e apenas em 1937 associada a um vírus (COSTA, 1937). Sua ocorrência se intensificou em meados de 1990, com a introdução de variedades suscetíveis (CIA & SALGADO, 2005). Os sintomas são, inicialmente, manchas pequenas e isoladas com coloração mosqueada, amarela que, posteriormente, coalescem podendo tornar-se avermelhadas. As plantas doentes têm o crescimento afetado e tornam-se parcialmente ou completamente estéreis

(MIRANDA & SUASSUNA, 2004). Essa virose é transmitida por inoculação mecânica e pela mosca branca (*Bemisia tabaci* Gennadius). Em sistemas de cultivo no cerrado, apresentam baixa incidência, devido ao manejo sistemático de plantas daninhas com herbicidas, já que o vetor ocorre apenas em malváceas nativas e não de algodoeiro para algodoeiro (PAIVA *et al.*, 2001).

Já entre as doenças fúngicas têm destaque a Ramulose, causada por *Colletotrichum gossypii* Southw var. *cephalosporioides* A. S. Costa, constatada pela primeira vez no município de Rancharia – SP, em 1936, e mais recentemente, está presente em todas as regiões produtoras de algodão do país e vem causando sérios problemas (CIA & SALGADO 2005). Como a doença resulta na morte do meristema apical, faz com que haja superbrotamento de gemas laterais, causando o envassouramento da planta, com ramos e entrenós curtos e contorcidos, além de reduzir o porte da planta (COSTA & FRAGA JÚNIOR, 1937). Dessa forma, as plantas infectadas abortam as estruturas florais antes do florescimento pela competição por seiva dos ramos vegetativos, causando assim grandes perdas (SUASSUNA & COUTINHO, 2015). Sementes e restos culturais são fonte de inóculo primário, sua dispersão após o estabelecimento se dá por respingos de chuva, e é capaz de sobreviver em restos culturais no solo por até nove meses, fazendo com que sempre haja incidência em cultivos sucessivos (MIRANDA & SUASSUNA, 2004).

Outra doença fúngica de grande importância é a Ramulária, causada por *Ramularia areola*, primeiramente descrita nos EUA (EHRlich & WOLF, 1932), se transformou de uma doença secundária no Brasil para a doença fúngica mais importante na cultura devido à intensificação do cultivo e a utilização de cultivares suscetíveis (SUASSUNA & COUTINHO, 2015). Os sintomas aparecem após a emissão das primeiras maçãs, sendo manchas verde-escuras de formato angular em ambas as faces foliares que evoluem para uma massa pulverulenta de cor branca, massa essa que se trata dos esporos do patógeno. Em alta severidade ocorre desfolha total, de forma que compromete a produção na fase de

formação de maçãs e induz a abertura de capulhos precocemente causando perda de qualidade de fibra (SUASSUNA & COUTINHO, 2015).

A doença fúngica de solo mais importante para a cultura do algodão é a Murcha-de-fusário, doença essa causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. Teve seu primeiro relato no Brasil na década de 1930 (KRUG, 1936) e foi responsável pela crise da cotonicultura paulista na década de 1950, evidenciando a necessidade de variedades resistentes à doença, tendo em vista que as variedades utilizadas até então eram suscetíveis (SUASSUNA & COUTINHO, 2015). Os sintomas começam nas folhas basais, com amarelecimento e crestamento que posteriormente levam à murcha das folhas e ramos, culminando com a morte da planta. As que sobrevivem não são produtivas. Tais sintomas se dão pela obstrução do lume vascular por estruturas do patógeno oriundas de sua colonização (DAVIS *et al.*, 2006). Como o fungo produz clamidósporos, o patógeno uma vez presente na área tende a permanecer viável por vários anos no solo.

Dentre as doenças bacterianas que afetam o algodoeiro tem destaque a Mancha-angular, causada por *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* (Smith) Constantin Cleenwerck Maes, Baeyen, Van Malderghem, De Vos, Cottyn. Essa doença se caracteriza por lesões angulares, delimitadas pelas nervuras foliares, com aspecto encharcado que posteriormente tornam-se pardas. Nos casos mais severos, há coalescência das lesões e rasgadura do limbo foliar. Com a evolução da doença, o patógeno alcança o floema e a doença torna-se sistêmica, com lesões escuras nas nervuras, pecíolos e caules (MIRANDA & SUASSUNA, 2004), capaz de sobreviver em restos culturais, a infecção se dá pela penetração de estômatos e ferimentos com o auxílio de respingos de chuva (HILLOCKS, 1992).

Já entre os nematoides patogênicos ao algodoeiro, o nematoide das galhas (*M. incognita*), o reniforme (*Rotylenchulus reniformis*) e o das lesões radiculares (*Pratylenchus brachyurus* (Godfrey, 1929) Filipjev & Schuurmans Stekhoven, 1941) são os encontrados

em maior frequência nos algodoeiros brasileiros (CURI & BONA, 1972; LORDELLO, 1981; MONTEIRO & FERRAZ, 1987; GOULART *et al.*, 1997). Tendo em vista que muitas vezes a cultura do algodão é utilizada em sucessão à soja, os níveis populacionais de *M. incognita* e *R. reniformis* têm crescido (ASMUS *et al.*, 2015). *Pratylenchus brachyurus* trata-se de um endoparasita migrador, o que significa que, migra dentro da raiz enquanto se alimenta, causando lesões radiculares, essas lesões escurecidas são o principal sintoma da doença, que refletem na redução de crescimento da planta e menor produção (ASMUS *et al.*, 2015). Já *R. reniformis* é uma espécie polífaga altamente disseminada no Brasil. Diferentemente de *M. incognita* não causa reboleiras típicas. Trata-se de um semi-endoparasita sedentário e tem como principal sintoma, plantas subdesenvolvidas com manchas foliares, lembrando as causadas por deficiência nutricional, já que as raízes ficam com aspecto de suja, mesmo após lavagem, pela adesão de partículas de solo junto às massas de ovos; em altas populações estima-se perdas de produtividade em torno de 25% (ASMUS *et al.*, 2015). O mais importante dos nematoides parasitas do algodoeiro é *M. incognita*, podendo ser responsável por perdas superiores a 40% de produtividade (GALBIERI *et al.*, 2009). Trata-se de um nematoide endoparasita sedentário cosmopolita com amplo espectro de plantas hospedeiras. O sintoma mais característico da doença é a presença de pequenas galhas radiculares, resultado da formação do sítio de alimentação desse nematoide. Os sintomas reflexos são plantas cloróticas e com desenvolvimento precário que ocorrem em reboleiras e folhas carijó (SILVA *et al.*, 1997). Comumente *M. incognita* interage com *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum*, intensificando o dano causado por esses patógenos individualmente, resultando no complexo denominado Fusnem (JEFFERS & ROBERTS, 1993).

### **2.3. O GÊNERO MELOIDOGYNE**

#### **2.3.1. CLASSIFICAÇÃO DO GÊNERO MELOIDOGYNE**

O gênero *Meloidogyne* foi descrito em, 1887 por Göldi ao descrever uma doença que afetava os cafezais do Rio de Janeiro. Esse gênero pertence ao filo Nematoda, onde estão classificados todos os nematoides da seguinte forma: classe Chromadorea, ordem Rhabditida, subordem Tylenchina, infraordem Tylenchomorpha, superfamília Tylenchoidea, família Meloidogynidae, gênero *Meloidogyne* (DE LEY & BLAXTER, 2002; KARSSSEN & MOENS, 2006).

### **2.3.2. BIOLOGIA E PATOGENICIDADE DE *MELOIDOGYNE* SPP.**

O gênero *Meloidogyne* engloba os nematoides fitoparasitas conhecidos como nematoides das galhas. Distribuído mundialmente com amplo espectro de hospedeiras e alta capacidade reprodutiva, o nematoide das galhas é um parasita obrigatório de raiz, economicamente, o grupo de fitonematoides mais importante do mundo (MOENS *et al.*, 2009). Plantas de valor alimentício tanto de clima frio quanto clima quente são suscetíveis a esses patógenos (TAYLOR & SASSER, 1983). Apenas na cultura do algodão estima-se que esse nematoide seja capaz de causar perdas superiores a 40% (ASMUS *et al.*, 2015). Atualmente, com mais de 100 espécies válidas, são predominantes em zonas tropicais e temperadas (HUNT & HANDBOOK, 2009).

As plantas parasitadas apresentam galhas radiculares após a penetração de juvenis de segundo estágio (J2). O parasitismo que resulta na formação de galha é grande fonte de dreno energético para a planta que apresenta então menor absorção de água e nutrientes, crescimento retardado, redução do tamanho de folhas e frutos e manchas foliares seguidas de necrose internerval (FREITAS *et al.*, 2009; MOENS *et al.*, 2009; AMORIM *et al.*, 2011a). Mesmo sendo o principal sintoma da doença, as galhas podem apresentar formas diferentes, de acordo com a espécie infectante e a hospedeira em questão (GOLDEN & BIRCHFIELD, 1965; MERCER *et al.*, 1997; MOENS *et al.*, 2009).

Os nematoides das galhas são endoparasitas sedentários cujo parasitismo é altamente especializado. Seu ciclo biológico inicia-se com a oviposição, nesse momento a fêmea produz em média 400 ovos que são envoltos por uma massa gelatinosa, também produzida pela fêmea. Essa massa gelatinosa mantém os ovos protegidos contra predação, condições ambientais desfavoráveis e apresenta atividade antimicrobiana (ORION & KRITZMAN, 1991). Em um primeiro momento, dentro do ovo, há a formação do juvenil de primeiro estágio (J1), posteriormente ainda dentro do ovo, esse juvenil realiza a primeira ecdise, chegando ao juvenil de segundo estágio (J2). Quando as condições ambientais são favoráveis, nesse estágio, os juvenis eclodem (CURTIS *et al.*, 2009) e guiados pelos exsudatos radiculares, penetram na raiz da hospedeira. O J2 penetra na raiz na zona meristemática na base da coifa, a partir desse ponto o nematoide começa a migrar intercelularmente, com auxílio de enzimas como celulases, pectinases e proteases, até atingir o parênquima vascular onde induzirá a formação do sítio de alimentação, para começar a fase sedentária de seu ciclo (HUSSEY & JANSSEN, 2002; GAL *et al.*, 2006). Esse sítio é composto por um conjunto de três a cinco células vegetais; sua formação se dá por alteração no balanço hormonal, sinalização celular e expressão gênica que o nematoide induz na planta hospedeira, resultando em células multinucleadas por endomitoses sucessivas, tendo como consequências alterações fisiológicas e anatômicas da raiz (BIRD *et al.*, 2003). As células do sítio de alimentação, além de multinucleadas com até 80 núcleos, são também poliploides, apresentando até mais de 8 vezes cromossomos que um núcleo normal (HUANG & MAGGENTI, 1969; WIGGERS *et al.*, 1990). Tratando-se de um parasita sedentário, o sucesso do seu parasitismo vai depender da formação do sítio de alimentação (VAN DER EYCKEN *et al.*, 1996; WILLIAMSON & GLEASON, 2003). Após a formação do sítio de alimentação, o J2 torna-se sedentário e passa pela segunda ecdise e perda do estilete, dando origem ao juvenil de terceiro estágio (J3); após, passa pela terceira ecdise, originando o juvenil de quarto estágio e a última ecdise, dando origem ao adulto (figura 1). Após a última ecdise, as fêmeas jovens, piriformes e sedentárias,



formadas em condições favoráveis, voltam a se alimentar nas células gigantes e continuam estimulando a formação da galha por hiperplasia de células do parênquima vascular e cortical. Já os machos vermiformes são formados em condições desfavoráveis, como estresse hídrico ou declínio da hospedeira; esses saem da raiz e abandonam o hábito sedentário (EISENBACK & TRIANTAPHYLLOU, 1991). Não há evidências de que machos se alimentam (MOENS *et al.*, 2009). No caso de *M. incognita* trata-se de uma espécie que se reproduz por partenogênese mitótica, onde a formação de machos contribui para reduzir a pressão do parasitismo sobre a planta hospedeira.

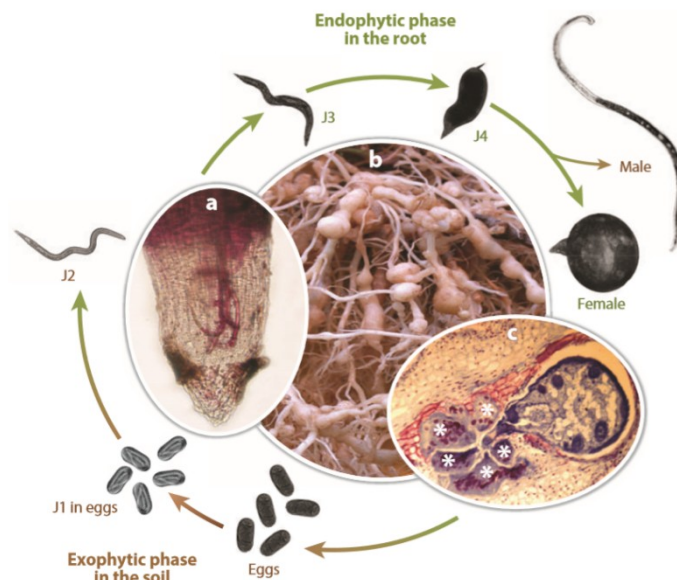


Figura 1 – Ciclo de vida de *Meloidogyne* sp. Fonte: CASTAGNONE-SERENO *et al.*, 2013.

#### 2.4. CONTROLE

Dentre as medidas utilizadas no controle de nematoides, as mais empregadas são o controle químico, utilização de variedades resistentes, rotação de culturas e controle biológico.

Controle químico consiste na utilização agrotóxicos com ação nematicidas, de princípio ativo químico, sintetizado e tóxicos aos nematoides, proporcionando redução populacional do patógeno. Esses agrotóxicos possuem alta periculosidade ao ser humano e ao meio ambiente (CALDAS, 2000). Tais fatos estimulam uma demanda por produtos fitossanitários mais

seguros e eficientes, acarretando a redução de princípios ativos presentes no mercado. Há poucos grupos químicos nematicidas que se encontram à venda no Brasil, sendo os principais: Avermectina (Mantis 400 WG<sup>®</sup>); Fluensulfona (Nimitz<sup>®</sup>); Neocotinoide (CropStar<sup>®</sup>); Metilcarbamato (Furadan<sup>®</sup>); Organofosforado (Rugby 100 GR<sup>®</sup>) e Isotiocianato de metila (Bunema 330 CS<sup>®</sup>) (MAPA, 2019).

O controle varietal se caracteriza como sendo uma das melhores medidas de controle e de fácil adoção. Essa medida consiste na substituição de variedade suscetível ao nematoide por outra resistente. Geralmente não implica na adoção de práticas culturais diferentes na rotina da propriedade. Para culturas perenes muitas vezes é a única alternativa viável. No caso do algodoeiro a principal linhagem que atua como fonte de resistência é a Auburn 623 RNR (SHEPHERD *et al.*, 1974). Recentemente foi lançada pelo Instituto Mato-Grossense do Algodão a cultivar IMA 5801B2RF, com alta resistência ao nematoide de galhas (IMAmt, ref. folder).

O controle biológico, no contexto em que esse trabalho se insere, é passível de quatro definições distintas. Segundo Eilenberg *et al.* (2001), o controle biológico é o uso de organismos vivos para suprimir ou impactar negativamente a população de um organismo prejudicial. Na visão dos fitopatologistas o controle biológico é a manipulação direta ou indireta de um organismo, com o propósito de reduzir a densidade ou potencial de inóculo de uma doença (NELSON *et al.*, 2004).

Já do ponto de vista nematológico, segundo Stirling (1991), o controle biológico é a redução da densidade populacional do nematoide através da ação de um organismo vivo, ou através da manipulação do ambiente com a introdução de antagonistas.

Para o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) os agentes biológicos de controle são definidos como organismo vivo, de ocorrência natural ou obtido por manipulação genética, introduzido no ambiente para o controle de uma população ou de atividades biológicas de outro organismo vivo considerado nocivo (BRASIL, 2002). O

controle biológico surge no contexto do controle da meloidoginose como uma alternativa sustentável ao controle químico. De utilização muito semelhante aos agrotóxicos devido à formulação e forma de aplicação, dificilmente exige grandes mudanças de equipamentos e rotina da propriedade, essas características facilitam a adoção pelo produtor. Vários micro-organismos têm sido estudados afim de se encontrar agentes eficientes de controle para os mais diversos problemas fitossanitários. Os fungos e as bactérias do gênero *Bacillus* são definitivamente os organismos mais estudados para o controle da meloidoginose. As relações ecológicas que permitem a esses organismos apresentarem atividade nematicida são, em suma, a predação, o parasitismo e o antagonismo.

No caso dos fungos de alguns gêneros são sabidamente predadores de nematoides, pois apresentam estruturas de captura especializadas, tais como anéis, redes ou micélios adesivos. Essas estruturas aderem ao nematoide, através de ligações de lectina entre a hifa e a cutícula do nematoide. Esse é o caso de fungos dos gêneros *Arthrobotrys* e *Dactylaria* (TUNLID *et al.*, 1992). Após a adesão, a hifa de penetração é responsável pelo desenvolvimento de um haustório no interior do corpo do nematoide. Essas estruturas são capazes apenas de capturar nematoides de vida livre e formas infectivas de nematoides sedentários. A sobrevivência desses fungos no solo depende da existência de matéria orgânica e nematoides, além do mais, apresentam incapacidade de serem bons saprófitas por serem maus competidores (CARNEIRO, 1992), o que compromete a utilização desses micro-organismos como agentes de controle biológico, uma vez que o sucesso do controle depende da capacidade desses organismos de se estabelecerem, sobreviverem e proliferarem no solo (PERSSON *et al.*, 2000).

Outro exemplo importante é o fungo parasita de ovos *Purporeocilium lilacinum* (Thom) Luangsa-ard, Houbaken, Hywel-Jones & Samson (GASPARD *et al.*, 1990; STIRLING & WEST, 1991; LYSEK, 1966). Seu parasitismo se dá pela adesão e germinação do esporo seguida pela emissão do apressório na camada vitelínea do ovo do nematoide, que por sua vez

emite a hifa infectiva que penetra as outras camadas. Após a penetração das camadas o fungo coloniza o embrião do ovo, gerando posteriormente novos conidióforos e conídios, completando seu ciclo (MORGAN-JONES, 1984). *P. lilacinum* também apresenta atividade nematicida pela produção de toxinas (SINGH *et al.*, 2013). Além da atividade nematicida, alguns isolados são capazes de impactar positivamente o crescimento da planta (LOPEZ & SWORD, 2015). Contudo, *P. lilacinum* apresenta também a capacidade de parasitar seres humanos imunocomprometidos, afetando mais especificamente o globo ocular (AGRAWAL *et al.*, 1979; PETTIT *et al.*, 1980; LUANGSA-ARD *et al.*, 2011).

Já entre as bactérias, *Pasteuria penetrans* (Thorne) Sayre & Starr merece destaque. Trata-se de uma bactéria gram positiva, endoparasita obrigatória do nematoide das galhas (IMBRIANI & MANKAU, 1977), e naturalmente presente em solos supressivos a esse nematoide (CETINTAS & DICKSON, 2004). Essa bactéria forma endósporos que aderem aos J2 do nematoide no solo. Os endósporos germinam assim que o J2 começa a se alimentar das células gigantes (SAYRE & WERGIN, 1977). Após a penetração, o tubo germinativo se desenvolve no interior do nematoide; com o desenvolvimento do hospedeiro (J2) as células bacterianas começam o processo de multiplicação e esporulação (CHEN & DICKSON, 1997). O desenvolvimento da bactéria é em sincronia com o desenvolvimento do nematoide. Contudo, ao chegar na fase adulta, as fêmeas infectadas não são capazes de ovipositar e morrem completamente preenchidas por endósporos de *P. penetrans*. Com a decomposição das fêmeas, milhares de endósporos são liberados no solo (CHEN & DICKSON, 1998) e, rapidamente o solo infestado se transforma em solo supressivo ao nematoide das galhas (CETINTAS & DICKSON, 2004). Contudo, sendo um parasita obrigatório de *Meloidogyne*, seu cultivo para utilização comercial é um grande desafio (CHEN & DICKSON, 1998; BISHOP & ELLAR, 1991).

Dentre as bactérias, as do gênero *Bacillus* são as mais estudadas. As bactérias desse gênero despertaram grande interesse com a descoberta da eficácia de *Bacillus thuringiensis*

Berliner no controle de *Spodoptera* Guenée. Entre os agentes de biocontrole dos nematoides das galhas, estão as bactérias do gênero *Bacillus* e *Paenibacillus* Ash et al. Recentemente, vários produtos comerciais a base de bactérias foram registrados para o controle de *Meloidogyne* spp. em várias culturas, inclusive o algodoeiro (MAPA, 2019) (tabela 1).

**Tabela 1 – Produtos biológicos à base de bactérias registrados no Brasil para o controle de fitonematoides.**

<b>Produto</b>	<b>Princípio ativo</b>	<b>Nematoide/ Cultura</b>	<b>Companhia</b>
Andril®	<i>Bacillus firmus</i>	<i>Meloidogyne javanica</i> / Todas as culturas <i>M. incognita</i> / Todas as culturas <i>Pratylenchus brachyurus</i> / Todas as culturas	Bayer S.A – São Paulo/SP
Oleaje®	<i>Bacillus firmus</i>	<i>M. incognita</i> / Todas as culturas <i>M. javanica</i> / Todas as culturas <i>P. brachyurus</i> / Todas as culturas	Bayer S.A – São Paulo/SP
Votivo®	<i>Bacillus firmus</i>	<i>M. incognita</i> / Algodão; Soja <i>M. javanica</i> / Algodão; Soja <i>P. brachyurus</i> / Algodão; Milho; Soja	Bayer S.A – São Paulo/SP
Onix®	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	<i>M. javanica</i> / Todas as culturas <i>P. brachyurus</i> / Todas as culturas	Lab. de Biocontrole Farroupilha Ltda
Quartzo®	<i>Bacillus subtilis</i> + <i>B. licheniformis</i>	<i>P. brachyurus</i> / Todas as culturas <i>P. zea</i> / cana-de-açúcar <i>M. incognita</i> / Todas as culturas	FMC Química do Brasil Ltda.

		<i>M. javanica</i> / Todas as culturas <i>M. graminicola</i> /Todas as culturas <i>M. exigua</i> / Todas as culturas	
Presence®	<i>Bacillus subtilis</i> + <i>B. licheniformis</i>	<i>P. brachyurus</i> / Todas as culturas <i>M. incognita</i> / Todas as culturas	FMC Química do Brasil Ltda.
Rizos OG®	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>P. brachyurus</i> / Soja; Todas as culturas <i>M. javanica</i> / Soja; Todas as culturas	Lab. de Biocontrole Farroupilha Ltda
Nemacontrol®	<i>Bacillus amylolichefaciens</i>	<i>P. brachyurus</i> / Soja	Simbiose Ind. e Com. de Fertilizantes e Insumos Microbiológicos
No- Nema®	<i>Bacillus amylolichefaciens</i>	<i>M. incognita</i> / Alface	Biovalens
Biobaci®	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>M. incognita</i> / Todas as culturas <i>M. javanica</i> / Todas as culturas	Biovalens Ltda.
Andril Prime®	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>M. javanica</i> / Todas as culturas	Biovalens Ltda
Oleaje Prime®	<i>Bacillus firmus</i>	<i>M. javanica</i> / Todas as culturas <i>P. brachyurus</i> / Todas as culturas	Basf S.A.
Onix OG®	<i>Bacillus methilotrophicus</i>	<i>M. javanica</i> / Todas as culturas <i>P. brachyurus</i> / Todas as culturas	Laboratorio De Bio Controle Farroupilha Ltda
Rizos®	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>M. javanica</i> / Todas as culturas <i>P. brachyurus</i> / Todas as culturas	Laboratorio De Bio Controle Farroupilha Ltda
Votivo Prime®	<i>Bacillus firmus</i>	<i>M. javanica</i> / Todas as culturas <i>P. brachyurus</i> / Todas as culturas	Basf S.A.
Eficaz Nema®	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>P. brachyurus</i> / Todas as culturas	Simbiose Indústria E Comércio De Fertilizantes E Insumos Microbiológicos Ltda

Fonte: CARNEIRO *et al.*, 2019 (com adaptações).

De maneira geral, os bacilos são conhecidos por suprimir doenças através da produção de compostos voláteis e produtos difusos, assim como indução de resistência, agressiva colonização e promoção de crescimento (KLOEPFER *et al.*, 1980; WELLER, 1988; SIDDIQUI & MAHMOOD, 1999; SIDDIQUI, 2006).

Diversas espécies como *B. firmus* Bredemann & Werner (TEREFE *et al.*, 2009), *B. thuringiensis* (ZUCKERMAN *et al.*, 1993), *B. subtilis* (Ehrenberg) Cohn (SIDDIQUI & MAHMOOD, 1993), *B. megaterium* de Bary (PADGHAM & SIKORA, 2007), entre outras, já foram relatadas apresentando capacidade de controle de *Meloidogyne* spp.

Os modos de ação mais comumente associados às bactérias no controle de fitonematoides são: a) Competição pelo sítio de penetração, esse modo se baseia na ideia de ocupação de nichos ecológicos, ou seja, a bactéria é capaz de colonizar a raiz (rizocompetência). Bactérias rizocompetentes são capazes de mudar a composição do exsudato radicular, dificultando assim que os J2 do nematoide encontrem a raiz (STIRLING, 1991), reduzindo os níveis de infecção e a população final do nematoide por consequência; b) Antagonismo, esse por sua vez apresenta diversos mecanismos de ação sendo eles comumente associado à produção de exsudatos bacterianos tóxicos aos nematoides. Alguns trabalhos evidenciam enzimas como quitinases, glucanases e colagenases, que atuam na cutícula do nematoide, ou diretamente na parede dos ovos, como as responsáveis pelo efeito nematicida (GENG *et al.*, 2016); tais proteínas apresentam maior atividade sobre os estádios exógenos de *Meloidogyne*. As proteínas Cry, por exemplo, famosas pelo seu efeito inseticida, são as responsáveis pelo efeito nematicida (PENG *et al.*, 2011), contudo essas proteínas atuam por ingestão, tornando esse mecanismo de ação improvável sobre *Meloidogyne* spp., uma vez que o nematoide no estágio J2 migra intercelularmente sem se alimentar até o cilindro central, onde estabelece seu sítio de alimentação, se alimentando apenas das células gigantes, fazendo com que as proteínas presentes no solo e na rizosfera não causem efeito nematicida. A produção de cianeto de hidrogênio (SINGH & SIDDIQUI, 2010) assim como fenol e outros

compostos voláteis (HUANG *et al.*, 2010) que apresentam ação biocida são indicados como os responsáveis pela ação nematicida; c) Indução de resistência sistêmica (IRS), é nada mais do que a capacidade que essas bactérias têm de desencadear expressão de atividade imune no tecido afetado pelo patógeno reduzindo significativamente infecções subsequentes (KUC, 1983). Essa atividade imune é comumente associada à indução de genes e produção de ácido indolacético (MOHITE, 2013) assim como fenilalanina amônia-liase (HU *et al.*, 2018). Mariutto & Ongena (2015) atribuem a IRS à produção de compostos fenólicos e lignificação de células.

Dentre os três mecanismos de ação acima relatados, os dois primeiros são altamente dependentes de uma colonização eficaz da raiz, contudo Stirling (1991) aponta que a colonização de raízes recém-formadas é mínima, sendo que as pequenas colônias das bactérias aparecem associadas à matéria orgânica do solo e não às raízes. Durham (2013) aponta que há declínio na população bacteriana radicular entre a terceira e a sexta semana, o que prejudicaria o efeito nematicida ao final do ciclo de diversas culturas. Tal fato faz necessário avaliar a eficácia de reaplicações para manutenção da população bacteriana a níveis satisfatórios. Outro ponto importante a ser citado é que ensaios *in vitro* comumente não apresentam os mesmos resultados dos ensaios *in vivo* (LUDWIG *et al.*, 2013). Fato esse associado à diferença de substrato utilizados pelas bactérias nos ensaios *in vivo* e nos *in vitro*. A colonização desigual das raízes como apontado por Beattie (2007) é outro motivo para essa diferença entre os resultados *in vivo* e *in vitro*. Devido a alterações morfológicas e metabólicas nas raízes durante o processo de envelhecimento radicular, ocorrem também alterações na quantidade de água e substrato no exsudato radicular necessário para a manutenção das rizobactérias em quantidade adequada para o controle dos nematoides (CARNEIRO *et al.*, 2019).

Em função do potencial e das limitações apresentadas por essas bactérias, mais estudos são necessários para o desenvolvimento de produtos que atendam à crescente necessidade por parte dos produtores de nematicidas eficazes e sustentáveis.



### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. CULTIVO DE *BACILLUS* SPP.**

Quatro estirpes da Coleção de Bactérias de Invertebrados da Embrapa Recursos genéticos e Biotecnologia, isoladas da rizosfera de algodoeiro foram cultivadas em meio TSB (*Tryptic Soy Broth*) líquido ou meio de cultura Embrapa (MONNERAT *et al.*, 2007) líquido, em agitador orbital por 72 horas a 200 rpm e 30 °C. A qualidade da suspensão bacteriana foi avaliada através da contagem de colônias crescidas em placas de Petri com meio TSB sólido após plaqueamento de 100 µl por da suspensão cultivada, determinado o número de unidades formadoras de colônia por ml (UFC/ml). Com auxílio do microscópio ótico, no aumento de 1000X, uma pequena alíquota foi analisada quanto a presença de endósporos. Foi considerada esporulação adequada, quando o número de esporos foi igual ou superior a 90% do total de UFC presentes no cultivo das bactérias. Foi considerada satisfatória a multiplicação quando as contagens resultaram em valores superiores a  $1 \times 10^6$  UFC/ml. As amostras foram mantidas sob refrigeração a -4 °C e utilizadas nos testes *in vivo* em até sete dias após cultivo.

#### **3.2. AVALIAÇÃO DE QUALIDADE DE PRODUTOS COMERCIAIS**

Os produtos Quartzo® (*Bacillus subtilis* + *Bacillus licheniformis*), Onix® (*Bacillus methylotrophicus*), Rizos® (*Bacillus subtilis*) e Votivo® (*Bacillus firmus*) foram avaliados quanto à pureza e concentração. Foram separadas em fluxo laminar, alíquotas de cada produto e para a avaliação da qualidade foi feita a diluição seriada e plaqueamento em triplicada, em meio TSB + ágar de cada produto. Posteriormente foi realizada a contagem de unidades formadoras de colônias, a fim de se avaliar a real concentração das bactérias no produto. Também foi alvo de observação, a existência ou não de colônias com morfologia díspares, indicando a contaminação do produto.

#### **3.3. OBTENÇÃO E MULTIPLICAÇÃO DE NEMATOIDES DO GÊNERO**

##### ***MELOIDOGYNE***

O inóculo inicial foi identificado inicialmente pelo perfil da enzima esterase (CARNEIRO & ALMEIDA, 2001). Trata-se de um *pool* de diversas populações de *Meloidogyne incognita*, oriundas principalmente de plantações de algodão do estado da Bahia (LOPES *et al.*, 2019). Esse inóculo foi multiplicado em tomateiros suscetíveis, variedade Santa Clara VF5600, em casa de vegetação, por um período de três meses. As regas, adubações e controle de pragas foram realizadas quando necessário. Após os três meses, o sistema radicular das plantas foi levado ao Laboratório de Nematologia da Embrapa da Embrapa Recursos genéticos e Biotecnologia, para a realização da extração de ovos, segundo metodologia de Hussey & Barker (1973), modificado por Boneti & Ferraz (1981), usando solução de hipoclorito de sódio a 0,5%. Para inoculação dos ensaios, os ovos e/ou J2 foram quantificados em lâminas de Peter. Para a obtenção dos J2, a suspensão de ovos obtida na extração foi colocada em funis de Baermann modificados (FLEGG, 1967).

#### **3.4. ENSAIOS EM CONDIÇÃO DE CASA DE VEGETAÇÃO**

O primeiro ensaio *in vivo* consistiu em avaliar a eficácia de controle no decorrer do tempo (60 e 150 DAI) das quatro melhores estirpes de bactérias selecionadas previamente (tabela 2). As estirpes foram cultivadas separadamente, segundo o item 3.1 ,em meio Embrapa. As sementes de algodoeiro FM 966 foram tratadas com as diferentes bactérias (microbiolização), na dosagem de 3 ml/Kg de semente estando na concentração de  $1 \times 10^8$  UFC/ml. Foi utilizado comparativamente o produto Votivo<sup>®</sup> (*Bacillus firmus*) em tratamento de semente (TS) na dosagem recomendada pelo fabricante (tabela 2) e água destilada como testemunha. Sacos de 2 l contendo substrato (50%) + solo autoclavado (50%) foram semeados com as sementes tratadas. O ensaio consistiu, portanto, de 6 tratamentos com 8 repetições. As plantas foram inoculadas aos 21 dias após o plantio (aproximadamente aos 15 cm de altura) com 8.000 ovos de *M. incognita*. A avaliação ocorreu aos 60 e 150 dias após a inoculação (DAI).

**Tabela 2 – Ensaio com *Bacillus* spp. para o controle de *Meloidogyne incognita* em plantas de algodão FM 966 *in vivo* em condições de casa de vegetação (1.º ensaio: avaliado aos 60 e 150 dias após inoculação, instalado em junho de 2017)**

Tratamentos	Bactéria	Concentração	Dosagem
S2535	<i>Bacillus</i> sp.	$1,0 \times 10^8$ UFC/ml	3 ml/Kg semente
S2536	<i>Bacillus</i> sp.	$1,0 \times 10^8$ UFC/ml	3 ml/Kg semente
S2538	<i>Bacillus</i> sp.	$1,0 \times 10^8$ UFC/ml	3 ml/Kg semente
S2548	<i>Bacillus</i> sp.	$1,0 \times 10^8$ UFC/ml	3 ml/Kg semente
Votivo®	<i>Bacillus firmus</i>	$1,0 \times 10^8$ UFC/ml	6 ml/Kg semente
Testemunha	Água destilada estéril	NA	3ml/Kg semente

O segundo ensaio consistiu em avaliar a eficácia de controle da melhor estirpe do primeiro ensaio *in vivo*, em comparação aos nematicidas biológicos comerciais, Quartzo®, Onix®, Rizos® e o nematicida químico Nimitz® (tabela 3). A estirpe da bactéria selecionada foi cultivada como descrito anteriormente. A seguir, realizou-se o tratamento de sementes de algodão (TS) da cultivar TMG 47 b2rf na dosagem de 3 ml/Kg de semente estando na concentração  $1 \times 10^8$  UFC/ml. Os nematicidas biológicos foram utilizados em tratamento de sementes e o químico em tratamento de sulco, na dosagem recomendada pelo fabricante (tabela3). Água destilada foi utilizada como testemunha. Sacos de 2 L contendo substrato (50%) + solo autoclavado (50%) foram semeados. O ensaio consistiu-se, portanto, de 6

tratamentos com 8 repetições. As plantas foram inoculadas aos 21 dias após o plantio com 5.000 J2 de *M. incognita*. A avaliação ocorreu aos 60 e 120 DAI.

**Tabela 3 – Ensaio com *Bacillus* spp. para o controle de *Meloidogyne incognita* em plantas de algodão da TMG 47 b2rf *in vivo* em condições de casa de vegetação (2.º ensaio: avaliado aos 60 e 120 dias após inoculação, instalado em abril de 2018)**

Tratamentos	Princípio ativo	Concentração	Dosagem
S2538	<i>Bacillus</i> sp.	$1,0 \times 10^8$ UFC/ml	3 ml/Kg semente
Quartzo® em TS	<i>B. licheniformis</i> + <i>B. subtilis</i>	$1,0 \times 10^{11}$ UFC/g + $1,0 \times 10^{11}$ UFC/g	200g/ha
Onix®	<i>B. methilotrophicus</i>	$1,0 \times 10^9$ UFC/ml	3 ml/Kg semente
Rizos®	<i>B. subtilis</i>	$3,0 \times 10^9$ UFC/ml	2ml/Kg semente
Nimitz®	Fluensulfone	480 g/l	600ml/ha
Testemunha	Água destilada estéril	NA	3ml/Kg semente

O terceiro ensaio objetivou repetir o segundo ensaio, adicionando-se o tratamento Quartzo® em aplicação em sulco (tabela 4), a fim de se comparar a eficácia do tratamento de sementes e aplicação em sulco. Dessa forma uma pequena cova, simulando um sulco de plantio, foi tratada com o produto, segundo informação do rótulo, anteriormente ao plantio. O tratamento químico não foi realizado nesse ensaio. Sacos de 2 l contendo substrato (50%) + solo autoclavado (50%) foram semeados com as sementes tratadas. Esse ensaio consistiu-se, portanto, de 6 tratamentos com 8 repetições. As plantas foram inoculadas aos 21 dias com 10.000 ovos de *M. incognita*. A avaliação ocorreu aos 60 e 120 DAI.

**Tabela 4 – Ensaio com *Bacillus* spp. para o controle de *Meloidogyne incognita* em plantas de algodão da cultivar TMG 47 b2rf *in vivo* em condições de casa de vegetação (3.º ensaio: avaliado aos 60 e 120 dias após a inoculação, instalado em novembro de 2018)**

Tratamentos	Bactérias	Concentração	Dosagem
S2538	<i>Bacillus</i> sp.	$1,0 \times 10^8$ UFC/ml	3ml/Kg semente
Quartzo <sup>®</sup> em TS	<i>B. licheniformis</i> + <i>B. subtilis</i>	$1,0 \times 10^{11}$ UFC/g + $1,0 \times 10^{11}$ UFC/g	200g/ha
Quartzo <sup>®</sup> em sulco	<i>B. licheniformis</i> + <i>B. subtilis</i>	$1,0 \times 10^{11}$ UFC/g + $1,0 \times 10^{11}$ UFC/g	200g/ha
Onix <sup>®</sup>	<i>B. methilotrophicus</i>	$1,0 \times 10^9$ UFC/ml	3ml/Kg semente
Rizos <sup>®</sup>	<i>B. subtilis</i>	$3,0 \times 10^9$ UFC/ml	2ml/Kg semente
Testemunha	Água destilada estéril	NA	3ml/Kg semente

Nesses três ensaios foram avaliados os índices de galhas (IG) e massas de ovos (IMO), conforme proposto pela escala de Hartman & Sasser (1985) (tabela 5). Para tal avaliação, as raízes foram separadas de suas partes aéreas, lavadas e avaliadas quanto ao seu peso fresco. Em seguida, massas de ovos foram coradas com Floxina B na concentração de 6 mg/l e quantificadas a olho nu quanto aos índices. Os ovos foram extraídos das raízes segundo Hussey & Barker (1973) e modificado por Boneti & Ferraz (1981). Foram calculados o fator de reprodução ( $FR = \text{população final} / \text{população inicial}$ ) e número de ovos por grama de raiz (OR). Posteriormente a parte aérea foi seca em estufa a 65 °C por 48 horas e em seguida foi avaliada quanto ao peso. Os experimentos foram realizados com delineamento em blocos inteiramente casualizados, em arranjo simples e uma planta por parcela. Os dados foram submetidos à análise de variância, utilizando o teste F, ao nível de 5% de probabilidade. As médias foram transformadas por  $\log_{10} X + 1$ , agrupadas pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

**Tabela 5 – Escala de notas Hartman & Sasser (1985)**

Nota	N.º de galhas ou massa de ovos
1	1 a 2
2	3 a 10
3	11 a 30
4	31 a 100
5	maior que 100

### 3.5. BIOENSAIOS DE RIZOCOMPETÊNCIA

Os ensaios de rizocompetência foram realizados a fim de se averiguar a capacidade de colonização radicular dos bacilos avaliados. Para tanto foi utilizada a metodologia proposta por Romero (2001) com adaptações. Sementes de algodão TMG 44 b2rf foram esterilizadas superficialmente com álcool etílico 50% por dois minutos e meio e hipoclorito 2% por quatro minutos e tríplice lavagem com água destilada estéril e secagem. As sementes foram tratadas com os produtos Quartzo<sup>®</sup>, Onix<sup>®</sup> e Rizos<sup>®</sup>, segundo instruções do rótulo, ou informação do departamento técnico dos fabricantes indicadas anteriormente (tabelas 3 e 4) e a estirpe selecionada S2538 dos ensaios *in vivo*, na dosagem de 3 ml/Kg de semente na concentração  $1 \times 10^8$  UFC/ml. Água destilada estéril foi utilizada como testemunha. Essas sementes foram colocadas em tubos de ensaio com meio Phytigel<sup>®</sup> na concentração de 11 g/l até metade dos tubos, previamente esterilizados e incubados à temperatura ambiente por 30 dias. Foi avaliada visualmente a formação de halo bacteriano em torno da raiz a cada sete dias, a fim de se identificar em que momento a colonização ocorreu.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. ENSAIO DE AVALIAÇÃO DE ESTIRPES DE *BACILLUS* SPP. EM CONDIÇÕES DE CASA DE VEGETAÇÃO

Aos 60 DAI, todos os tratamentos obtiveram nota 4 no IG e no IMO, com exceção da testemunha que apresentou nota 5. Já aos 150 DAI, todos os tratamentos obtiveram nota 5, evidenciado um efeito reduzido das estirpes aos 60 DAI e nenhum efeito aos 150 DAI (tabela 6).

**Tabela 6 – Ensaio *in vivo* em casa de vegetação, no período do inverno, para avaliar o efeito de *Bacillus* spp. em tratamento de semente de algodão da cultivar FM 966 sobre a formação de galha e massas de ovos de *Meloidogyne incognita*, em plântulas suscetíveis inoculadas aos 21 dias com 8.000 ovos do nematoide e avaliadas aos 60 e 150 dias após inoculação.**

Tratamento	Bactérias	60 DAI	150 DAI
------------	-----------	--------	---------

		IG	IMO	IG	IMO
Testemunha	Água destilada	5	4	5	5
Votivo®	<i>Bacillus firmus</i>	4	4	5	5
S2535	<i>Bacillus sp.</i>	4	4	5	5
S2536	<i>Bacillus sp.</i>	4	4	5	5
S2538	<i>Bacillus sp.</i>	4	4	5	5
S2548	<i>Bacillus sp.</i>	4	4	5	5

Notas (1 a 5): 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 > 100 galhas ou massas de ovos por sistema radicular (Hartman & Sasser, 1985). IG= índice de galhas; IMO= Índice de massa de ovos.

No comparativo de médias para os valores de fator de reprodução (FR) aos 60 DAI, apenas os isolados S2536 e S2538 apresentaram uma pequena redução em relação à testemunha, embora sem diferença estatística ( $GL_{total} = 47$ ;  $GL_{residual} = 42$ ) ( $Pr < F = 0,3743$ ). Para a massa fresca de raiz (MFR), apenas o isolado S2538 apresentou incremento de massa em relação à testemunha, contudo não diferiu dos demais tratamentos no teste de Scott-Knott ( $GL_{total} = 47$ ;  $GL_{residual} = 42$ ) ( $Pr > F = 0,0209$ ). Para a massa seca de parte aérea (MSA) apenas o isolado S2535 e o produto *Votivo*® apresentaram incremento, sem diferença estatística ( $GL_{total} = 47$ ;  $GL_{residual} = 42$ ) ( $Pr < F = 0,3733$ ). Para o número de ovos por grama de raiz (OR), os isolados S2535 e S2538 apresentaram redução, embora sem diferença estatística ( $GL_{total} = 47$ ;  $GL_{residual} = 42$ ) ( $Pr < F = 0,1584$ ) (tabela 7). De maneira geral não houve diferença significativa entre os tratamentos nos primeiros 60 dias do ensaio, não havendo redução significativa da população do nematoide ou mesmo promoção de crescimento das plantas.

**Tabela 7– Ensaio *in vivo* em casa de vegetação, no período de inverno, para avaliar o efeito do tratamento de sementes de algodão da cultivar FM 966 com *Bacillus* spp. sobre a reprodução de *Meloidogyne incognita* e o desenvolvimento de planta suscetível inoculada aos 21 dias com 8.000 ovos do nematoide e avaliadas aos 60 e 150 dias após inoculação.**

Tratamento	FR <sup>1</sup>		MSA (g) <sup>1</sup>		MFR (g) <sup>1</sup>		OR <sup>1</sup>	
	60 DAI	150 DAI	60 DAI	150 DAI	60 DAI	150 DAI	60 DAI	150 DAI
Testemunha	2,31 a	84,69 a	13,25 a	39,43 a	20,18 a	71,81 a	3827,39 a	10908,93 a

Votivo®	3,09 a	96,11 a	13,37 a	38,06 a	16,18 a	77,68 a	7716,13 a	10033,05 a
S2535	2,34 a	127,58 a	13,31 a	32,0 a	16,31 a	62,62 a	3631,32 a	15860,14 a
S2536	1,92 a	153,14 a	11,75 a	38,78 a	9,5 b	78,71 a	5258,13 a	16718,12 a
S2538	1,3 a	182,73 a	15,87 a	36,57 a	23,5 a	94,71 a	1603,92 a	16575,05 a
S2548	3,22 a	112,86 a	11,68 a	38,08 a	12,75 b	65,75 a	5731,98 a	12497,69 a
DV	1,96	97,83	4,08	7,61	8,92	24,11	6292,77	11535,16

<sup>1</sup>Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ( $P \leq 0,05$ ). CV = 47,2 aos 60 DAI e CV = 27,5 aos 150 DAI. Fr= Fator de reprodução. MSA= massa seca de parte aérea. MFR= massa fresca de raiz. OR= número de ovos por grama de raiz.

Aos 150 DAI todos os tratamentos apresentaram aumento do FR em relação a testemunha, um valor inverso ao esperado, embora não tenha havido diferença estatística. Nenhuma bactéria apresentou redução do FR ( $GL_{total} = 43$ ;  $GL_{residual} = 38$ ) ( $Pr < F = 0,2809$ ) e OR ( $GL_{total} = 43$ ;  $GL_{residual} = 38$ ) ( $Pr < F = 0,4640$ ), incremento de MFR ( $GL_{total} = 43$ ;  $GL_{residual} = 38$ ) ( $Pr < F = 0,1508$ ) e incremento de MSA ( $GL_{total} = 43$ ;  $GL_{residual} = 38$ ) ( $Pr < F = 0,4517$ ), demonstrando que ao final os tratamentos não apresentaram efeito de controle e nem de promoção de crescimento.

Ao analisar os valores obtidos aos 60 e 150 DAI, ocorreu um incremento em todas as variáveis (FR, MFR, MSA e OR). Isso é devido ao crescimento da planta e ao maior número de ciclos do nematoide.

#### 4.2. ENSAIOS COM PRODUTOS COMERCIAIS BIOLÓGICOS EM CONDIÇÃO DE CASA DE VEGETAÇÃO

Com o intuito de testar outros produtos comerciais disponíveis no mercado à base de *Bacillus* spp. foram realizados dois ensaio em casa-de-vegetação. No primeiro ensaio, o tratamento Nimitz® promoveu a morte das plântulas (figura 2), e portanto foi retirado do experimento. Quanto ao IG e IMO, todos os tratamentos aos 60 DAI obtiveram nota 4 nos dois índices, segundo a escala de Hartman & Sasser (1985). Já aos 120 DAI, todos os tratamentos obtiveram nota 5, exceto o isolado S2538 e o produto Quartzo® (tabela 8).



**Tabela 8 – Ensaio *in vivo* em casa de vegetação, na primavera, para avaliar o efeito de uma estirpe de *Bacillus* sp. e produtos comerciais à base de *Bacillus* spp. em tratamento de sementes de algodão da cultivar TMG 47 b2rf sobre a formação de galha e massas de ovos de *Meloidogyne incognita*, em plântulas suscetíveis inoculadas aos 21 dias com 5.000 J2 do nematoide e avaliadas aos 60 e 120 dias após inoculação.**

Tratamento	60 DAI		120 DAI	
	IG	IMO	IG	IMO
Testemunha	4	4	5	5
S2538	4	4	5	4
Onix <sup>®</sup>	4	4	5	5
Quartzo <sup>®</sup>	4	4	5	4
Rizos <sup>®</sup>	4	4	5	5

Notas (1 a 5): 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 > 100 galhas ou massas de ovos por sistema radicular (Hartman & Sasser, 1985). IG= índice de galhas; IMO= Índice de massa de ovos.

No comparativo de médias aos 60 DAI para o FR nenhum tratamento demonstrou redução significativa em relação à testemunha no teste de Scott-Knott ( $GL_{total} = 39$ ;  $GL_{residual} = 35$ ) ( $Pr < F = 0,3465$ ) (tabela 9). Para MFR houve diferença entre os tratamentos ( $GL_{total} = 39$ ;  $GL_{residual} = 35$ ) ( $Pr < F = 0,0588$ ) e os produtos comerciais apresentaram incremento de massa em relação à testemunha no teste de Scott-Knott. Para a MSA apenas o isolado S2538 apresentou um pequeno incremento em relação a testemunha, embora sem significância estatística ( $GL_{total} = 39$ ;  $GL_{residual} = 35$ ) ( $Pr < F = 0,4539$ ). Para os valores OR todos os tratamentos apresentaram redução (tabela 9), embora sem diferença estatística ( $GL_{total} = 39$ ;  $GL_{residual} = 35$ ) ( $Pr < F = 0,1038$ ).

Aos 120 DAI todos os tratamentos, exceto o tratamento com Rizos<sup>®</sup>, apresentaram relevante redução do FR contudo não houve diferença estatística entre os tratamentos ( $GL_{total} = 37$ ;  $GL_{residual} = 33$ ) ( $Pr < F = 0,5898$ ). Para os valores de MFR, todos os tratamentos apresentaram redução significativa de valor em relação a testemunha ( $GL_{total} = 37$ ;  $GL_{residual} = 33$ ) ( $Pr > F = 0,0335$ ). Para os valores de MSA não houve diferença significativa  $GL_{total} = 37$ ;  $GL_{residual} = 33$ ) ( $Pr < F = 0,8021$ ), portanto não houve incremento no crescimento das plantas. Para os valores OR não houve diferença significativa entre os tratamentos ( $GL_{total} = 37$ ;  $GL_{residual} = 33$ ) ( $Pr < F = 0,9174$ ) (tabela 9).



**Figura 2 – Efeito fitotóxico de fluensulfone (Nimitz<sup>®</sup>) em algodoeiro TMG 47 b2rf. Plantas com mais de 50 dias após o plantio**

**Tabela 9 – Ensaio *in vivo* em casa de vegetação, na primavera, para avaliar o efeito do tratamento de sementes de algodão da cultivar TMG 47 b2rf com uma estirpe de *Bacillus* sp. e produtos comerciais à base de *Bacillus* spp. sobre a reprodução de *Meloidogyne incognita* e o desenvolvimento de planta suscetível inoculada aos 21 dias com 5.000 J2 do nematoide e avaliadas aos 60 e 120 dias após inoculação.**

Tratamento	FR <sup>1</sup>		MSA (g) <sup>1</sup>		MFR (g) <sup>1</sup>		OR <sup>1</sup>	
	60 DAI	120 DAI	60 DAI	120 DAI	60 DAI	120 DAI	60 DAI	120 DAI
Testemunha	9,11 a	104,88 a	19,87 a	45,06 a	23,75 b	90,56 a	2003,92 a	6338,84 a
S2538	7,59 a	58,56 a	20,25 a	45,75 a	27,37 b	67,75 b	1418,72 a	4270,9 a

Onix®	4,59 a	49,86 a	18,87 a	43,7 a	33,0 a	67,81 b	692,16 a	3820,03 a
Quartzo®	8,91 a	43,15 a	18,12 a	40,81 a	33,06 a	73,81 b	1355,18 a	4498,57 a
Rizos®	7,62 a	81,56 a	18,87 a	44,6 a	31,25 a	65,16 b	1395,42 a	6085,37 a
DV	4,81	72,18	2,46	8,13	7,65	18,02	976,97	5301,00

<sup>1</sup>Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ( $P \leq 0,05$ ). CV=30 aos 60 DAI e CV = 28,4 aos 120 DAI. Fr= Fator de reprodução. MSA= massa seca de parte aérea. MFR= massa fresca de raiz. OR= número de ovos por grama de raiz.

Ao analisar os valores obtidos aos 60 e 120 DAI, ocorreu um incremento em todas as variáveis (FR, MFR, MSA e OR). Isso pode ser devido ao crescimento das plantas e ao maior número de ciclos de vida do nematoide como observado anteriormente.

No segundo ensaio, quanto ao IG e IMO, todos os tratamentos obtiveram nota 5 segundo a escala de Hartman & Sasser (1985), tanto aos 60 quanto aos 120 DAI (tabela 10), não havendo nenhum efeito dos produtos no índice de infecção causada pelo nematoide.

**Tabela 10 – Ensaio *in vivo* em casa de vegetação, no verão, para avaliar o efeito de uma estirpe de *Bacillus* sp. e produtos comerciais à base de *Bacillus* spp. em tratamento de sementes de algodão da cultivar TMG 47 b2rf e aplicação no sulco sobre a formação de galha e massas de ovos de *Meloidogyne incognita*, em plântulas suscetíveis inoculadas aos 21 dias com 10.000 ovos do nematoide e avaliadas aos 60 e 120 dias após inoculação.**

Tratamento	60 DAI		120 DAI	
	IG	IMO	IG	IMO
Testemunha	5	5	5	5
S2538	5	5	5	5
Onix®	5	5	5	5
Quartzo® sulco	5	5	5	5
Quartzo® TS	5	5	5	5
Rizos®	5	5	5	5

Notas (1 a 5): 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 > 100 galhas ou massas de ovos por sistema radicular (Hartman & Sasser, 1985). IG= índice de galhas; IMO= Índice de massa de ovos.

Aos 60 DAI, todos os tratamentos, exceto Quartzo® em tratamento de semente e Rizos®, apresentaram redução significativa do FR ( $GL_{total} = 46$ ;  $GL_{residual} = 41$ ) ( $Pr > F = 0,0193$ ) diferindo da testemunha pelo teste de Scott-Knott. Já para OR todos os tratamentos

apresentaram redução significativa ( $GL_{total} = 46$ ;  $GL_{residual} = 41$ ) ( $Pr > F = 0,0055$ ), comparativamente à testemunha, exceto o tratamento com Rizos<sup>®</sup>. Todos os tratamentos não apresentaram incremento de MSA ( $GL_{total} = 46$ ;  $GL_{residual} = 41$ ) ( $Pr > F = 0,7240$ ) ou aumento de MFR ( $GL_{total} = 46$ ;  $GL_{residual} = 41$ ) ( $Pr > F = 0,5790$ ), não ocorrendo nenhum estímulo de crescimento na parte aérea ou nas raízes (tabela 11).

**Tabela 11 – Ensaio *in vivo* em casa de vegetação, no verão, para avaliar o efeito de uma estirpe de *Bacillus* sp. e produtos comerciais à base de *Bacillus* spp. em tratamento de sementes de algodão da cultivar TMG 47 b2rf e aplicação no sulco sobre a reprodução de *Meloidogyne incognita* e o desenvolvimento de planta suscetível inoculada aos 21 dias com 10.000 ovos do nematoide e avaliadas aos 60 e 120 dias após inoculação.**

Tratamento	FR <sup>1</sup>		MSA (g) <sup>1</sup>		MFR (g) <sup>1</sup>		OR <sup>1</sup>	
	60 DAI	120 DAI	60 DAI	120 DAI	60 DAI	120 DAI	60 DAI	120 DAI
Testemunha	13,9 a	85,9 b	40,8 a	53,5 a	33,8 a	124,5 a	4212,4 a	6889,8 a
S2538	8,4 b	74,6 b	41,9 a	55,5 a	37,5 a	95,8 b	2317 b	8138,7 b
Onix <sup>®</sup>	11,4 b	188,0 a	38,6 a	52,6 a	36,1 a	99,6 b	3685,2 b	18195,6 b
Quartzo <sup>®</sup> sulco	8,5 b	152,4 a	38,3 a	51,0 a	37,0 a	106,5 a	2586,5 b	14688,4 a
Quartzo <sup>®</sup> TS	10,2 a	144,9 a	40,3 a	52,1 a	42 a	89,3 b	2513,7 b	15700,1 b
Rizos <sup>®</sup>	18,6 a	104,6 b	41,8 a	49,4 a	36 a	108,1 a	3196,4 a	13524,2 a
DV	7,43	75,92	6,77	7,19	9,14	20,79	1888,79	20,79

<sup>1</sup>Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ( $P \leq 0,05$ ). CV = 19 aos 60 DAI e CV = 9,5 aos 120 DAI. Fr= Fator de reprodução. MSA= massa seca de parte aérea. MFR= massa fresca de raiz. OR= número de ovos por grama de raiz.

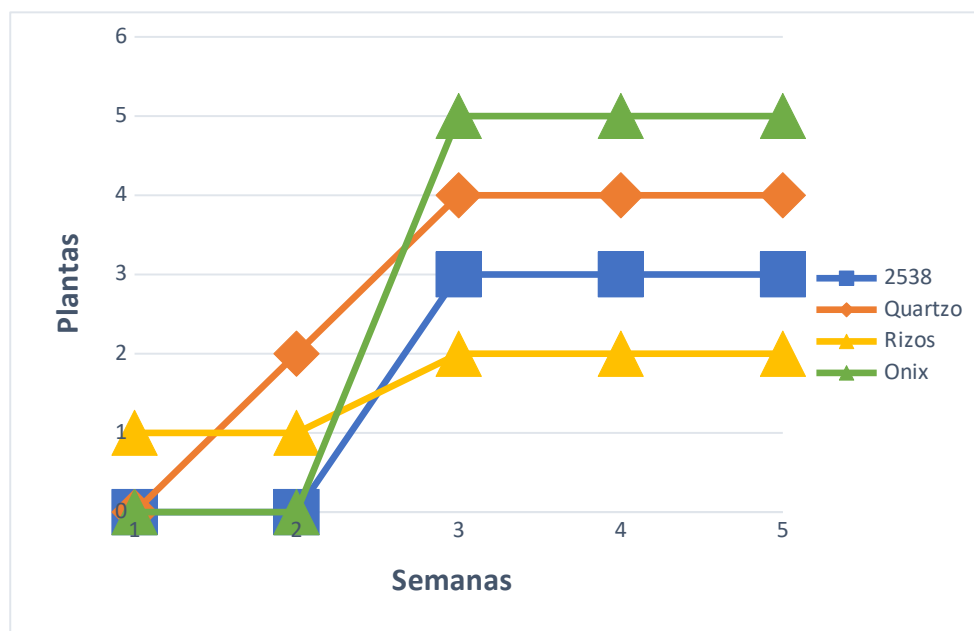
Já aos 120 DAI, houve incremento de FR para todos os tratamentos, exceto S2538, ( $GL_{total} = 47$ ;  $GL_{residual} = 42$ ) ( $Pr > F = 0,0017$ ) porém nenhum tratamento apresentou redução do FR em relação à testemunha de forma a diferirem no teste de Scott-Knott (tabela 11). Já OR ( $GL_{total} = 47$ ;  $GL_{residual} = 42$ ) ( $Pr > F = 0,0006$ ) apresentou incremento para todos os tratamentos, diferindo pelo teste de Scott-Knott os tratamentos S2538, Onix<sup>®</sup> e Quartzo<sup>®</sup>TS da testemunha, mostrando um estímulo na reprodução dos nematoides (tabela 11) causado

pelos diferentes produtos. Alguns tratamentos apresentaram redução da MFR pelo teste de Scott-Knott (S2538, Onix<sup>®</sup>, Quartzo<sup>®</sup> TS), os demais foram semelhantes à testemunha ( $GL_{total} = 47$ ;  $GL_{residual} = 42$ ) ( $Pr > F = 0,0016$ ). Os valores de MSA foram semelhantes em todos os tratamentos sem haver, portanto, diferença estatística ( $GL_{total} = 47$ ;  $GL_{residual} = 42$ ) ( $Pr > F = 0,5619$ ) (tabela 11).

Ao analisar os valores obtidos aos 60 e 120 DAI, ocorreu um incremento em todas as variáveis (FR, MFR, MSA e OR).

### **4.3. ENSAIO DE RIZOCOMPETÊNCIA**

No primeiro ensaio, o tratamento com Rizos<sup>®</sup> foi o primeiro a apresentar plantas com sinais de colonização radicular. Contudo, das oito plantas avaliadas apenas duas apresentaram halo bacteriano em volta da raiz e esse resultado foi observado apenas na terceira semana. Já o tratamento S2538 apresentou 3 plantas com halo bacteriano (figura 5) em torno da raiz, também na terceira semana e se manteve estável até a quinta semana. O tratamento Quartzo<sup>®</sup>, apresentou crescimento gradativo no número de plantas com sistema radicular colonizado, chegando a 4 plantas também na terceira semana. O tratamento Onix<sup>®</sup> só apresentou plantas com sinais de colonização radicular na terceira semana e manteve-se estável até o final do ensaio com 5 plantas colonizadas (figura 3).



**Figura 3 – Colonização das raízes de algodoeiro TMG 47 b2rf com diferentes produtos biológicos à base de *Bacillus* spp., em diferentes períodos de tempo.**

No segundo ensaio, o tratamento Rizos<sup>®</sup> apresentou três plantas com sistema radicular colonizado na terceira semana e se manteve assim até o final do ensaio. Novamente o tratamento Quartzo<sup>®</sup> apresentou colonização mais gradativa em relação aos demais tratamentos, chegando ao seu pico de 5 plantas com sistema radicular colonizados na quarta semana e se mantendo assim até o final do ensaio. Já os tratamentos Onix<sup>®</sup> e S2538 apresentaram a primeira planta colonizada na primeira semana, S2538 atingiu seu pico na terceira semana com 4 plantas colonizadas. Já o Onix<sup>®</sup> foi um pouco mais gradual, chegando ao seu pico de 5 plantas colonizadas igualmente na terceira semana (figura 4).

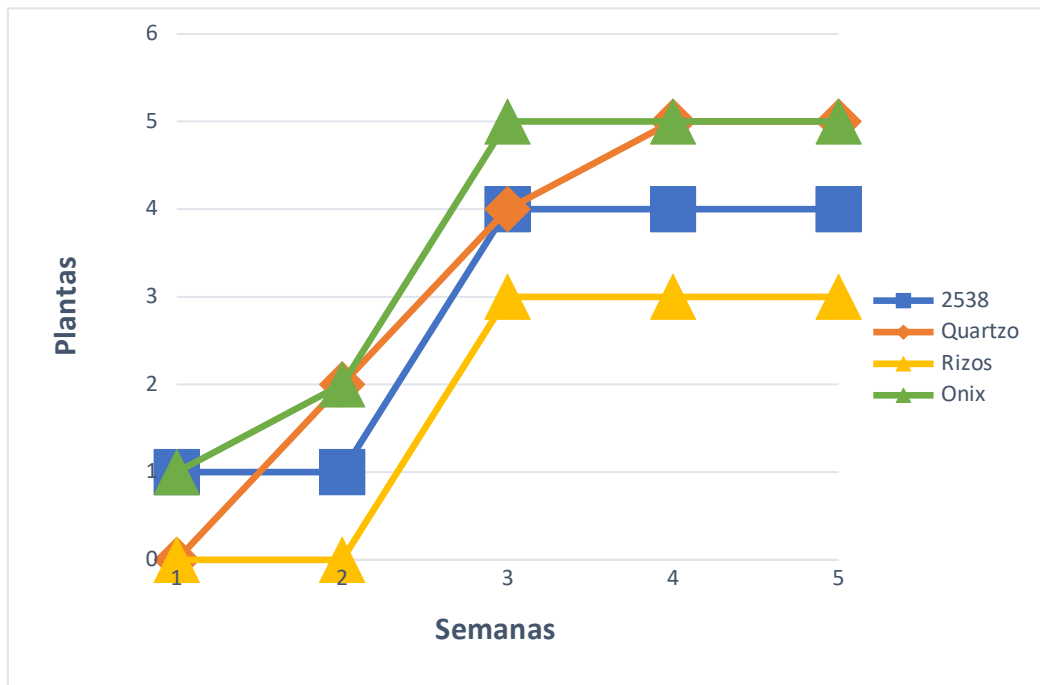


Figura 4 – Colonização das raízes de algodoeiro TMG 47 b2rf com diferentes produtos biológicos a base de *Bacillus* spp., em diferentes períodos de tempo.



Figura 5 – Halo bacteriano característico de rizocompetência aos 21 dias de observação

De maneira geral, os dois ensaios foram semelhantes, pois apresentaram colonização tardia dos sistemas radiculares, sobretudo a partir da terceira semana de desenvolvimento. Nem todas as raízes com sementes tratadas foram colonizadas pelas bactérias.

#### **4.4. AVALIAÇÃO DE QUALIDADE DE PRODUTOS COMERCIAIS**

O produto Votivo® (*Bacillus firmus*) apresentou colônias morfológicamente distintas, portanto, considerado contaminado. As colônias mais frequentes apresentaram menor velocidade de crescimento e estavam presentes na concentração de  $1,4 \times 10^9$  UFC/ml enquanto a menos frequente apresentava maior velocidade de crescimento e estava presente na concentração de  $2 \times 10^8$  UFC/ml.

O produto Onix® apresentou colônias de morfologia única, portanto foi considerado livre de contaminantes. A concentração observada foi de  $2,4 \times 10^9$  UFC/ml, sendo superior à concentração mínima informada pelo fabricante.

O produto Rizos® (*Bacillus subtilis*) apresentou colônias morfológicamente distintas, portanto, considerado contaminado. As colônias mais frequentes apresentaram bordas irregulares de coloração branca e aspecto granular, presente na concentração de  $8,3 \times 10^8$  UFC/ml. A segunda mais frequente apresentou bordas irregulares, coloração creme e aspecto liso, presente na concentração de  $4 \times 10^8$  UFC/ml. A menos frequente apresentou bordas regulares, coloração creme e aspecto liso, presente na concentração de  $1,6 \times 10^8$  UFC/ml. Nos três casos a concentração foi inferior à mínima informada pelo fabricante.

O produto Quartzo® apresentou colônias com apenas dois padrões morfológicos, sendo considerado livre de contaminantes. No primeiro caso apresentou bordas lisas, aspecto brilhante e cor branca, já no segundo, apresentou bordas lisas, aspecto brilhante e cor creme claro. A primeira estava presente na concentração de  $2,8 \times 10^{11}$  UFC/ml e a segunda estava



presente na concentração de  $3,6 \times 10^{11}$  UFC/ml. Em ambos os casos a concentração foi superior ao mínimo informado pelo fabricante.

## 5. DISCUSSÃO

Na rizosfera, as densidades bacterianas são até 100 vezes maiores do que no solo, devido aos exsudatos radiculares que servem como nutrientes para as bactérias. Essas bactérias da rizosfera formam um complexo de espécies, com várias funções diferentes no ambiente solo-planta. Entre os gêneros bacterianos dominantes, *Bacillus* e *Pseudomonas*, existem várias espécies, como *B. subtilis*, *B. sphaericus* Meyer & Neide e *P. fluorescens* Migula, capazes de antagonizar nematoides parasitas de plantas (SIKORA, 1992; TIAN *et al.*, 2007).

O controle de nematoides por bactérias rizosféricas é alcançado por diferentes mecanismos tais como: antagonismo direto através da produção de toxinas, enzimas ou outros metabolitos secundários; interferência no reconhecimento de plantas por nematoides através da colonização do sistema radicular; concorrência por nutrientes; promoção do crescimento vegetal; e resistência sistêmica induzida (TIAN *et al.*, 2007).

Embora o potencial de controle das bactérias da rizosfera em condições de campo seja geralmente menor do que em condições de casa de vegetação (HALLMANN *et al.*, 2009), vários produtos com base nessas bactérias estão no mercado brasileiro (CARNEIRO *et al.*, 2019).

Dessa maneira, no primeiro ensaio, foram selecionadas algumas estirpes da Coleção de Bactérias de Invertebrados da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (previamente selecionadas *in vitro*), quanto ao potencial de biocontrole de *M. incognita* em algodoeiro *in vivo*, usando o produto Votivo® como controle positivo, devido a vários resultados promissores apresentados com esse produto no 32º Congresso Brasileiro de Nematologia (MATTOS *et al.*, 2015).

Numa segunda e terceira etapas deste estudo a estirpe S2538 foi adotada (menor fator de reprodução aos 60 DAI) para comparação com outros produtos comerciais existentes no mercado brasileiro, exceto o Votivo® que foi posteriormente retirado do mercado mesmo mantendo o registro ativo. O produto Nimitz®, após apresentar bons resultados no controle de nematoides segundo Guilguer & Dario (2015) e Castelan & Dario (2015), foi utilizado como controle positivo, que apresentou fitoxidez não esperada, uma vez que se trata de produto registrado para a cultura. Contudo, sinais de fitotoxidez ocasionados por Fluensulfone foram observados por Morris *et al.* (2016) em aplicação foliar em tomateiro e beringela. Demonstrando que fluensulfona possui potencial fitotóxico.

Os modos de ação das rizobactérias usadas em controle biológico de nematoides são dependentes da habilidade da bactéria em colonizar a raiz da planta que o nematoide parasita, ou seja, rizocompetência. Essa característica muitas vezes é um pré-requisito para gerar efeitos protetivos notáveis, através da redução da disponibilidade de espaço (exclusão de nicho) ou nutrientes para os patógenos (MARIUTTO & ONGENA, 2015; CARNEIRO *et al.*, 2019). Os resultados do presente estudo de rizocompetência indicaram que a população máxima das bactérias estudadas no sistema radicular foi atingida próximo aos 21 dias. Segundo Weert & Bloemberg (2007) uma rápida colonização radicular é essencial para o sucesso do agente de biocontrole. Considerando esse aspecto, pode-se argumentar que os J2 penetraram nas raízes nos primeiros quinze dias quando os sistemas radiculares do algodoeiro ainda não estavam completamente colonizados pelas bactérias, permitindo o estabelecimento dos nematoides junto aos vasos condutores e conseqüente a reprodução de *M. incognita*. As baixas populações de *M. incognita* observadas no início (60 DAI), inclusive na testemunha, podem estar mais relacionadas às condições climáticas e ao desenvolvimento mais lento do patógeno no início da cultura do algodoeiro. Isso já foi comprovado por outros estudos que avaliaram a cultura do algodoeiro 90 dias após a inoculação (MOTA *et al.*, 2013; LOPES *et al.*, 2019). Outro aspecto importante é que as cepas de *Bacillus* spp., em geral, colonizam

mais intensamente raízes novas, com intensa produção de exudatos radiculares e menores teores de lignina, como já foi observado em outros estudos (HU *et al.*, 2017).

Uma análise geral dos diferentes ensaios não permite chegar a conclusões definitivas. Ocorreu uma grande variação entre os tempos de avaliação (60 e 120/150 DAI) quanto à efetividade do controle. No primeiro ensaio, pelo fato de ter sido instalado durante o inverno (9-25 °C), as populações foram baixas aos 60 DAI e com um aumento significativo aos 150 DAI, mas nenhum efeito significativo dos diferentes tratamentos no controle dos nematoides ou na promoção de crescimento das raízes e parte aérea. No segundo ensaio realizado no verão, persistindo valores elevados de FR em todos os tratamentos (FR > 43 ao final do experimento). Foi observado uma redução do FR de cerca de 50% para os tratamentos: estirpe S2538, Onix® e Quartzo®, aos 120 DAI contudo não diferindo estatisticamente entre si devido a alta variação dentro dos tratamentos, e nenhuma redução significativa de FR aos 60 DAI indicando não haver controle ou promoção de crescimento. Já no terceiro ensaio, houve redução do FR significativo aos 60 DAI para os tratamentos: S2538, Onix® e Quartzo® Sulco e nenhum controle aos 120 DAI. Nota-se que a diferença obtida por Scott-Knot aos 120 DAI para FR são referente a tratamentos onde esse fator foi significativamente superior a testemunha de forma a não demonstrar controle do nematoide. Também foi possível observar nenhuma promoção de crescimento nos dois tempos estudados.

O aumento populacional do nematoide aos 120/150 DAI esteve correlacionado ao aumento da MFR das plantas e foi observado em todos os ensaios, não havendo redução da população do nematoide pelo efeito das bactérias. Dessa forma, pode-se inferir que avaliações aos 60 DAI são precoces e geram valores de FR e OR muito baixos, impossíveis de medir com segurança os efeitos reais dos tratamentos com as bactérias no algodoeiro, como já foi demonstrado em outros trabalhos (TEREFE *et al.*, 2009; HAGAN *et al.*, 2015; XIONG *et al.*, 2015).

Como demonstrado por Lopes *et al.* (2019), o IG e IMO não apresentou correlação com os FR na cultura do algodoeiro. Esses primeiros índices são mais adequados para a quantificação dos sintomas nas raízes e não da população final do nematoide (FR e OR), contrariando diversos autores (PADGHAM & SIKORA, 2007; HU *et al.*, 2017; XIAO *et al.*, 2018), que utilizam IG e IMO para comprovar a eficiência de redução populacional do nematoide por diversos agentes de controle biológico.

No ensaio 3, é importante ressaltar que o produto Quartzo<sup>®</sup> que vem sendo recomendado para *M. incognita* para aplicação em sulco, apresentou diferença em relação à aplicação em tratamento de sementes apenas aos 60 dias, contudo como discutido anteriormente esse resultado é subestimado pelo curto período de tempo o que é confirmado aos 120 DAI, visto que não houve diferença entre os tratamentos ao final do ciclo. O mesmo produto não apresentou efeito consistente nos dois ensaios em casa de vegetação. Tal fato é preocupante por se tratar de produto comercial nematicida registrado para *M. incognita* e para todas as culturas. Resultados tão ou mais preocupantes foram obtidos para o produto Nimitz<sup>®</sup> que apresentou alta fitotoxidez ao algodoeiro, mesmo tratando-se de produto registrado para a cultura do algodoeiro, tornando impossível o prosseguimento desse tratamento no ensaio. Outro resultado preocupante é desrespeito a qualidade observada no produto Rizos<sup>®</sup> que apresentou mais de uma bactéria em sua composição o que pode ser alegado como formulação, contudo todas as bactérias presentes no produto estavam em concentração inferior ao indicado no rótulo caracterizando a não conformidade e baixa concentração de princípio ativo. Com base nesses resultados, sugere-se ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), a implementação de diretrizes mais rigorosas na concessão e manutenção de registro para nematicidas, ou exigência de laudos de eficiência com resultados mais robustos.

Esses ensaios deixaram claro que a utilização de agentes de controle biológico, isoladamente, na cultura do algodoeiro, em casos de altas infestações, como ocorre no campo,

não é eficiente. Os resultados aleatórios do efeito dessas bactérias no controle do nematoide observado nos nossos ensaios, não nos permite considerar esses produtos como nematicidas biológicos. Contudo, como demonstrado por Bull *et al.* (1991) essas bactérias são uma importante ferramenta no manejo da meloidoginose, especialmente em sistemas orgânicos, onde não se faz uso de nematicidas químicos e em pequenas propriedades.

De maneira geral, acredita-se que o controle biológico não deva ser tratado como um controle curativo isolado, e sim dentro de um contexto de manejo integrado, onde outros métodos tais como rotação de culturas, aumento no teor de matéria orgânica do solo, utilização da resistência/tolerância genética, entre outros, devam ser utilizados de maneira combinada, de acordo com a realidade agrícola vigente e em prol do agronegócio brasileiro (CARNEIRO *et al.*, 2019).

## **6. CONCLUSÕES GERAIS**

- ✓ Nenhum dos tratamentos controlou suficientemente o nematoide para ser considerado nematicida.
- ✓ Nenhum dos tratamentos promoveu o crescimento das plantas no período avaliado para ser considerado promotor de crescimento.
- ✓ O controle biológico de nematoides não deve ser utilizado isoladamente, devendo compor o controle integrado de nematoides.
- ✓ Diretrizes mais apropriadas são necessárias para registro de produtos biológicos ou químicos como nematicidas.
- ✓ O tratamento com Nimitz foi fitotóxico ao algodoeiro.
- ✓ A avaliação do controle do nematoide exercido pelos produtos químicos e biológicos deve ser feita ao final do ciclo da cultura.

- ✓ O controle de nematoides por bactérias é dependente da rizocompetência, contudo a rizocompetência não foi sinônimo de controle.
- ✓ O índice de galhas assim como o índice de massas não foram precisos o suficiente para serem utilizados sozinhos nas avaliações nematológicas de ensaios visando a avaliação de agentes de controle biológico.

## 7. REFERÊNCIAS

- ABAD, P.; FAVERY, B.; ROSSO, M.N.; CASTAGNONE-SERENO, P. 2003. Root-knot nematode parasitism and host response: Molecular basis of a sophisticated interaction. *Molecular Plant Pathology*, v.4, n.4, p.217–224.
- AGRAWAL, P.K.; LAL, B., WAHAB, S., SRIVASTAVA, O.P.; MISRA, S.C. 1979. Orbital paecilomycosis due to *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson. *Sabouraudia: Journal of Medical and Veterinary Mycology*, v.17, n.4, p.363-369.
- AMORIM, E.P.; AMORIM, V.B.O.; SILVA, S.O.; PILLAY, M. 2011a. Quality improvement of cultivated *Musa*. In: Pillay, M; Tenkouano, A. (Orgs.). *Banana breeding: progress and challenges*. New York: CRC Press, p. 252-280.
- AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. 2011b. *Manual de Fitopatologia*. Piracicaba: Agronômica Ceres, v.1, 704 p.
- ASMUS, G.L.; INOMOTO, M.M.; SILVA, R.A.; GALBIERI, R. 2015. Manejo de nematoides. In: Freire, E.C. *Algodão no cerrado do Brasil*. 3.<sup>a</sup> ed. Brasília: Associação Brasileira dos Produtores de Algodão ABRAPA. Gráfica e Editora Positiva. p.918.
- BEATTIE, G.A. 2007. Plant-associated bacteria: survey, molecular phylogeny, genomics and recent advances. In: *Plant-associated bacteria*. Springer, Dordrecht, p.1-56.
- BIRD, D.M.; OPPERMAN, C.H.; DAVIES, K.G. 2003. Interactions between bacteria and plant-parasitic nematodes: now and then. *International Journal for Parasitology*, v.33, n.11, p.1269-1276.
- BISHOP, A.H.; ELLAR, D.J. 1991. Attempts to culture *Pasteuria penetrans* in vitro. *Biocontrol Science and Technology*, v.1, n.2, p.101-114.
- BONETI, J.I.S.; FERRAZ, S. 1981. Modificação do método de Hussey; Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira*, v.6, n.3, p.553.

- BORÉM, A.; FREIRE, E.C. 2014. Algodão do plantio à colheita. Viçosa, Ed. UFV p.312.
- BRADBURY, J.F. 1986. Guide to plant pathogenic bacteria. Slough, CAB International. p.332.
- BRASIL. 2002. Decreto n.º 4.074, de 4 de janeiro de 2002. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília: DF, 8 de janeiro de 2002, seção 1, p. 1. ISSN: 1676-2339.
- BRASIL. 2017. Resolução n.º 185, de 18 de outubro de 2017. Dispõe sobre a proibição do ingrediente ativo Carbofurano em produtos agrotóxicos no país e sobre as medidas transitórias de descontinuação de seu uso nas culturas de banana, café e cana-de-açúcar. Diário Oficial da União, Brasília: DF, 19 de outubro de 2017, seção 1, p. 32. ISSN: 1677-7042.
- BULL, C.T.; WELLER, D.M.; THOMASHOW, L.S. 1991. Relationship between root colonization and suppression of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by *Pseudomonas fluorescens* strain 2-79. *Phytopathology*, v.81, n.9, p.954-959.
- CALDAS, L.Q.A. 2000. Intoxicações exógenas agudas por carbamatos, organofosforados, compostos bupiridílicos e piretróides. Niterói: Centro de Controle de Intoxicações de Niterói. p.40.
- CARNEIRO, R.M.D.G. 1992. Princípios e tendências do controle biológico de nematóides com fungos nematófagos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.27, n.13, p.113-121.
- CARNEIRO, R.G.; ANTONIO, H.; BRITO, J.A.; ALTEIA, A.A.K. 1990. Identificação de espécies e raças fisiológicas de *Meloidogyne incognita* na região noroeste do estado do Paraná: resultados preliminares. *In: Congresso Brasileiro de Nematologia, XIV, Londrina. Resumos*, p. 4.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; ALMEIDA, M.R.A. 2001. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematóides de galhas para identificação de espécies. *Nematologia Brasileira*, v.25, n.1, p.555-560.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; MONTEIRO, T.S.A.; ECKSTEIN, B; FREITAS, L.G. 2019. Controle biológico de nematoides fitoparasitas. *In: Fontes, E.M.G.; Valadares-Inglis, M.C. (Eds). Controle Biológico de Pragas da Agricultura Brasília, DF, Embrapa. (no prelo).*
- CASTAGNONE-SERENO, P.; DANCHIN, E.G.; PERFUS-BARBEOCH, L.; ABAD, P. 2013. Diversity and evolution of root-knot nematodes, genus *Meloidogyne*: new insights from the genomic era. *Annual Review of Phytopathology*, v. 51, p. 203-220.
- CASTELAN, A.A.; DARIO, G.J.A. 2015. Eficiência do nematicida fluensulfone no controle de *Meloidogyne incognita* na cultura da goiaba. *Anais. XXXII Congresso Brasileiro de Nematologia, Sociedade Brasileira de Nematologia. Londrina Paraná. p.94.*

- CETINTAS, R.; DICKSON, D.W. 2004. Persistence and suppressiveness of *Pasteuria penetrans* to *Meloidogyne arenaria* Race. *Journal of Nematology*, v.36, n.4, p.540.
- CHEN, J.; ABAWI, G.S.; ZUCKERMAN, B.M. 2000. Efficacy of *Bacillus thuringiensis*, *Paecilomyces marquandii*, and *Streptomyces costaricanus* with and without organic amendments against *Meloidogyne hapla* infecting lettuce. *Journal of Nematology*, v.32, n.1, p.70.
- CHEN, Z.X.; DICKSON, D.W. 1997. Minimal growth temperature of *Pasteuria penetrans*. *Journal of Nematology*, v.29, n.4, p.635.
- CHEN, Z. X.; DICKSON, D.W. 1998. Review of *Pasteuria penetrans*: Biology, ecology, and biological control potential. *Journal of Nematology*, v.30, n.3, p.313.
- CIA, E.; SALGADO, C.L. Doenças do algodoeiro (*Gossypium* spp.). 2005. In: Kimati, H.; Amorim, L; Bergamim Filho, A.; Camargo, L.E.A.; RESENDE, J.A.M. (Eds). Manual de Fitopatologia: doenças de plantas cultivadas. São Paulo, Editora Ceres, v.2, p.41-52.
- CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. 2018. Acompanhamento da safra brasileira de grãos. Brasília, CONAB, v. 1, n. 1. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 16/01/2019. ISSN: 2318-6852.
- COSTA, A.S. 1937. Nota sobre o mosaico do algodoeiro. *Revista de Agricultura*, v.12, n.10-12, p.453-470.
- COSTA, A.S.; FRAGA JÚNIOR, C.G. 1937. Superbrotamento ou ramulose do algodoeiro. Campinas: Instituto Agrônômico, Boletim Técnico, 19, 1937 23p.
- CURI, S.M.; BONA, A. 1972. Ocorrência do nematoide reniforme em culturas de algodão e maracujá no Estado de São Paulo. *O Biológico*, v. 38, p.127-128.
- CURTIS, R.H.; ROBINSON, A.F.; PERRY, R.N. 2009. Hatch and host location. In: Perry, R.N.; Moens, M.; Starr, J.L. (Eds). Root-knot nematodes. Wallingford, UK, CAB International, p.139-162.
- DAVIS, R.M.; COLYER, P.D.; ROTHROCK, C. .; KOCHMAN, J.K. 2006. *Fusarium* wilt of cotton: population diversity and implications for management. *Plant Disease*, v.90, n.6, p.692-703.
- DE LEY, P.; BLAXTER, M.L. 2002. Systematic position and phylogeny. In: Lee, D.L (Ed.). *The Biology of Nematodes*. London, Taylor and Francis, p.1-30.
- DURHAM, M. 2013. Characterization of root colonization by the biocontrol bacterium *Bacillus firmus* strain GB126. Auburn. Auburn University. Tese de Doutorado. p.73.
- EHRlich, J.; WOLF F, A. 1932. Areolate mildew of cotton. *Phytopathology*, v.22, n.3, p.229.



EILENBERG, J.; HAJEK, A.; LOMER, C. 2001. Suggestions for unifying the terminology in biological control. *BioControl*, 46, p.387-400. DOI: <<https://doi.org/10.1023/A:1014193329979>>.

EISENBACK, J.D.; TRIANTAPHYLLOU, H.H. 1991. Root-knot nematode: *Meloidogyne* spp. and races. In: Nickle, W.R (Ed.). *Manual of Agricultural Nematology*. New York, USA, Marcel Dekker, Inc., p. 191-274.

FLEGG, J.J.M. 1967. Extraction of *Xiphinema* and *Longidorus* species from soil by a modification of Cobb decanting and sieving technique. *Annals of Applied Biology*, v.60, n.3, p.429-437.

FREIRE, E.C. 2015. Algodão no Cerrado do Brasil. 3.<sup>a</sup> ed. Brasília: Associação Brasileira dos Produtores de Algodão ABRAPA, Gráfica e Editora Positiva, p. 942.

FREITAS, L.G.; OLIVEIRA, R.A.L.; FERRAZ, S. 2009. Introdução à Nematologia. Viçosa, Editora UFV. p.84.

GAL, T.Z.; AUSSENBERGH, E.R.; BURDMAN, S.; KAPULNIK, Y.; KOLTAI, H. 2006. Expression of a plant expansin involved in the establishment of root knot nematode parasitism in tomato. *Planta*, v.224, n.1, p.155-162.

GALBIERI, R.; FUZZATTO, M.G.; CIA, E.; LÜDERS, R.R.; MACHADO, A.C.; BOLDT, A.F. 2009. Reação de cultivares de algodoeiro a *Meloidogyne incognita* em condições de campo e casa de vegetação no estado de Mato Grosso. *Tropical Plant Pathology* v.34, n.1, p.18-23.

[GALBIERI, R.](#); SILVA, J.F.V.; ASMUS, G.L.A.; VAZ, C.M.; LAMAS, F.M.; CRESTANA, S.; TORRES, E.D.; FARIAS, A.; FALEIRO, V.; CHITARRA, L.G.; RODRIGUES, S.M.; STAUT, L.A. 2014. Áreas de produção de algodão em Mato Grosso: nematoides, murcha de fusarium, sistemas de cultivo, fertilidade e física de solo. Cuiabá, IMA (Circular Técnica IMA (Nº 8)).

GASPARD, J.T.; JAFFEE, B.A.; FERRIS, H. 1990. *Meloidogyne incognita* survival in soil infested with *Paecilomyces lilacinus* and *Verticillium chlamydosporium*. *Journal of Nematology*, v.22, n.2, p.176.

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*, v.6, p.250.

GOLDEN, A.M.; BIRCHFIELD, W. 1965. *Meloidogyne graminicola* (Heteroderidae), a new species of root-knot nematode from grass. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, v.32, n.2, p.228-231.

GÖLDI, E.A. 1887. Relatório sobre a moléstia do cafeeiro na província do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 121p.

- GOTO, M. 1990. Fundamentals of bacterial plant pathogens. San Diego, Academic Press. p.342.
- GOULART, A.M.C.; INOMOTO, M.M.; MONTEIRO, A.R. 1997. Hospedabilidade de oito cultivares de algodoeiro a *Pratylenchus brachyurus*. Nematologia Brasileira, v.21, n.2, p.111-118.
- GUILGER, L.F.; DARIO, G.J.A. 2015. Eficiência do nematicida fluensulfone no controle de *Meloidogyne enterolobii* ocorrente na cultura da goiaba. Anais. XXXII Congresso Brasileiro de Nematologia, Sociedade Brasileira de Nematologia. Londrina Paraná. p.93.
- HAGAN, A.K.; MILLER, H.B.; BURKETT, J.; BURCH, K. 2015. Root-knot control and yield response of corn with seed treatment and granular nematicides. Plant Health Progress, v.16, n.4, p.151-157.
- HALLMANN, J.; DAVIES, K.G.; SIKORA, R. 2009. Biological control using microbial pathogens, endophytes and antagonists. In: Perry, R.N.; Moens, M.; Starr, J.L. (Eds). Root-knot nematodes. Cambridge, CAB International, p. 380-411.
- HARTMAN, K.M.; SASSER, J.N. 1985. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal pattern morphology. In: Barker, K.R.; Carter, C.C.; Sasser, J.N. (Eds). An Advanced Treatise on *Meloidogyne*. v.2.: Methodology. Raleigh. NC. U.S.A., North Carolina State University Graphics, p. 69–77.
- HILLOCKS, R.J. 1992. *Fusarium* wilt. In: Hillocks, R.J. (Ed.). Cotton diseases. Wallington: CAB International, p. 127-160.
- HU, H.J.; CHEN, Y.L.; WANG, Y.F.; TANG, Y.Y.; CHEN, S.L.; YAN, S.Z. 2017. Endophytic *Bacillus cereus* effectively controls *Meloidogyne incognita* on tomato plants through rapid rhizosphere occupation and repellent action. Plant Disease, v.101, n.3, p.448-455.
- HU, H.J.; WANG, C.; LI, X.; TANG, Y.; WANG, Y.; CHEN, S.; YAN, S. 2018. RNA-Seq identification of candidate defense genes targeted by endophytic *Bacillus cereus*-mediated induced systemic resistance against *Meloidogyne incognita* in tomato. Pest Management Science, v.74, n.12, p.2793-2805.
- 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, v.59, n.4, p.447-455.
- HUANG, Y.; Y.; XU, C.; MA, L.; ZHANG, K.; DUAN, C.; MO, M. 2010. Characterisation of volatiles produced from *Bacillus megaterium* YFM3. 25 and their nematicidal activity against *Meloidogyne incognita*. European Journal of Plant Pathology, v.126, n.3, p.417-422.
- 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. Cambridge, CAB International, p. 55–97.

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

HUSSEY, R.S.; JANSSEN, G.J.W. 2002. Root-knot nematodes: *Meloidogyne* species. In: Starr, J.L.; Cook R.; Bridge, J. *Plant Resistance to Parasitic Nematodes*. Wallingford, CAB International, p. 43-70.

IAMAMOTO, M.M. 2005. Doenças foliares do algodoeiro. 2ª ed. Jaboticabal/SP: Funnep p.41.

IMA – INSTITUTO MATO-GROSSENSE DO ALGODÃO. IMA 5801B2RF: nova opção para o controle de nematoide das galhas. Instituto Mato-Grossense do Algodão: Cuiabá [Folder]. Disponível em: <<http://www.imamt.com.br/home/paginas/28/>>. Acesso em: 10 de junho de 2019

IMBRIANI, J.L.; MANKAU, R. 1977. Ultrastructure of the nematode pathogen, *Bacillus penetrans*. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.30, n.3, p.337-347.

JEFFERS, D.P.; ROBERTS, P.A. 1993. Effect of planting date and host genotype on the root-knot nematode-fusarium wilt disease complex of cotton. *Phytopathology*, n.83, v.6, p.645-654.

KARSSSEN, G.; MOENS, M. 2006. Root-knot nematodes. In: Perry, R.L.; Moens, M. (Eds.). *Plant Nematology*. Cambridge, MA, USA: CAB International, p. 59-90.

KLOEPFER, J.W.; LEONG, J.; TEINTZE, M.; SCHROTH, M.N. 1980. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature*, v.286, n.5776, p.885.

KRUG, H.P. 1936. *Fusarium* como causador da murcha do algodoeiro no Brasil. *Rodriguesia*, p.319-321.

KUC, J. 1983. Induced systemic resistance in plants to diseases caused by fungi and bacteria. In: Bailey, J.A.; Deverall, B.J. (Eds.) *The dynamics of host defense*. Sydney, Academic Press, p.191-221.

LAWS, B. 2013. 50 plantas que mudaram o rumo da história. Rio de Janeiro, Sextante. 224 p.

LEE, J.A. 1984. Cotton as a world crop. In: KOHEL, R.J. & LEWIS, C.F. *Cotton*. American Society of Agronomy, Madison. WI. p. 1-25.

LOPES, C.M.L.; CARES, J.E.; PERINA, F.J.; NASCIMENTO, G.F.; MENDONÇA, J.S.V.; MOITA, A.W.; CASTAGNONE-SERENO, P.; CARNEIRO, R.M.D.G. 2019. Diversity of *Meloidogyne incognita* populations from cotton and aggressiveness to *Gossypium* spp. accessions. *Plant Pathology*, v.68, n.4. p.816-824.

LOPEZ, D.C.; SWORD, G.A. 2015. The endophytic fungal entomopathogens *Beauveria bassiana* and *Purpureocillium lilacinum* enhance the growth of cultivated cotton (*Gossypium*

*hirsutum*) and negatively affect survival of the cotton bollworm (*Helicoverpa zea*). Biological Control, v.89, p.53-60.

LORDELLO, L.G.E. 1981. Nematóides das plantas cultivadas. São Paulo, Nobel.p.314.

LORDELLO, R.R.A.; LORDELO, A.I.L.; CIA, E.; FUZZATO, M.G. 1984. Avaliação da resistência de algodoeiro a nematoides de galhas. In: Congresso Paulista de Fitopatologia, VII, Botucatu. Resumos, p. 19.

LUANGSA-ARD, J.; HOUBRAKEN, J.; VAN DOORN, T.; HONG, S.B.; BORMAN, A.M.; HYWEL-JONES, N.L.; SAMSON, R.A. 2011. *Purpureocillium*, a new genus for the medically important *Paecilomyces lilacinus*. FEMS Microbiology Letters, v.321, n.2, p.141-149.

LUDWIG, J.; MOURA, A. B.; GOMES, C. B. 2013. Potencial da microbiolização de sementes de arroz com rizobactérias para o biocontrole do nematoide das galhas. Tropical Plant Pathology, v.38, n.3, p.264-268.

LYSEK, H. 1966. Study of biology of geohelminths. II. The importance of some soil microorganisms for the viability of geohelminth eggs in the soil. Acta Univ. Palacki. Olomuc, v.40, p.83-90.

MARIUTTO, M.; ONGENA, M. 2015. Molecular patterns of rhizobacteria involved in plant immunity elicitation. Academic Press: Advances in Botanical Research, v.75, p.21-56.

MATTOS, C.B.; ZENI, F.; DADAZIO, T.S.; SILVA, S.A.; MACHADO, A.C.Z. 2015. Votivo® (*Bacillus firmus*) no controle de *Meloidogyne incognita* em algodoeiro. Votivo® (*Bacillus firmus*) in the control of *Meloidogyne incognita* on cotton. Anais. XXXII Congresso Brasileiro de Nematologia, Sociedade Brasileira de Nematologia. Londrina Paraná. p.169.

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, v.18, n.4, p.377-389.

MERCER, C.F.; STARR, J.L.; MILLER, K.J. 1997. Host-parasite relationships of *Meloidogyne trifoliophila* isolates from New Zealand. Journal of Nematology, v.29, n.1, p.55.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. 2019. AGROFIT Sistema de Agrotóxicos Fitossanitário. Disponível em: <<http://agrofit.agricultura.gov.br/>>. Acesso em: 26 fev. 2019

MIRANDA, J.E.; SUASSUNA, N.D. 2004. Guia de identificação e controle das principais pragas e doenças do algodoeiro. Campina Grande: Embrapa Algodão, 47 p. (Embrapa Algodão. Circular Técnica, 76).

MOENS, M.; PERRY, R.; STARR, J. 2009. *Meloidogyne* species- a diverse group of novel and important plant parasites. In: Perry, R.N.; Moens, M.; Starr, J.L. (Eds). Root-knot nematodes. Wallingford, UK, CAB International, p.1-17.

- MOHITE, B. 2013. Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, v.13, n.3, p.638-649.
- MONNERAT, R.G.; BATISTA, A.C.; DE MEDEIROS, P.T.; MARTINS, É.S.; MELATTI, V.M.; PRAÇA, L.B.; DUMAS, V. F.; MORINAGA, C.; DEMO, C.; GOMES, A.C. M.; FALCÃO, R.; SIQUEIRA, C.B.; SILVA-WERNECK, J.O.; BERRY, C. 2007. Screening of Brazilian *Bacillus thuringiensis* isolates active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatalis*. *Biological Control*, v.41, n.3, p.291-295.
- MONTEIRO, A.R.; FERRAZ, L.C.C.B. 1987. Reação de quinze variedades de arroz a *Rotylenchulus reniformis*. *Nematologia Brasileira*, v.11, p.48-54.
- MORGAN-JONES, G.; WHITE, J.F.; RODRIGUEZ-KABANA, R. 1984. Phytonematode pathology: Ultrastructural studies. II. Parasitism of *Meloidogyne arenaria* eggs and larvae by *Paecilomyces lilacinus*. *Nematropica*, v.14, n.1, p.57-71.
- MORRIS, K.A.; LANGSTON, D.B.; DAVIS, R.F.; NOE, J.P.; DICKSON, D.W.; TIMPER, P. 2016. Efficacy of various application methods of fluensulfone for managing root-knot nematodes in vegetables. *Journal of Nematology*, v.4, n.2, p.65.
- MOTA, F.C.; ALVES, G.C.S.; GIBAND, M.; GOMES, A.C.M.M.; SOUSA, F.R.; MATTOS, V.S.; BARBOSA, V.H.S.; BARROSO, P.A.V.; NICOLE, M.; PEIXOTO, J.R.; ROCHA, M.R.; CARNEIRO, R.M.D.G. 2013. New sources of resistance to *Meloidogyne incognita* race 3 in wild cotton accessions and histological characterization of the defense mechanisms. *Plant Pathology*, v.62, p.1173–1183.
- NELSON, E.; KAGEYAMA, K.; DIJK, K. V.; WINDSTAM, S. 2004 Biological control of soilborne diseases: Important concepts from a model system. *In: Vanachter, A. (Ed.) Proc. XXVI IHC - Managing Soil-Borne Pathogens*. Toronto, Canada: Can. Int. Dev. Agency (CIDA). p. 635.
- OECD/FAO. 2016. Cotton. *In: OECD-FAO Agricultural Outlook 2016-2025*. Paris: OECD Publishing.
- ORION, D.; KRITZMAN, G. 1991. Antimicrobial activity of *Meloidogyne javanica* gelatinous matrix. *Revue de Nématologie*, v.14, n.4, p.481-483.
- PADGHAM, J.L.; SIKORA, R.A. 2007. Biological control potential and modes of action of *Bacillus megaterium* against *Meloidogyne graminicola* on rice. *Crop Protection*, v.26, n.7, p.971-977.
- PAIVA, F.A.; ASMUS, G.L.; ARAÚJO, A.E. 2001. Doenças. *In: Embrapa Agropecuária Oeste. Algodão Tecnologia de Produção*. Dourados: Embrapa CPAO/Embrapa Algodão, p.245-267.

- PENG, D.; CHAI, L.; WANG, F.; ZHANG, F.; RUAN, L.; SUN, M. 2011. Synergistic activity between *Bacillus thuringiensis* Cry6Aa and Cry55Aa toxins against *Meloidogyne incognita*. *Microbial Biotechnology*, v.4, p.794-798.
- PERSSON, C.; OLSSON, S.; JANSSON, H.B. 2000. Growth of *Arthrobotrys superba* from a birch wood resource base into soil determined by radioactive tracing. *FEMS Microbiology Ecology*, v.31, n.1, p.47-51.
- PETTIT, T. H.; OLSON, R. J.; FOOS, R.Y.; MARTIN, W.J. 1980. Fungal endophthalmitis following intraocular lens implantation: a surgical epidemic. *Archives of Ophthalmology*, v.98, n.6, p.1025-1039.
- ROMERO, R.S. 2001. Métodos em bacteriologia de plantas. Viçosa: UFV, p.279.
- RUANO, O; CARNEIRO, R.G.; BRITO, J.A.; SILVA, J.F.; JULIATTI, F.C. 1997. Algodão (*Gossypium hirsutum*) – Doenças causadas por nematoides. In: Vale, F.X.R.; Zambolim, L. (Eds). Controle de doenças de plantas – grandes culturas. Viçosa: Departamento de Fitopatologia v.2, p.583-603.
- SASSER, J.N. 1979. Pathogenicity, host ranges and variability in *Meloidogyne* species. In: Lamberti, F.; Taylor, C.E. (Eds): Root-knot nematodes (*Meloidogyne* species): Systematics, biology and control. New York & London: Academic Press, p.257-268.
- SAYRE, R.M.; WERGIN, W.P. 1977. Bacterial parasite of a plant nematode: morphology and ultrastructure. *Journal of Bacteriology*, v.129, n.2, p.1091-1101.
- SHEPHERD, R.L. 1974. 2258441. Registration of Auburn 623 RNR cotton germplasm (Reg.-No. GP 20). *Crop Science*, v.14, n.6, p.911.
- SIDDIQUI, Z.A.; MAHMOOD, I. 1993. Biological control of *Meloidogyne incognita* race 3 and *Macrophomina phaseolina* by *Paecilomyces lilacinus* and *Bacillus subtilis* alone and in combination on chickpea. *Fundamental and Applied Nematology*, v.16, p.215-218.
- SIDDIQUI, Z.A.; MAHMOOD, I. 1999. Role of bacteria in the management of plant-parasitic nematodes: a review. *Bioresource Technology*, v.69, n.2, p.167-179.
- SIDDIQUI, Z. A. 2006. ed. PGPR: biocontrol and biofertilization. No. 631.8 PGP. Dordrecht, the Netherlands: Springer.
- SIKORA, R.A. 1992. Management of the antagonistic potential in agricultural ecosystems for the biological control of plant parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology*, v.30, n.1, p.245-270.
- SILVA, N.M.; FUZATTO, M.G.; KONDO, J.L.; SABINO, J.C.; PETTINELLI JUNIOR, A.; GALLO, P.B. 1997. A adubação nitrogenada e o sintoma de nematoides no algodoeiro. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.21,n.4, p.693-697.

- SINGH, P.; SIDDIQUI, Z.A. 2010. Biocontrol of root-knot nematode *Meloidogyne incognita* by the isolates of *Bacillus* on tomato. Archives of Phytopathology and Plant Protection, v.43, n.6, p.552-561.
- SINGH, S.; PANDEY, R.K.; GOSWAMI, B.K. 2013. Bio-control activity of *Purpureocillium lilacinum* strains in managing root-knot disease of tomato caused by *Meloidogyne incognita*. Biocontrol Science and Technology, v.23, n.12, p.1469-1489.
- STIRLING, G.R. 1991. Biological control of plant parasitic nematodes. Wallingford, Oxfordshire, UK: CAB International. p.282.
- STIRLING, G.R.; WEST, L. M. 1991. Fungal parasites of root-knot nematode eggs from tropical and subtropical regions of Australia. Australasian Plant Pathology, v.20, n.4 p.149-154.
- SUASSUNA, N.D.; CHITARRA, L.G.; ASMUS, G.L.; INOMOTO, M.M. 2006. Manejo de Doenças do Algodoeiro. Campina Grande, PB, Embrapa Algodão, p.1- 24. (Circular Técnica 97).
- SUASSUNA, N.D.; COUTINHO, W.M. 2015. Manejo das principais doenças do algodoeiro no Cerrado brasileiro. In: Freire, E.C. (Ed). Algodão no cerrado do Brasil. 3.<sup>a</sup> ed. Brasília, Associação Brasileira dos Produtores de Algodão ABRAPA. Gráfica e Editora Positiva.
- TAYLOR, D.T.; SASSER, J.N. 1983. Biología, identificación y control de los nematodos de nódulo de la raíz (*Meloidogyne* species). North Carolina State University and USAID p.111.
- TEREFE, M.; TEFERA, T.; SAKHUJA, P.K. 2009. Effect of a formulation of *Bacillus firmus* on root-knot nematode *Meloidogyne incognita* infestation and the growth of tomato plants in the greenhouse and nursery. Journal of Invertebrate Pathology, v.100, n.2, p.94-99.
- TIAN, B.; YANG, J.; ZHANG, K.Q. 2007. Bacteria used in the biological control of plant-parasitic nematodes: populations, mechanisms of action, and future prospects. FEMS Microbiology Ecology, v.61, n.2, p.197-213.
- TUNLID, A., ROSEN, S., NORDBRING-HERTZ, B. 1992. Molecular mechanisms of adhesion in the nematophagous fungus. *Arthrobotrys oligospora*. Journal Mycol Méd, v.2, p. 36-42.
- VAN DER EYCKEN, W.; ALMEIDA, E.J.; INZE, D. VAN MONTAGU, M.; GHEYSEN, G.A. 1996. Molecular study of root-knot nematode-induced feeding sites. Plant Journal, v.9, n.1, p.45-54.
- WEERT, S.; BLOEMBERG, G.V. 2007. Rhizosphere competence and the role of root colonization in biocontrol. Plant-associated bacteria. Springer, Dordrecht, p.317-333.
- WELLER, D.M. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. Annual Review of Phytopathology, v.26, n.1, p.379-407.

- WIGGERS, R.J.; STARR, J.L.; PRICE, H.J. 1990. DNA content and variation in chromosome number in plant cells affected by *Meloidogyne incognita* and *M. arenaria*. *Phytopathology*, v.80, n.12, p.1391-1395.
- WILLIAMSON, V.M.; GLEASON, C.A. 2003. Plant–nematode interactions. *Current Opinion in Plant Biology* v.6, p.1–7.
- XIANG, N.; LAWRENCE, K.; KLOEPPER, J.W.; DONALD, P.A.; MCINROY, J.A. 2017. Biological control of *Meloidogyne incognita* by spore-forming plant growth-promoting rhizobacteria on cotton. *Plant Disease*, v.101, p.774-784.
- XIAO, L.; WAN, J.W.; YAO, J.H.; FENG, H.; WEI, L.H. 2018. Effects of *Bacillus cereus* strain Jdm1 on *Meloidogyne incognita* and the bacterial community in tomato rhizosphere soil. *Biotech*, v.8, n.8, p.319.
- XIONG, J.; ZHOU, Q.; LUO, H.; XIA, L.; LI, L.; SUN, M.; YU, Z. 2015. Systemic nematicidal activity and biocontrol efficacy of *Bacillus firmus* against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v.31, n.4, p.661-667.
- ZUCKERMAN, B.M.; DICKLOW, M.B.; ACOSTA, N. 1993. A strain of *Bacillus thuringiensis* for the control of plant-parasitic nematodes. *Biocontrol Sci. Technol.*, v.3, p.41–46.