



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

JÔNATAS BARROS DOS SANTOS

**SELEÇÃO DE ESTIRPES DE *Bacillus* spp. TÓXICAS A *Meloidogyne*
spp. E PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM AGRONOMIA

Brasília-DF

2018



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

**SELEÇÃO DE ESTIRPES DE *Bacillus* spp. TÓXICAS A *Meloidogyne*
spp. E PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL**

JÔNATAS BARROS DOS SANTOS

ORIENTADORA: ROSE GOMES MONNERAT

PUBLICAÇÃO: 146/2018

Brasília-DF

2018



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

**SELEÇÃO DE ESTIRPES DE *Bacillus* spp. TÓXICAS A *Meloidogyne*
spp. E PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL**

JÔNATAS BARROS DOS SANTOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE/DOCTOR EM AGRONOMIA.

APROVADA POR:

ROSE GOMES MONNERAT, PhD. Microbiologia/FAV-UnB/ (Orientadora). CPF: 002.094.438-12, email-lucreciaunb@gmail.com

CRISTINA SCHEITINO BASTOS, D.Sc. Fitotecnia-Entomologia/FAV-UnB/ (Membro interno). CPF: 007.369.144-91, e-mail: cschetino@unb.br

LUIZ EDUARDO BASSAY BLUM, PhD. Fitopatologia/FAV-UnB/ (Membro interno) CPF: 333.965.071-34, e-mail: luizblum@unb.br

BRASÍLIA/DF, 15 de Maio de 2018.

FICHA CATALOGRÁFICA

SANTOS, Jônatas Barros dos

Seleção de estirpes de *Bacillus* spp. tóxicas a *Meloidogyne* spp. e promotoras de crescimento vegetal / Orientação: Rose Gomes Monnerat – Brasília, 2018. 121 p. : il.

Dissertação de Mestrado (M) – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2018.

1. Controle biológico. 2. Nematoides. 3. Tomate. 4. Promoção de crescimento.

I. Monnerat, R. G. II. Seleção de estirpes de *Bacillus* spp. tóxicas a *Meloidogyne* spp. E promotoras de crescimento vegetal.

CDD ou CDU
Agris / FAO

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

SANTOS, J. B. SELEÇÃO DE ESTIRPES DE *Bacillus* spp. TÓXICAS A *Meloidogyne* spp. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2018, 121 p. Dissertação de Mestrado.

CESSÃO DE DIREITOS

NOME DO AUTOR: JÔNATAS BARROS DOS SANTOS

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: SELEÇÃO DE ESTIRPES DE *Bacillus* spp. TÓXICAS A *Meloidogyne* spp.

GRAU: Mestre **ANO:** 2018

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta dissertação de mestrado para única e exclusivamente propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citada à fonte.

Nome: JÔNATAS BARROS DOS SANTOS

CPF: 026.830.805-57

Endereço. STN, LOTE K, ED. MONTREAL. BLOCO II. AP. 111, ASA NORTE, DF, BRASIL

Tel. (61) 982733168 E-mail: jonatas.bsantos@hotmail.com

DEDICO

À Deus, por ser essencial em minha vida, meu guia, socorro presente na hora da angústia, por ter me concedido as forças necessárias, a perseverança e a fé para realização e concretização deste trabalho, ao meu pai Wilson, a minha mãe Terezinha (“In Memoriam”) e ao meu irmão Rodrigo.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, agradeço a Deus, por me conceder o dom da vida e por guiar meus passos durante minha caminhada.

À minha família: meus pais Vilson e Terezinha, pelo amor dedicado a nós e por mostrar que a família é a base de tudo; ao meu irmão Rodrigo, por estar sempre ao meu lado.

À outra parte da minha família, tios, avós, primos e parentes e também aos irmãos de coração, que mesmo longe me apoiaram e incentivaram os meus sonhos.

À minha namorada Morgana pelo amor, carinho, paciência e companheirismo.

À minha orientadora, Dra. Rose Gomes Monnerat, por ter acreditado em mim, pela orientação, dedicação, convivência, ensinamentos e pela honra de fazer parte de sua equipe de pesquisa.

À toda a equipe da Embrapa Recursos Genéticos, Dra. Barbara Eckstein, Dra. Lilian Praça, Dra. Érica, Dr. Paulo e Dr. Marcelo pela amizade, paciência e contribuições nos trabalhos.

Ao funcionário José Alves (Zezinho) pela amizade e todo apoio prestado; a todos os estagiários que contribuíram para a realização desse trabalho: Bruno, Ivan, Vinicius, Hermerson e Melina.

Aos que estão ou estiveram na equipe LBE e PCPI durante a realização deste trabalho: Helinho, Isabela, Sandro, Marcelo Castro, Flávia, Raul, Fernanda, Marina, Jório, Marcel, Ester, aos que já seguiram os seus caminhos acadêmicos ou profissionais, mas que durante sua estada sempre proporcionaram momentos de descontração e amizade.

À, Ana Carolina pela amizade, por toda ajuda e ensinamentos da Biomol.

Ao funcionário Luís Palhares por toda ajuda no suporte estatístico, dedicação e paciência.

A todos os meus amigos que torceram e contribuíram para que eu concluísse com êxito esse desafio. Em especial aos meus amigos Alberto Silva, Jhonatan Mickael, Lincon, Ricardo, Amom, Ahmad, André.

À Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília e aos seus professores, coordenadores e funcionários, pelas oportunidades e ensinamentos passados.

À Embrapa Recursos Genéticos por disponibilizar a estrutura necessária para a realização desse trabalho.

À Capes pela concessão da bolsa de estudos.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente ajudaram no desenvolvimento e finalização deste trabalho.

Meu muito obrigado a todos!

“Porque o Senhor dá a sabedoria, e da Sua boca vem à inteligência e o conhecimento.”

Provérbios 2:6

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	1
GENERAL ABSTRACT	2
1. INTRODUÇÃO GERAL	3
2. JUSTIFICATIVA	6
2.1 Hipóteses	6
2.2 Objetivo geral	6
2.3 Objetivos específicos	6
3. REVISÃO DE LITERATURA	8
3.1 Cultura do Tomate	8
3.2 Pragas da cultura do Tomate	9
3.3 O gênero <i>Meloidogyne</i>	10
3.4 O Gênero <i>Bacillus</i>	17
3.4.1. Grupo do <i>B. cereus</i>	18
3.4.2 Grupo do <i>B. subtilis</i>	19
3.4.3 Ciclo de vida e esporulação.	19
3.4.4 Habitat	21
3.4.5 Potenciais Patogênicos e Importância Tecnológica	22
3.4.6 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	24
3.4.7 <i>Bacillus licheniformis</i>	28
3.4.8 <i>Bacillus subtilis</i>	29
3.4.9 <i>Bacillus thuringiensis</i>	33
3.4.9.1 Atividade Nematicida de <i>Bacillus thuringiensis</i>	35
3.5 Bactérias promotoras de crescimento vegetal	38
3.5.1 Produção de Sideróforos	39

3.5.2	Produção de Fitohormônios	40
3.5.3	Solubilização de fosfato.....	41
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1	Microrganismos	41
4.1.1	Estirpes de <i>Bacillus thuringiensis</i>	41
4.1.2	Demais estirpes de <i>Bacillus</i>	42
4.2	Produto Químico.....	42
4.3	Material Vegetal.....	43
4.4	Nematoide (<i>Meloidogyne incognita</i> e <i>M. javanica</i>).....	43
4.5	Efeito de estirpes de <i>Bacillus</i> na mortalidade de <i>M. incognita</i>	43
4.5.1	Preparo das estirpes de <i>B. thuringiensis</i>	43
4.5.2	Preparo dos nematoides - Obtenção e desinfecção de ovos e juvenis do segundo estágio (J2) de <i>M. incognita</i>	43
4.5.3	Ensaio de patogenicidade <i>in vitro</i>	44
4.5.4	Determinação do efeito de resorcinol a <i>M. incognita</i>	44
4.5.5	Ensaio de patogenicidade de <i>Bacillus</i> spp. a <i>M. incognita</i> em plantas de tomate	45
4.6	Ensaio de promoção de crescimento no estágio vegetativo de plantas de tomate após inoculação por isolados de <i>Bacillus</i> spp.	48
4.7	Detecção da presença de genes relacionados a promoção de crescimento de plantas em estirpes de <i>Bacillus</i> spp.	49
4.8	Seleção molecular de estirpes de <i>B. thuringiensis</i> tóxicas a <i>M. incognita</i>	51
4.9	Análise estatística.....	52
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54

5.1 Efeito de estirpes de <i>B. thuringiensis</i> na mortalidade de <i>M. incognita in vitro</i>	54
5.1.1 Padronização da dose não tóxica de resorcinol e validação do produto	54
5.1.2 Ensaios de patogenicidade de <i>M. incognita</i> com o uso de estirpes de <i>B. thuringiensis</i> associados ou não com Resorcinol.	55
5.1.3 Ensaio de patogenicidade de <i>Bacillus</i> spp. a <i>Meloidogyne</i> spp. em plantas de tomate	58
5.1.3.1 Fator de reprodução e número de ovos por grama de raiz	58
5.1.3.2 Massa fresca da raiz	63
5.1.3.3 Índice de galhas e índice de massas de ovos	64
5.2 Ensaio de promoção de crescimento	69
5.2.1 Massa fresca e saca da raiz	71
5.3 Detecção de genes de produção de crescimento	73
5.4 Seleção molecular de estirpes de <i>B. thuringiensis</i> tóxicas a <i>M. incognita</i>	75
6. CONCLUSÕES	77
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	78
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 01: Produtos utilizados no experimento com seus respectivos fabricantes, princípios ativos, concentração e dosagens recomendadas pelos fabricantes.	42
Tabela 02. Escala de massa de ovos (Hadisoeganda e Nasser, 1981).....	47
Tabela 03. Característica dos iniciadores utilizados para detecção dos genes <i>fosfatase ácida</i> (metabolismo de solubilização de fosfato); <i>sideróforos</i> (capacidade de produzir complexos com ferro) e <i>iam1</i> , <i>iam2</i> e <i>ipdC</i> (produção de ácido indol-acético) em estirpes de <i>B. thuringiensis</i>	50
Tabela 04. Características do iniciador utilizado para a detecção do gene Cry6 em estirpes de <i>B. thuringiensis</i>	51
Tabela 05. Taxa de mortalidade de <i>M. incognita</i> a estirpe tóxica de <i>B. thuringiensis</i> quando associada ou não ao resorcinol.....	55
Tabela 06. Resultados de mortalidade (%) de <i>M. incognita</i> em função das estirpes testadas na presença ou não de resorcinol	56
Tabela 07. Dados do fator de reprodução para <i>M. incognita</i> e <i>M. javanica</i> aos 45 dias.....	58
Tabela 08. Dados número de ovos por grama de raiz para <i>M. incognita</i> e <i>M. javanica</i> aos 45 dias.....	59
Tabela 09. Massa fresca da raiz (g) de plantas de tomate infestadas com as espécies <i>M. incognita</i> ou <i>M. javanica</i> e submetidas a diferentes tratamentos	63
Tabela 10. Valores da escala de Hadisoeganda e Nasser (1981) aplicadas ao número de galhas para <i>M. incognita</i> e <i>M. javanica</i> em função dos tratamentos.....	65
Tabela 11. Distribuição de frequência de ocorrência de escala 5 de número de galhas por tratamento independente da espécie de nematoide avaliada.	66
Tabela 12. Valores da escala de Hadisoeganda e Nasser (1981) aplicadas ao número de massa de ovos para <i>M. incognita</i> e <i>M. javanica</i> em função dos tratamentos.....	67

Tabela 13. Distribuição de frequência de ocorrência de escala 5 de massa de ovos por tratamento independente da espécie de nematoide avaliada.	68
Tabela 14. Efeito dos tratamentos sobre a altura de plantas de tomate nas diferentes avaliações.....	69
Tabela 15. Valores de massa fresca e massa seca de raiz de tomateiro.	71
Tabela 16. Caracterização molecular das estirpes de <i>Bacillus</i> para a presença dos genes de promoção de crescimento vegetal.....	73
Tabela 17. Resultado das estirpes avaliadas para presença do gene <i>cry6</i>	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo do nematoide-das-galhas (<i>Meloidogyne</i> sp.).....	11
Figura 2: Estrutura química de Fluensulfone	15
Figura 3: Precipitação pluviométrica e temperaturas máximas e mínimas ocorridas em Brasília nos meses de agosto a outubro de 2017	46
Figura 4: Precipitação pluviométrica e temperaturas máximas e mínimas ocorridas em Brasília nos meses de novembro de 2017 a janeiro de 2018.....	48
Figura 5: Mortalidade média de <i>M. incognita</i> em três ensaios quando submetidos a diferentes concentrações de resorcinol. Linha Pontilhada indica o percentual máximo de 15% de mortalidade	54
Figura 6: Distribuição de frequência para a variável resposta índice de galhas observada aos 45 dias para as espécies <i>M. incognita</i> e <i>M. javanica</i>	66
Figura 7: Distribuição de frequência para a variável resposta índice de massa de ovos observada aos 45 dias para as espécies <i>M. incognita</i> e <i>M. javanica</i>	67

RESUMO GERAL

A cultura do tomate (*Solanum lycopersicum* L.) é uma das principais olerícolas cultivadas no Brasil, ficando atrás somente da batata. Os nematoides do gênero *Meloidogyne* são um dos principais problemas para esta cultura, principalmente por terem mais de 2000 plantas hospedeiras, grande persistência no solo e a limitada capacidade de serem identificados com precisão, dificultando a adoção de medidas de controle cultural e genética e levando à utilização de produtos químicos altamente tóxicos ao homem, aos animais e ao solo. O controle biológico tem ganhado espaço nos últimos anos, principalmente *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) que é uma bactéria que pode expressar diversas proteínas durante seus estágios de crescimento, podendo atuar como importante agente de controle biológico, além de promover o crescimento das plantas. O objetivo deste trabalho foi selecionar estirpes de *Bt* tóxicas a *M. incognita in vitro*, para posteriormente testá-las em casa de vegetação e também verificar o seu potencial como promotoras de crescimento. Foram avaliadas 16 estirpes *in vitro* na presença ou não do produto resorcinol e proporcionaram uma mortalidade de *M. incognita* variando de 3,0 a 38,5% em condições *in vitro*. Selecionaram-se 2 estirpes para os testes em casa de vegetação (1930 e 906), também foram testados 2 produtos biológicos a base de *Bacillus*, Nemix e NemaControl, além disso, foi testado também um produto químico, Nimitz (Fluensulfone) em 2 formas de aplicação. Para isso, foi instalado um ensaio em delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições por tratamento e uma planta por vaso. Foram inoculados 6 mil ovos por planta e 45 dias após a inoculação das plantas de tomate as seguintes variáveis foram avaliadas: massa fresca de raiz (g), índice de galhas, índice de massa de ovos e o fator de reprodução (FR). Um novo ensaio com os mesmos tratamentos foi montado para verificar a eficiência na promoção de crescimento vegetal dos isolados testados e a influência do tratamento químico no crescimento das plantas. Foi feita ainda a detecção de genes de promoção de crescimento nas estirpes testadas em casa de vegetação e também detecção do gene *cry6* em 48 isolados bacterianos. Nenhum tratamento biológico foi eficiente em reduzir a reprodução do nematoide. Apenas o tratamento químico mostrou-se eficiente em seu controle inicial. Quando se avaliou o crescimento vegetativo das plantas, a estirpe 1930 foi a única manteve diferença estatística dos demais tratamentos até os 30 dias após o transplante. Detectou-se genes de promoção de crescimento nos isolados testados. Apenas uma estirpe das 48 avaliadas demonstrou a presença do gene *cry6*.

Palavras-chave: controle biológico, nematoides, tomate, promoção de crescimento.

ABSTRACT GENERAL

The tomato culture (*Solanum lycopersicum* L.) is one of the main olerícolas cultivated in Brazil, being behind only the potato. The nematodes of the genus *Meloidogyne* are one of the main problems for this crop, mainly because they have more than 2000 host plants, great persistence in the soil and the limited capacity to be identified with precision, making difficult the adoption of measures of cultural and genetic control and leading to the use of highly toxic chemicals to man, animals and soil. *Bacillus thuringiensis* (Bt) is a bacterium that can express several proteins during its growth stages, being able to act as an important biological control agent, besides promoting the growth of plants. The objective of this work was to select strains of Bt toxic to *M. incognita in vitro*, to later test them in a greenhouse and to verify their potential as growth promoters. 16 strains were evaluated in vitro in the presence or absence of the resorcinol product and provided a mortality of *M. incognita* ranging from 3.0 to 38.5% under in vitro conditions. Two strains were selected for greenhouse tests (1930 and 906), two biological products based on Bacillus, Nemix and NemaControl were also tested. A chemical product, Nimitz (Fluensulfone), was also tested in 2 forms of application. For this, a completely randomized design with five replicates per treatment and one plant per pot was installed. The following variables were evaluated: fresh root mass (g), gall index, egg mass index and reproduction factor (RF). A new assay with the same treatments was set up to verify the efficiency in promoting plant growth of the tested isolates and the influence of chemical treatment on plant growth. Further detection of growth promoting genes in the greenhouse tested strains and detection of the cry6 gene in 48 bacterial isolates were also performed. No biological treatment was effective in reducing nematode reproduction. Only the chemical treatment proved to be efficient in its initial control. When the vegetative growth of the plants was evaluated, the 1930 strain was the only statistically significant difference of the other treatments until the 30 days after the transplant. Growth promoting genes were detected in the isolates tested. Only one strain of the 48 evaluated showed the presence of the cry6 gene.

Key words: biological control, nematodes, tomato, growth promotion.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Segundo a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), a produção brasileira de tomate em 2016 ficou em 4,16 milhões toneladas do fruto e área colhida foi de 64 mil hectares. O Brasil ocupa a décima colocação na lista de países produtores. É uma das principais olerícolas produzidas de valor econômico no mundo, sendo a segunda solanácea mais cultivada, sendo superada apenas pela batata (ABREU, 2006).

A produção de tomate nacional, mesmo que situe o Brasil entre os dez maiores produtores do mundo representa ainda uma proporção bem reduzida em relação ao total mundial, sendo de apenas 3% (FAO, 2013). A ampliação do mercado consumidor está ligada à diversificação dos subprodutos da cadeia produtiva de tomate o que repercutirá na intensificação da produção, resultando em um maior patamar de produtividade nacional e no grande volume de produção. A perspectiva é que a produção de tomate continue a crescer devido à urbanização e à participação da mulher no mercado de trabalho e por outros aspectos conjunturais, incluindo o aumento do consumo e do poder aquisitivo das famílias (DIEESE, 2010). Apesar da perspectiva de crescimento, não se pode deixar de mencionar os entraves que existem nesse caminho, como a grande susceptibilidade da cultura a pragas, principalmente em cultivo protegido onde a temperatura e os cultivos sucessivos proporcionam aumento do seu inóculo inicial.

Os nematoides são patógenos importantes de diversas culturas entre elas o tomate, principalmente os formadores de galhas pertencentes ao gênero *Meloidogyne*. As perdas devidas ao ataque de nematoides na agricultura mundial são estimadas em aproximadamente US\$ 80 bilhões/ano (AGRIOS, 1997). A quantificação de perdas no Brasil não é precisa, devido principalmente às interações com danos provocados por pragas e outras doenças, condições climáticas adversas, presença de plantas invasoras e inadequação de tratos culturais (RITZINGER; FANCELLI, 2006). Além dos danos diretos, muito se estudou sobre o efeito da interação de *Meloidogyne* e a murcha de Fusário, causada por *Fusarium oxysporum* e que é uma das principais doenças do tomateiro, onde o parasitismo do nematoide atua como fator de predisposição ao fungo (MOURA et al., 2001).

Os danos causados pelo ataque de *Meloidogyne* ao tomateiro vão desde distúrbios no sistema radicular até a morte da planta ou a baixa quantidade e qualidade dos frutos. O controle químico vem sendo o método de controle mais utilizado, porém, sem apresentar resultados significativos de controle e ainda sendo tóxico ao meio ambiente e à saúde humana. Os produtos químicos atualmente disponíveis, do grupo dos organofosforados e dos carbamatos,

têm um nível inaceitável de toxicidade para organismos não-alvo e estão sendo retirados do mercado (OKA et al. 2014).

O controle biológico de pragas tem sido muito estudado nos últimos anos. Trabalhos utilizando principalmente de fungos e bactérias têm sido realizados na busca de estirpes que possam interromper de algum modo alguma das fases do ciclo de vida do nematoide, levando a redução da sua população e/ou à melhoria das condições da planta. O controle biológico de pragas é frequentemente considerado como uma estratégia ambientalmente amigável, sendo uma alternativa para a redução no uso de produtos químicos na agricultura, onde a ideia principal é utilizar um ou mais organismos vivos que podem ter efeitos antagonistas contra um patógeno de planta alcançando a supressão da doença (BAKER; COOK, 1982).

Um dos grupos mais estudados desses microrganismos são as rizobactérias promotoras de crescimento de plantas. Esses microrganismos são capazes de colonizar a superfície da raiz ou a rizosfera, camada de interação entre o solo e a raiz (BRAND et al. 2010). Alguns destes podem ainda se estabelecer internamente nos tecidos da raiz e se disseminar para as demais áreas da planta, tais como, caule, folhas, tubérculos e demais órgãos, sem prejudicar a sua sanidade. Estes microrganismos que formam associações íntimas com a planta hospedeira são chamados de endofíticos. Apesar dos diferentes nichos ecológicos, os mecanismos de controle biológico são os mesmos, e incluem, a competição por substrato, produção de aleloquímicos inibitórios, e indução de resistência sistêmica em plantas hospedeiras para um amplo espectro de patógenos e ainda o suporte a estresses abióticos, tais como seca ou salinidade (HAAS et al., 2000; BLOEMBERG, LUGTENBERG 2001; RYU et al., 2005).

O primeiro passo no controle biológico é a seleção de microrganismos a partir do meio ambiente, tais como o solo, plantas, insetos, e, em seguida, a realização de testes para verificação do seu efeito antagonista, identificação dos mecanismos de ação presentes e também verificação dos efeitos da combinação com outras estirpes, buscando um espectro mais amplo de ação dos microrganismos contra o patógeno. Da mesma forma, a biotecnologia pode ser aplicada para melhorar ainda mais as estirpes que possuem características desejáveis, de tal forma a facilitar a formulação, a estabilidade, ou a colonização primária da planta, ou criação de estirpes transgênicas que combinem os diversos mecanismos de ação (TIMMS-WILSON et al., 2000; HUANG et al., 2004; KILIC-EKICI, YUEN, 2004).

Microrganismos esporulantes, tais como *Bacillus* spp., são resistentes ao calor e a dessecação, possuindo facilidade para formulação e armazenagem dos produtos. Bravo et al.

(1998) afirmam que o isolamento, a identificação de estirpes de *B. thuringiensis* e o sequenciamento de novos genes devem ser incentivados, podendo ser o primeiro passo na busca de se encontrar estirpes tóxicas para praga-alvos evidenciando o potencial das bactérias esporulantes como agentes de controle biológico e ainda que estas novas estirpes são candidatas a abrigarem novos genes *cry*.

Nesse contexto, a pesquisa buscou identificar estirpes da Coleção de Bactérias de Invertebrados da EMBRAPA que sejam capazes de controlar o nematoide *Meloidogyne incognita* e que proporcionem melhorias nos atributos de desenvolvimento das plantas para que, um dia, possam ser utilizadas pelos produtores como alternativa ao controle químico no sistema de produção.

2. JUSTIFICATIVA

Nematoides são um problema crescente no país e que limitam a capacidade de produção das culturas assim como os demais patógenos de solo. *M. incognita* possui mais de 2000 culturas hospedeiras atualmente, o que demonstra o quão importante para a agricultura mundial estas pragas são e também representam uma ameaça à segurança alimentar.

Novas formas de controle de nematoides têm sido testadas em substituição aos produtos químicos que são uma grande ameaça ao meio ambiente e a sociedade em razão da sua alta toxicidade e longo efeito residual que possuem, podendo contaminar a água e o solo. Além disso, o seu controle não deve estar baseado apenas ao uso de uma única forma de controle, como tem sido feito, mas sim se basear na associação entre as estratégias de controle, como por exemplo, a rotação de culturas, a adubação verde, o controle químico, cultural e o biológico.

Diversos microrganismos citados na literatura já demonstraram efeitos nematicidas principalmente em ensaios *in vitro* e em casa de vegetação. Dessa forma, a busca por estirpes de *Bacillus* oriundas do banco *Bacillus* da EMBRAPA e que possuam as características de biocontrole serviriam para um manejo mais sustentável dessa praga, sendo incorporada ao manejo integrado de pragas e doenças das lavouras.

2.1 Hipóteses

Existem estirpes de *Bacillus thuringiensis* tóxicas ao nematoide *Meloidogyne* spp. e que atuam como promotoras de crescimento em plantas de tomate.

Na coleção existente na EMBRAPA podem haver estirpes que proporcionem a colonização da rizosfera ou a planta como um todo, de forma endofítica, e ao mesmo tempo, através da produção de metabolitos ou proteínas possibilitariam o controle dos nematoides e ainda promovam o crescimento vegetal de plantas de tomate.

2.2 Objetivo geral

Obter estirpes de *Bacillus* tóxicas a *Meloidogyne incognita* e a *Meloidogyne javanica* e avaliar o efeito destas estirpes como promotoras de crescimento em plantas de tomate.

2.3 Objetivos específicos

- Padronizar e estabelecer uma metodologia de bioensaios de *B. thuringiensis* com *M. incognita*.

- Selecionar estirpes de *Bt* tóxicas a *M. incognita* em laboratório e em casa de vegetação.
- Selecionar estirpes de *Bt* tóxicas a *M. javanica* em casa de vegetação.
- Selecionar estirpes de *Bt* que promovam crescimento vegetativo.
- Caracterizar estirpes candidatas ao controle de *M. incognita* e que promovam o crescimento de plantas de tomate.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 A cultura do tomate

O tomateiro *Solanum lycopersicum* L. sinon. *Lycopersicon esculentum* Mill. pertence à família botânica Solanaceae é uma espécie de origem andina. Atualmente, é uma das principais olerícolas de valor econômico no mundo, sendo a segunda solanácea mais cultivada, superada apenas pela batata (ABREU, 2006).

É uma planta herbácea, com folhas pecioladas, compostas e com número ímpar de folíolos, caule flexível e inúmeras brotações laterais (FILGUEIRA, 2000). Possui o hábito de crescimento indeterminado, porém, algumas cultivares apresentam crescimento determinado; são autógamas, apresentando baixa porcentagem de polinização cruzada, que ocorre por meio de insetos polinizadores (GIORDANO; SILVA, 2000). Seus frutos são classificados como: Cereja, Industrial Salada, Saladinha e Santa Cruz (GONÇALVES, 2014).

O tomate de mesa ou para consumo in natura é produzido em praticamente todas as regiões geográficas do Brasil, em épocas distintas e sob diferentes sistemas de cultivo e níveis de manejo cultural. Em 2016, a safra mundial de tomate de mesa e indústria totalizou 177 milhões de toneladas em área cultivada de 4,78 milhões de hectares e produtividade média de 37 t. ha⁻¹ (FAO/STAT, 2017). O maior produtor mundial foi a China, com 56,4 milhões de toneladas em 1 milhão de hectares e produtividade de 56,0 t. ha⁻¹. O Brasil produziu 4,16 milhões de toneladas, em quase 64 mil hectares e produtividade de 65,13 t. ha⁻¹, colocando-se em 10º lugar na escala mundial (MATOS et al., 2012; FAO/STAT, 2017).

A região centro-oeste é a maior produtora de tomate para a indústria, pois apresenta clima seco durante os meses de março a setembro, o que favorece seu cultivo. Os solos profundos, bem drenados e a topografia plana facilitam a mecanização e permitem o uso de grandes sistemas de irrigação (SILVA, 2003). O estado de Goiás é o maior produtor, seguido de São Paulo, Minas Gerais e Bahia que juntos correspondem a 71,5% da produção nacional. (SEAPA/MG, 2017).

Um fator importante para o desenvolvimento da cultura seja no crescimento, na produção ou na qualidade de fruto, é o manejo fitossanitário (FELTRIN et al., 2005). O tomateiro é uma das culturas mais difíceis de ser conduzida em condições de campo, pois é afetada por diversos insetos, ácaros e doenças (MINAMI; HAAG, 1989; LATORRE et al., 1990), sendo considerada uma das culturas mais suscetíveis aos nematoides formadores de galhas, principalmente em

cultivo protegido, onde o aumento de temperatura e os cultivos sucessivos proporcionam o aumento mais rápido dos níveis populacionais de *Meloidogyne* spp. (CARNEIRO; MORAES, 1993).

3.2 Pragas da Cultura do Tomate

Diversas espécies de insetos atacam o tomateiro e os danos variam conforme a intensidade do ataque. Algumas delas danificam os frutos, a ponto de inutilizá-los para venda, outras são transmissoras de viroses. As principais pragas são citadas a seguir (SILVA et al. 2003): traçadotomateiro (*Tuta absoluta*), mosca branca (*Bemisia tabaci*), ácaros (*Aculops lycopersici*), larva minadora (*Liriomyza huidobrensis*, *L. trifolii*, *L. sativae*), tripes (*Frankliniella* spp. e *Thrips* spp.), pulgões (*Myzus persicae* e *Macrosiphum euphorbiae*), lagarta-rosca (*Agrotis* spp), broca grande (*Helicoverpa zea*), broca pequena (*Neoleucinodes elegantalis*), lagarta-militar (*Spodoptera frugiperda*), e os nematoides (*Meloidogyne* spp.).

Os maiores problemas com nematoides nessa cultura estão relacionados ao gênero *Meloidogyne* (GONÇALVES, 2014). No Brasil, *M. arenaria*, *M. hapla*, *M. javanica* e *M. incognita* (raças 1 a 4) são os predominantes (MAQBOOL et al., 1988). Alvarenga (2004), menciona que plantas de tomateiros, quando atacadas severamente por *Meloidogyne* spp., apresentam o sistema radicular completamente desorganizado, com poucas raízes funcionais, podendo levar à morte de mudas no campo, quando ocorrem no início do cultivo. E ainda, nas plantas sobreviventes a produção é fortemente afetada em quantidade e qualidade dos frutos. Whitehead (1998) relata sintomas como murchamento das folhas, atrofia no crescimento e queda na produção. Oliveira (2007) também relata que os danos podem ser expressos pela redução de produção ou então pela depreciação da qualidade do produto a ser comercializado. Estudos recentes, em Punjab, no Paquistão, mostraram que *M. incognita* pode causar danos de até 40% na cultura do tomate (ANWAR; MCKENRY, 2012). Foi observado que esse nematoide se desenvolve e se reproduz facilmente em tomateiro tanto sob condições de campo como em casa de vegetação, podendo ainda se reproduzir em muitos cultivares comerciais de tomate (KAMRAN et al., 2010).

3.3 O Gênero *Meloidogyne*

Pertencente à família Meloidogynidae congrega os chamados nematoides de galhas. São conhecidos relatos de plantas com sintomas de parasitismo por nematoides desse grupo na Europa desde 1855, sendo este gênero criado apenas em 1887, no Brasil, com a descrição da espécie-tipo, *Meloidogyne exigua* Goeldi, encontrada em muitos cafezais do Rio de Janeiro (FERRAZ; MONTEIRO, 1995).

Os nematoides formadores de galhas pertencentes ao gênero *Meloidogyne* Goeldi, 1887, constituem o grupo de fitoparasitas mais importantes no mundo, com mais de 90 espécies descritas (KARSSSEN; MOENS 2006) e mais de 2000 plantas hospedeiras, representando ameaça à produção agrícola mundial (PERRY et al., 2009).

Quatro espécies são consideradas as mais importantes, pela ampla distribuição geográfica e o alto grau de polifagia, a saber: *M. arenaria* (Neal) Chitwood, *M. incognita* (Kofoid e White) Chitwood, *M. javanica* (Treub) Chitwood e *M. hapla* Chitwood (ALVES; CAMPOS, 2001). Recentemente, técnicas de eletroforese e biomoleculares passaram a ser utilizadas na identificação das espécies de *Meloidogyne*, apresentando grande utilidade e eficiência (CARNEIRO; COFCEWICZ, 2008).

3.3.1 Ciclo de Vida/ Relação parasita-hospedeiro

Cada fêmea de *Meloidogyne*, de corpo globoso e região anterior formando “pescoço”, deposita todos os ovos em um único local da raiz, originando típico aglomerado ou massa. Os ovos mantêm-se unidos devido à presença gelatinosa secretada pelas glândulas retais da fêmea, que flui através do ânus durante o período de oviposição. As massas podem conter de 400 a 500 ovos (FERRAZ; MONTEIRO 2011).

No interior dos ovos, encontram-se juvenis de 1º estágio (J1), que logo sofrem a primeira ecdise, originando juvenis de 2º estágio (J2). Após a eclosão, esses juvenis, vermiformes e móveis, denominados pré-parasitas ou infestantes, passam a migrar no solo à procura de raízes de um hospedeiro favorável, guiadas por exsudatos radiculares liberados pelas raízes (Figura 01) (FERRAZ; MONTEIRO 2011).

Uma vez na superfície das raízes, os J2 munidos de um arsenal enzimático composto principalmente por enzimas degradadoras de parede celular, penetram nas raízes migrando intercelularmente em direção ao cilindro vascular, onde estabelecem o seu sítio de alimentação com a formação de células gigantes (TAYLOR; SASSER 1983).

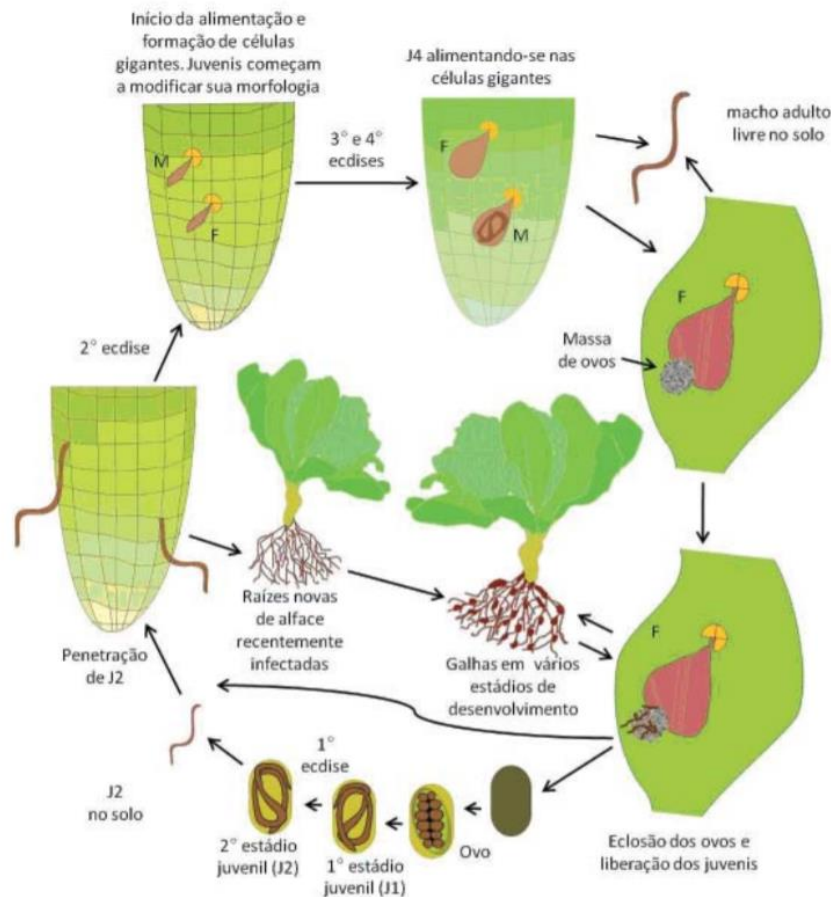


Figura 1: Ciclo do nematoide-das-galhas (*Meloidogyne* sp.). Fonte: Pinheiro et al. 2010.

No sítio de alimentação, o nematoide passa pela segunda ($J2 > J3$), terceira ($J3 > J4$) e quarta ($J4 > \text{fêmea jovem}$) ecdises (EISENBACK; TRIANTAPHYLLOU, 1991). Quando a fêmea jovem é formada, inicia-se a fase sedentária do nematoide, a qual durará até o final de seu ciclo de vida com o amadurecimento da fêmea, formação e liberação de ovos.

Nas principais espécies, como *M. incognita* e *M. javanica*, de reprodução por partenogênese mitótica obrigatória, as populações são constituídas basicamente por fêmeas, aparecendo machos apenas sob condições ambientais especiais. As fêmeas sexualmente maduras são globosas, branco-leitosas e providas de “pescoço” anterior. São visíveis a olho nu, quando retiradas do interior de raízes parasitadas. São endoparasitas, sedentárias (FERRAZ; BROWN 2002). Os machos quando presentes tem o corpo vermiforme, alongado e desprovido

de bolsa-cópula. Resultante de complexa metamorfose do último estágio juvenil, e segundo certos autores, não são fitoparasitas (PINHEIRO, 2014). Sob condições de estresse, juvenis femininos muitas vezes sofrem reversão sexual e acabam por dar formação a machos.

A duração do ciclo biológico é muito influenciada por fatores como temperatura, umidade e planta hospedeira, entre outros. De modo geral, completa-se em 3 a 4 semanas. Para *M. arenaria*, *M. incognita*, e *M. javanica*, a faixa ideal de temperatura é de 25 a 30 ° C, enquanto que para *M. hapla* vai de 15 a 25 ° C (TAYLOR; SASSER, 1978).

3.3.2 Disseminação do Patógeno

Os nematoides são organismos que, pelos seus próprios recursos, muito pouco se disseminam. No caso do gênero *Meloidogyne*, essa disseminação se faz pelos juvenis, os quais caminham pelo solo, em busca de plantas hospedeiras. TAYLOR; McBETH (1941) verificaram que tais juvenis podem se movimentar no solo, em linha reta, apenas cerca de um centímetro por dia, ou trinta centímetros por mês, confirmando a precária expansão do nematoide, quando não há a intervenção de um agente qualquer.

A disseminação de *Meloidogyne* dá-se através de agentes, dos quais o mais importante é o próprio agricultor. Realmente, certos agricultores, quer por desconhecerem o problema, quer por outros motivos, tornam-se, com frequência, grandes disseminadores (FERRAZ; MONTEIRO 2011).

A principal forma de disseminação é a passiva, dada pela movimentação do solo, água, implementos agrícolas contaminados, homem e animais nas áreas de cultivo e, principalmente, por mudas de plantas contaminadas. Esta última é responsável pela contaminação de áreas a longas distâncias (PINHEIRO et al. 2012).

Quanto ao tipo de solo, há evidência de que os terrenos arenosos, soltos, são os mais favoráveis ao nematoide. Contudo infestações podem ocorrer em culturas conduzidas em outros solos, sendo desfavoráveis apenas os terrenos muito úmidos e compactos (LORDELLO, 1964).

3.3. 3 Sintomatologia

As meloidoginoses caracterizam-se por diferentes sintomas, uns diretos, observados nos próprios órgãos vegetais parasitados, e outros chamados reflexos, verificado na parte aérea das plantas. Segundo Ferraz e Monteiro (2011) e Pinheiro et al. (2010, 2014) os sintomas apresentados são os seguintes:

As galhas são o mais conhecido e frequente sintoma direto. São engrossamentos, de diâmetro variável, quase sempre presentes nas raízes infectadas por *Meloidogyne*. Resultam da hiperplasia e hipertrofia celular no cilindro vascular e, no parênquima cortical, ao redor do corpo do nematoide em desenvolvimento. Embora seja comum nas plantas atacadas, não constituem sintoma obrigatório, estando ausente em certas interações, como a de *M. coffeicola* e cafeeiro arábico.

Plantas com alta infestação por *Meloidogyne* possuem sistemas radiculares muito pobres, com escassas radículas, mostrando-se pouco eficientes na absorção e no transporte de água e dos nutrientes do solo.

A distribuição tipicamente irregular dos nematoides nas culturas infestadas conduz a uma desuniformidade no crescimento das plantas e no aparecimento de áreas localizadas, de maior ou menor extensão, denominadas “reboleiras”, onde se concentram plantas de tamanho reduzido, fortemente depauperadas.

Um quadro de deficiências nutricionais exibido por plantas cujos sistemas radiculares parasitados atuam precariamente. O desequilíbrio entre a tomada e a perda de água em plantas muito atacadas leva as folhas a murchar nas horas mais quentes do dia.

Queda abundante e rápida de folhas, principalmente na estação mais seca do ano, relacionada com parasitismo intenso de *Meloidogyne*. Em certas culturas, sob intenso parasitismo por *Meloidogyne*, plantas de certas variedades podem mostrar alterações evidentes em suas características agrônomicas quando comparadas as plantas sadias. Ex. Perfilhamento em cana de açúcar.

Reduções na produtividade variam com o tipo de reação da planta hospedeira, se mais tolerante, menores as perdas. Se mais susceptível, baixas produções.

3.3.4 Formas Gerais de Controle

Depois de estabelecidos em solo, os nematoides são de difícil erradicação, muitas vezes impossível. Compreende-se, pois, como são importantes as medidas que visam evitar a contaminação dos talhões livres do patógeno. Assume, assim, grande importância o uso de ferramentas e máquinas limpas, isentas de solo aderente, e principalmente, a obtenção de todo material de propagação de plantas, como sementes, bulbos, tubérculos, mudas, etc., livres destes destrutivos organismos (FERRAZ; MONTEIRO 2011).

A forma de controle mais utilizada é o controle químico com o uso de nematicidas sintéticos (BRIDGE, 2000). Esses são utilizados em altas doses e, embora frequentemente se obtenham ganhos em rendimentos, não raro a população final do nematoide se mantém igual ou até mesmo superior ao final do ciclo da cultura (LORDELLO et al., 1984; OLIVEIRA, KUBO, 1999). Os controles químicos atualmente disponíveis, os organofosforados e os carbamatos, têm um nível inaceitável de toxicidade para organismos não-alvo e estão sendo retirados do uso (OKA et al. 2014). No entanto, sabe-se que o uso indiscriminado de nematicidas, além de onerar a produção, coloca em risco a saúde dos aplicadores e consumidores, podendo exercer forte pressão de seleção sobre os organismos presentes no solo, selecionando formas mais resistentes ao produto químico (FERRAZ; MONTEIRO 2011).

O Fluensulfone [5-chloro-2-(3,4,4-trifluoro-but-3-ene-1-sulfonyl)-thiazole] (Figura 2) é um novo ingrediente ativo com atividade nematicida, pertencente a empresa ADAMA MAKHTESHIM LTD. Neot-Hovav - Eco-Industrial Park - Beer Sheva, Israel, representado no país pela empresa ADAMA Brasil S/A, que ainda se encontra em fase de registro, porém, com muitos resultados positivos publicados no exterior com efeito nematicida *in vitro* e *in vivo*. (OKA et. al. 2009; OKA et. al. 2011; OKA et. al. 2013; OKA, 2014; MORRIS et al. 2016).

Pertence ao grupo fluoroalcenil apresenta uma toxicidade muito menor para os vertebrados do que os nematicidas à base de organofosforado ou carbamato. A DL50 do fluensulfone a ratos por via de administração oral é superior a 500 mg.kg⁻¹, em oposição a dos nematicidas mais utilizados aldicarbe, fenamifós, oxamil, cadusafós, e fostiazato, que são 0,5-1,5, 2-19, 5,4, 37,1 e 73 mg.kg⁻¹, respectivamente. Além disso, o fluensulfone apresenta baixa ou nenhuma toxicidade para organismos não-alvo. Por exemplo, não é tóxico para abelhas e minhocas (OKA et. al. 2011).

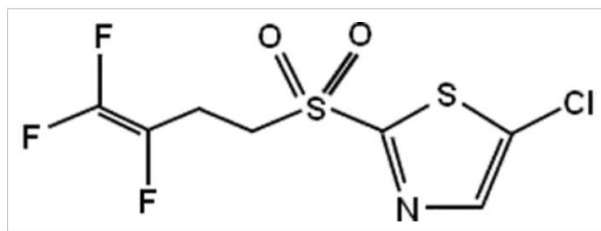


Figura 2: Estrutura química de Fluensulfone. Fonte: Oka et al. 2008.

Outras formas de controle frequentemente utilizadas para esses fitoparasitas vem sendo o uso de práticas culturais, rotação de culturas, plantas com ação antagonista e nematicidas sintéticos (INSUNZA et al., 2001; CHITWOOD, 2002; AMARAL et al., 2002; DUFOUR et al., 2003). O alto custo com o controle e a baixa eficiência de algumas formas de controle tem fomentado a busca por inimigos naturais.

Dentre as práticas culturais, o uso de cultivares resistentes mostra-se bastante promissor, uma vez que oferece as maiores possibilidades de êxito no controle de nematoides (RUANO et al., 1997, PINHEIRO et al., 2014). Como os nematoides têm sido um sério problema na cultura do tomate, há grande interesse em melhorar geneticamente as cultivares, tornando-as mais resistentes à infecção por esses patógenos (ABRÃO, 2001).

O objetivo do uso de cultivares resistentes é, além de proporcionar uma boa produtividade, a redução da população do nematoide no solo. Genes de resistência a nematoides estão presentes em várias espécies e são componentes importantes de vários programas de melhoramento genético (WILLIAMSON; HUSSEY, 1996).

Para o tomateiro a resistência aos nematoides-das-galhas foi identificada há mais de 60 anos em um acesso selvagem de *Solanum peruvianum* PI 128657. Cultivares de tomateiro portadoras do gene *Mi* apresentam resistência a *M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria* e em cultivos comerciais devem ser utilizadas sempre que disponível, pois este gene limita a reprodução destas espécies de *Meloidogyne* em plantas de tomateiro e em outras espécies cultivadas. Contudo, essa resistência pode ser ineficaz em temperaturas elevadas do solo (acima de 30° C), e muitas vezes não conferem resistência a populações geograficamente isoladas do nematoide (PINHEIRO et al. 2014)

A rotação de culturas é uma das práticas mais importantes e efetivas na redução dos nematoides em uma propriedade (PINHEIRO, 2018). Convenientemente planejada, a rotação de culturas pode constituir um bom método de manejo contra a meloidoginose. É preciso,

primeiramente, proceder à identificação da espécie presente na cultura e, depois, conhecer quais as plantas que não a hospedam ou que funcionam como hospedeiros desfavoráveis, as quais deverão estar presentes nas rotações. Os planos geralmente recomendados prescrevem a ausência no talhão de plantas hospedeiras da espécie a ser controlada, por 2 a 3 anos.

O emprego de *Crotalaria spectabilis* e de outras leguminosas promissoras para a prática da adubação verde tais como: a mucuna-preta (*Stilozobium aterrimum* Piper e Tracy), a crotalária (*Crotalaria juncea* L.) e o feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis* D.C.) tem se destacado, por serem plantas rústicas e de eficiente desenvolvimento vegetativo, adaptadas às condições de baixa fertilidade e de elevadas temperaturas (PEREIRA et al., 1992). Essas espécies possuem também a capacidade de reduzir a densidade populacional de nematoides parasitas de plantas (BRINGEL; SILVA, 2000; PINHEIRO, 2018).

Em 1940, Barrons (1940) demonstrou que os juvenis de *Meloidogyne* penetram no sistema radicular da *C. spectabilis*, mas não sobreviviam, morrendo prematuramente, sem deixar descendentes. Daí surgiu a ideia de utilização desta leguminosa como cultura de cobertura para solos infestados. Durante o tempo em que estas espécies permanecem vegetando no campo, processa-se uma redução da população de nematoides presentes na área.

Os agentes de controle biológico mais estudados e utilizados têm sido os fungos, seguidos pelas bactérias (KERRY, 1987; CAMPOS et al, 1998; BRAND et al 2010). Estudos também têm sido feitos observando-se algumas características dos agentes de biocontrole para obtenção de sucesso em condições de campo, incluindo habilidade para uma rápida colonização do solo, persistência, virulência, controle previsível mantendo a população abaixo do limiar econômico, facilidade de produção e aplicação, boa viabilidade sob armazenamento, baixo custo de produção, compatibilidade com agrotóxicos e segurança (BRAND et al., 2010).

Os fungos nematófagos são organismos que controlam o desenvolvimento dos nematoides parasitas de plantas atacando o nematoide ou seus ovos, e os utilizando como fonte de nutrientes. Alguns pesquisadores fizeram várias tentativas de utilizar bactérias no controle de nematoides. As bactérias nematicidas são de dois tipos: parasitas de nematoides e rizobactérias. As bactérias mais estudadas são *Pasteuria penetrans*, um endoparasita obrigatório de *Meloidogyne*, seguido por estirpes de *Pseudomonas* (BRAND et al., 2010).

Dentre as bactérias, outro grupo que apresenta potencial de controle são os *Bacillus*, microrganismos presentes em diversos nichos ecológicos, isolados de diversos ambientes,

principalmente do solo, podendo ter associação direta com os nematoides, principalmente os de vida livre que são bacteriófagos (LI et al. 2007).

Trabalhos anteriores demonstraram que *Bacillus* podem agir de diferentes modos de ação sobre os nematoides, inclusive os que são causadores de doenças de plantas (WEI et al. 2003). O controle biológico tem se mostrado uma boa alternativa para o manejo de populações de nematoides em diversas culturas, principalmente por ter dano ambiental reduzido e ser economicamente viável comparado aos métodos químicos convencionais (COIMBRA; CAMPOS, 2005).

3.4 O gênero *Bacillus* spp.

O gênero *Bacillus* é composto de bactérias Gram positivas, membros do filo Firmicutes, que possuem forma de bastonete, são formadoras de endósporos, podem estar isoladas, em pares ou filamentos de tamanhos variados e maioria é aeróbia, podendo apresentar motilidade por flagelos peritríquios, ou serem imóveis (LOGAN; de VOS, 2009). Devido, em grande parte, ao fato de que eles são habitantes comuns do solo e de sedimentos aquáticos, espécies dentro do gênero são difundidas na natureza e são encontradas em praticamente todos os ambientes. Crescem em temperatura que varia entre 25 ° C e 37 ° C, apesar de existirem espécies com crescimento em faixas de temperaturas muito altas ou muito baixas. Algumas espécies também suportam extremos de pH, podendo crescer entre pH 2 e 10. Essas grandes heterogeneidades de ambientes e condições de crescimento se refletem na variedade de nichos ecológicos que as espécies de *Bacillus* podem ocupar e na quantidade de substratos que estas podem utilizar no seu crescimento e também ao grande complexo enzimático produzido por esta espécie (HABIB, ANDRADE, 1998; LOGAN; de Vos, 2009; ROONEY et al., 2009; RASI 2010).

Embora as suas principais funções pareçam envolver ciclagem de carbono e nitrogênio, algumas espécies são patógenos humanos e animais bem conhecidos (por exemplo, *B. anthracis* e *B. cereus*) e agentes patogênicos de insetos (por exemplo, *B. thuringiensis*). No entanto, a grande maioria das espécies de *Bacillus* não são patogênicas. Devido a esse fato, muitos deles têm sido explorados para aplicações biotecnológicas e industriais (HOU et al., 2005, RUIZ-GARCÍA et al., 2005a, b, BISCHOFF et al., 2006, ROONEY et al., 2009).

O gênero *Bacillus* é dividido em grandes grupos de espécies que apresentam alto percentual de similaridade genética, sendo estreitamente relacionadas. O agrupamento fenotípico destas

espécies baseados na morfologia, fisiologia, perfil de ácidos graxos e fermentação de carboidratos é muitas vezes enganoso (LOGAN; BERKELEY, 1984; WUNSCHHEL et al., 1995). A taxonomia baseada no gene 16S rRNA é um caminho claro para a identificação bacteriana (WOESE, 1987). Os grupos de maior representatividade são o do *Bacillus cereus* e o grupo do *Bacillus subtilis* por sua importância médica, biotecnológica e industrial.

3.4.1 Grupo do *B. cereus*

O grupo do *B. cereus* é referido como *B. cereus sensu lato*. Este grupo possui um *cluster* homogêneo, ou seja, composto por espécies altamente relacionadas taxonomicamente (JENSEN et al., 2003; TOURASSE et al 2006; KOLSTO et al., 2009; GUINEBRETIERE et al., 2013).

Até o momento, sete membros foram descritos: *B. cereus stricto sensu*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. thuringiensis*, *B. weihenstephanensis*, *B. anthracis* e, mais recentemente *B. cytotoxicus* (GUINEBRETIERE et al., 2013). Estas estirpes compartilham um genoma altamente conservado, e as suas sequências de genes 16S rRNA mostram altos níveis de similaridade (ASH et al., 1991). A taxonomia do “grupo *B. cereus*” ainda é bastante controversa. Alguns autores sugerem que estas espécies, por serem tão proximamente relacionadas, devem ser agrupadas como membros de uma única espécie (HENDRIKSEN et al., 2006; DIDELOT et al., 2009; GUINEBRETIERE et al 2010).

As espécies de *B. cereus sensu lato* podem ser classificadas como distintas devido essencialmente às suas características fenotípicas. *B. anthracis* caracterizam-se pelos fatores de patogenicidade de formação de cápsula e pela produção de toxinas que causam o carbúnculo hemático em humanos e animais, doença conhecida como Antrax (ARNESEN et al., 2008). *B. thuringiensis* distingue-se pela produção de endotoxinas produzidas durante sua esporulação, que são utilizadas comercialmente como inseticida. *B. mycoides* e *B. pseudomycoides* exibem um crescimento típico rizoide em ágar (NAKAMURA, 1998) e *B. weihenstephanensis* é constituído por estirpes psicrótróficas com multiplicação abaixo de 7 ° C, mas não acima de 43 ° C (LECHNER et al., 1998; ARNESEN et al., 2008).

3.4.2 Grupo do *B. subtilis*

O grupo do *B. subtilis sensu lato* compreende as espécies: *B. subtilis sensu stricto*, *B. licheniformis*, *B. amyloquefaciens*, *B. atrophaeus*, *B. mojavensis*, *B. vallismortis* e *B. sonorensis* (WANG *et al.*, 2007).

Assim como no grupo do *B. cereus*, as espécies do grupo são estreitamente relacionadas, não sendo possível fazer a distinção entre as linhagens baseando-se somente em análises de sequências de rDNA/rRNA 16S (de VOS *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2007; WATTIAU *et al.*, 2001).

As espécies desse grupo não são patogênicas e apresentam grande potencial biotecnológico (STRESHINSKAYA *et al.*, 2011). As principais aplicações na indústria são a produção de enzimas (proteases, amilases e celulases, dentre outras hidrolases), antibióticos, fermentação de alimentos, vitaminas), etc (JEYARAM *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2007). A espécie *B. subtilis sensu stricto* participa da formação de biofilme que previne infecções causadas por patógenos de plantas (PARK *et al.*, 2009) e também é explorada como fator de crescimento vegetal (KLOEPPER *et al.*, 2004; LUGTENBERG; KAMILOVA 2009; OREM 2014).

3.4.3 Ciclo de vida e esporulação

A formação de esporos é mais importante na identificação do gênero. Antes de tentar identificar a espécie é importante estabelecer que a estirpe seja realmente uma formadora de endósporo, e que outras inclusões não estão sendo confundidas com esporos.

A capacidade de formar endósporos em condições aeróbias é um fator que define o gênero *Bacillus* desde 1920, e tem sido aplicada em todas as edições do Manual de Bergey's (de Vos *et al.*, 2009).

Endósporos são assim chamados porque eles são formados intracelularmente, e eles diferem das suas células vegetativas de origem em muitas maneiras: eles são refrativos opticamente e são altamente resistentes a tensões químicas e físicas que são letais para células vegetativas. Devido as propriedades conferidas aos esporos como a composição química especial e a sua ultraestrutura, muito esforço tem sido dispendido ao longo de muitos anos, a fim de elucidar seus processos de formação e de germinação, e os mecanismos moleculares que fazem dos endósporos a forma mais resistente de vida conhecida na Terra. Embora os

endósporos possam ser encontrados em outros gêneros, *Clostridium*, por exemplo, os esporos de *B. subtilis* foram os mais intensamente estudados, especialmente os da estirpe 168 (de VOS *et al.*, 2009).

A formação de um esporo pode ser dividida, didaticamente, em sete estágios morfológicos, intimamente associados às mudanças na expressão gênica (DRIKS, 1999; HILBERT; PIGGOT, 2004; SETLOW, 2007; OREM 2014). Os principais eventos morfológicos, bioquímicos e da regulação da expressão gênica que ocorrem durante cada estágio da esporulação estão resumidos abaixo:

- **Estágio 0** — Célula em estado vegetativo, com genoma duplicado;
- **Estágio I** — Formação de um filamento axial, onde as duas cópias do genoma se condensam e alongam para formar um filamento distribuído ao longo do eixo celular;
- **Estágio II** — Formação do septo assimétrico que divide a célula em diferenciação (esporângio) em dois compartimentos, o menor (pré-esporo) e o maior (célula mãe);
- **Estágio III** — Engolfamento do pré-esporo;
- **Estágio IV** — Síntese do córtex: deposição de camadas de peptideoglicano, ligadas frouxamente, no espaço entre as membranas que envolvem o núcleo do pré-esporo;
- **Estágio V** — Formação da capa;
- **Estágio VI** — Maturação do esporo;
- **Estágio VII** — Lise da célula mãe e liberação do esporo maduro.

O esporo maduro resultante do processo de diferenciação é composto por um conjunto de estruturas de proteção arranjadas em camadas concêntricas. Em conjunto com componentes do citoplasma, ou núcleo do esporo, cada um desses componentes contribui para a resistência do esporo, que pode ser viável por milhões de anos (CANO; BORUCKI, 1995; VREELAND *et al.*, 2000; DRIKS, 2003; OREM, 2014; DUC *et al.*, 2004; MOELLER *et al.*, 2014).

A esporulação foi caracterizada primeiramente em *B. subtilis* e essa espécie permanece como principal modelo do processo (HILBERT; PIGGOT, 2004). Entretanto, os mesmos fatores chave de regulação ativos em *B. subtilis* foram identificados em diversas outras espécies formadoras de endósporos, com genomas inteiramente sequenciados, inclusive *B. anthracis* e *Clostridium difficile*. As conclusões obtidas a partir de estudos com *B. subtilis* são geralmente

válidas para os membros da família *Bacillaceae*, além de outras, e representam as características gerais de diferenciação celular (OREM, 2014).

A decisão em esporular é uma resposta de *quorum sensing*. Em conjunto com alta densidade celular e moléculas sinalizadoras, a esporulação é disparada por sinais ambientais, principalmente, baixas concentrações de C, N ou P, em algumas circunstâncias (GROSSMAN, LOSICK, 1988; HILBERT; PIGGOT, 2004; BARÀK et al., 2005; SETLOW, 2007). Os sinais metabólicos e ambientais percebidos por *B. subtilis*, e outras bactérias formadoras de endósporos, são integrados a um sistema de transferência sequencial de fosfato, denominada cascata de fosforilação (OREM, 2014).

O esporo resultante desse processo é uma estrutura altamente refratável e vista com um brilho destacado ao microscópio de contraste de fase (HILBERT; PIGGOT, 2004; de VOS et al., 2009;). Os tipos morfológicos de esféricos a ovalados, bem como a localização - central, subterminal, terminal ou lateral - e a observação de deformação ou não do esporângio durante a formação do esporo, são utilizados como parâmetros de classificação (OREM, 2014).

3.4.4 Habitat

Embora as estirpes da maioria das espécies estabelecidas fossem derivadas do solo, ou de ambientes que possam ter sido contaminados, direta ou indiretamente pelo solo, a gama de fontes de isolamento é muito vasta e incluem, além das áreas temperadas, solos ácidos, neutros e alcalinos, água doce e marinha, alimentos e amostras clínicas, ar, sedimentos ricos em metais pesados, processamento resíduos de mineração, salmoura, compostagem, insetos, pena, couro, fezes, tecidos internos das plantas, invertebrados, leite, fontes de água aquecidas naturalmente, papel, algas, soluções salinas e ambientes hipersalinos, esgoto e processos de tratamento de águas residuais, lagos e águas subterrâneas. A maioria das espécies de *Bacillus* são organismos heterotróficos que foram isolados em meios orgânicos complexos, o que provavelmente explica a grande quantidade de substâncias produzidas por este gênero. (de VOS *et al.*, 2009).

Representantes de várias espécies, incluindo *B. amyloliquefaciens*, *B. cereus*, *B. endophyticus*, *B. insolitus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. pumilus* e *B. subtilis*, foram isolados a partir dos tecidos internos de plantas saudáveis, incluindo algodão, uva, ervilha, milho doce e coníferas, algumas cepas demonstram ter um papel importante na promoção do crescimento e proteção de plantas (LOGAN; de VOS, 2009; REVA et al., 2002). Estas estirpes

endofíticas e/ou epifíticas podem ter potencial como agentes de controle biológico de doenças de plantas, e os seus esporos, oferecem vantagens na formulação de tais preparações (EMMERT; HANDELSMAN, 1999).

As espécies de *Bacillus* também desempenham um papel importante na degradação de quitina. As quitinases estão entre as hidrolases bacterianas com maior potencial no controle biológico, esta atividade foi demonstrada em estirpes de *B. circulans*, *B. coagulans*, *B. lentus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. pumilus* e *B. thuringiensis* (CLEMENTS et al., 2002), e cepas de *B. amyloliquefaciens*, *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. sphaericus* e *B. subtilis* que utilizam a quitina de resíduos de crustáceos também foram isolados (SABRY, 1992; WANG, HWANG, 2001). A importância desta propriedade é que estirpes com atividade quitinolítica podem ser patogênicas a insetos e/ou pragas agrícolas e também possuir propriedades antifúngicas. Uma quitinase obtida a partir de uma estirpe de *B. thuringiensis* subsp. *pakistani* mostrou-se ser tóxica para larvas de *Aedes aegypti* (THANTHANKUL et al., 2002). Quitinases de um isolado do solo de *Bacillus amyloliquefaciens* foram encontrados apresentando propriedades antifúngicas (WANG et al., 2002).

Outras estirpes de *Bacillus* também têm sido isoladas acumulando íons metálicos não enzimaticamente por adsorção a sua superfície celular. Células de *B. licheniformis* podem acumular céσιο, cobalto e íons de cobre a partir de soluções de resíduos (HAFEZ et al., 2002), *B. subtilis* podem acumular alumínio, cádmio, ferro e zinco, e aluminossilicatos (URRUTIA; BEVERIDGE, 1995). Essa propriedade pode ser de importância tanto no tratamento de resíduos urbanos e industriais quanto na recuperação de áreas degradadas ou contaminadas.

3.4.5 Potenciais Patogênicos e Importância Tecnológica

Algumas espécies parecem ser contaminantes ubíquos de homem, outros animais, seus alimentos, água e ambientes, natural, doméstico, industrial e hospitalar. Sua ampla distribuição é em parte devido à extraordinária longevidade de seus endósporos, que mostram alta resistência física e a agentes químicos, tais como o calor, o frio, a dessecação, a radiação, a desinfetantes, antibióticos e outros agentes tóxicos. Os endósporos são tipicamente mais resistentes ao calor do que as células vegetativas por um fator de 10^5 vezes ou mais, enquanto que a resistência a UV e radiação ionizante pode ser de 100 vezes ou mais. Se protegido da

radiação, os esporos podem sobreviver durante períodos muito longos (LOGAN; de VOS, 2009).

A maioria das espécies têm pouco ou nenhum potencial patogênico e raramente estão associados com o desencadeamento de doenças em seres humanos ou outros animais. Uma exceção a esta afirmativa é o *Bacillus anthracis*, o agente do antraz; várias outras espécies podem causar intoxicação alimentar e infecções oportunistas, e estirpes de *B. thuringiensis* são patogênicas à invertebrados (de Vos *et al.*, 2009).

As espécies pertencentes ao gênero *Bacillus* vêm sendo muito utilizadas em aplicações industriais, ocupando o maior lugar dentre os outros microrganismos com aplicações práticas. Eles são organismos com atrativo industrial por possuírem diversas características vantajosas, tais como sua alta taxa de crescimento, demandando curto tempo para fermentação, sua capacidade de secretar proteínas para um meio extracelular e o estado GRAS (Generally Recognized as Safe), considerado pelo FDA (Food and Drug Administration), de algumas espécies como *B. subtilis* e *B. licheniformis* (SCHALLMEY *et al.* 2004), as quais são muito próximas, filogeneticamente, de *B. amyloliquefaciens*. Estes organismos são uma fonte muito importante de enzimas extracelulares utilizadas industrialmente, incluindo proteases e amilase (LISBOA, 2006).

Para a agricultura existe a necessidade de lançamento de novos produtos continuamente, principalmente devido à alta toxicidade dos existentes e que estão sendo retirados do mercado e substituídos por produtos menos tóxicos e também, devido a baixa eficiência de controle de determinados produtos a pragas específicas. Dessa forma, as preparações biológicas de *Bacillus* sp. são preferidas do ponto de vista tecnológico, porque a sua viabilidade a longo prazo facilita o desenvolvimento de produtos comerciais (BORRISS, 2015). Estas bactérias associadas às plantas são caracterizadas pela sua atividade simultânea de promoção do crescimento das plantas e biocontrole. Os efeitos de promoção do crescimento das plantas e biocontrole reforçam a sanidade, tornando as plantas mais resistentes aos agentes patogênicos, reduzindo as perdas na colheita (KAMILOVA *et al.*, 2015).

Infelizmente, o sucesso de tais organismos biológicos na agricultura ainda é dificultado por apresentarem desempenho a campo às vezes inconsistente e devido ao conhecimento insuficiente sobre os mecanismos básicos de interações entre *Bacillus* e plantas, embora alguns avanços tenham sido alcançados na última década (RAVENSBERG, 2015).

3.4.6 *Bacillus amyloliquefaciens*

São estritamente aeróbios, Gram-positivos, móveis, medindo 0,7-0,9 por 1,8-3,0 μm , ocorrendo frequentemente em cadeias, e formando esporos elipsoidais (0,6-0,8 por 1,0-1,4 μm), que se encontram centralmente, paracentralmente e subterminalmente em esporângios não inchados. Não é detectado nenhum crescimento abaixo de 15 °C ou acima de 50 °C; a temperatura ótima de crescimento situa-se entre 30-40 °C. Crescimento ideal a pH 7 e na presença de 5% de NaCl, sendo que a maioria das estirpes tolera 10% de NaCl (LOGAN; de VOS, 2009).

Primeiramente, a espécie *B. amyloliquefaciens* foi proposta por Fukumoto (1943) para abrigar as linhagens de *B. subtilis* que produziam amilases, mas a proposta não foi aprovada. Somente mais tarde a espécie foi retomada por Priest et al. (1987) e *B. amyloliquefaciens* foi reconhecido como uma espécie em 1987 e originalmente descrito como produtor de enzimas extracelulares.

Esta espécie é muito semelhante a *B. subtilis*, Xu e Côté (2003) reportaram que a região final 3' dos genes 16S-23S é altamente conservada entre as espécies de *B. amyloliquefaciens* e *Bacillus subtilis*, o que não ocorre entre as outras espécies de *Bacillus*. Porém, a espécie *B. amyloliquefaciens* pode ser distinguida de *B. subtilis* por possuir uma porcentagem molecular de G+C um pouco maior em seu DNA, enquanto *B. subtilis* possui entre 41,5 e 43,5%, *B. amyloliquefaciens* possui em torno de 43,5 a 44,9% de G+C (YOSHIDA et al. 2001).

Welker e Campbell (1967) citaram outras características que permitem diferenciar essas duas espécies: *B. amyloliquefaciens* tem a capacidade de crescer em solução contendo 10% de NaCl e fermenta a lactose produzindo ácido, enquanto *B. subtilis* não o faz.

Este organismo foi isolado a partir de uma grande variedade de ambientes, incluindo amilase industrial, fermentações, alimentos e o solo (LOGAN; de VOS, 2009).

B. amyloliquefaciens produz uma diversidade de enzimas, tais como a α -amilase, galactanase, isoamilase, mananase, xilanase, metal protease, serina protease, fosfatase alcalina, ribonuclease (PRIEST et al., 1977).

A maioria das substâncias com atividade antimicrobiana produzida por bactérias do gênero *Bacillus spp.* são ativas contra organismos Gram-positivos. Entretanto, muitas pesquisas

apontam cepas de *B. amyloliquefaciens* com atividade antimicrobiana de amplo espectro (LOGAN; de VOS, 2009).

Com relação à produção de substâncias antimicrobianas por linhagens dessa bactéria, Yoshida et al. (2001) verificou a existência de atividade antifúngica e inibidora de algumas bactérias no sobrenadante filtrado da cultura de uma linhagem desta espécie. De acordo com Stein (2005), o potencial de certa linhagem de *B. subtilis* para a síntese de peptídeos antimicrobianos é comparado com *B. amyloliquefaciens*, sendo aproximadamente 7,5% do genoma dedicado à produção dos antimicrobianos. O autor descreveu, ainda, que *B. amyloliquefaciens* produz antimicrobianos como *B. subtilis*, porém, em menor variedade.

Em trabalho realizado por Ji et al. (2013), o isolado de *B. amyloliquefaciens* CNU114001 que foi identificado por observação morfológica e molecular de dados, apresentou atividade de amplo espectro contra 12 fungos fitopatogênicos por método de cultura dupla, analisando a inibição do patógeno. As substâncias antifúngicas do isolado foram extraídas e purificadas por cromatografia em gel de sílica em coluna, cromatografia em camada fina e cromatografia líquida de alta eficiência. O composto estável foi identificado como iturina A, um lipopéptido. O composto semi-purificado inibe significativamente o crescimento micelial de fungos patogênicos (*Alternaria Panax*, *Botrytis cinera*, *Colletotrichum orbiculare*, *Penicillium digitatum*, *Pyricularia grisea* e *Sclerotinia sclerotiorum*) a 200 ppm de concentração.

As espécies foram recentemente divididas em duas subespécies, *B. amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* e *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*, baseado em comparações de seu genoma (BORRISS et al., 2011). As estirpes de *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* estão associados tipicamente a isolados do solo ou que possuem a capacidade de colonizar a rizosfera da planta, estimular o crescimento das plantas e suprimir as bactérias fitopatogênicas concorrentes e fungos. Devido a essas características de biofertilizante e como agente de controle biológico essas bactérias estão se tornando cada vez mais importantes como alternativa natural aos pesticidas sintéticos (BORRISS et al., 2011, MADHAIYAN et al., 2010; PALAZZINI et al., 2007; RUCKERT et al., 2011; SCHISLER et al., 2002).

Em trabalho realizado por Burkett-Cadena et al., (2008), avaliaram inoculantes a base de rizobactérias comercialmente disponíveis (Equity®, BioYield® e AgBlend®) e um isolado de *B. amyloliquefaciens* chamado FZB42, isolado do produto RhizoVital®, na supressão do nematoide *Meloidogyne incognita*. Observou-se que os inoculantes Equity, BioYield, e FZB42 induziram significativas reduções no número ovos por grama de raiz, o número de juvenis por

mL de solo, e na quantidade de galhas por planta de tomate. Segundo os autores os inoculantes suprimiram o nematoide *M. incognita* através de diferentes mecanismos de ação. O AgBlend, por exemplo, reduziu o dano a planta sem reduzir significativamente o número de juvenis/mL ou ovos por grama de raiz, indicando que os efeitos foram predominantemente exercidos sobre a planta. Em contraste, o número de juvenis foi reduzido nos tratamentos com Equity, BioYield e FZB42, indicando que também ocorreram interações antagônicas na rizosfera.

Tal antagonismo pode estar relacionado com a produção de antibióticos. Foi relatado que a estirpe FZB42 de *B. amyloliquefaciens* produz lipopeptídeos, surfatinas, bafilomicina D e fengicinas, que são metabolitos secundários com atividade principalmente antifúngica (CHEN et al., 2006). A produção de antibióticos pelo FZB42 também pode explicar tanto o seu padrão de colonização como o achado de que a capacidade de suporte bacteriana total da rizosfera foi aumentada.

Além suprimir os danos dos nematoides, os tratamentos com os inoculantes testados aumentaram o peso da raiz do tomate, o que também poderia justificar algum nível da supressão observada. Plantas com sistema radicular maior são reconhecidas por tolerarem uma determinada população de nematoides (GIERTH et al., 2004, KOKALIS-BURELLE et al., 2006).

Burkett-Cadena et al. (2008) concluíram que o tratamento com várias formulações representativas de inoculantes microbianos suprimiu *M. incognita* do solo, tanto em solo de campo autoclavado e não-autoclavado e proporcionou maior crescimento das plantas de tomate. Além disso, o aumento da densidade de população bacteriana na rizosfera foi detectado pela contagem direta em placas. Assim, inoculantes microbianos podem ser usados como componentes em abordagens integradas para o gerenciamento de doenças e mudar a dinâmica das populações microbianas na rizosfera.

Além deste trabalho, o isolado FZB42 é usado comercialmente como biofertilizante e agente de controle biológico na agricultura, sendo especialmente eficaz contra fungos e bactérias patogênicas (BORRISS et al., 2011; CHOWDHURY et al., 2015). A análise do genoma de FZB42 revelou que quase 10% do genoma FZB42 é dedicado à síntese de metabólitos antimicrobianos e seus genes de imunidade correspondentes, porém, os autores atribuem a indução de resistência sistêmica de plantas por metabólitos bacterianos como o principal mecanismo responsável pela ação biocontroladora de FZB42.

A análise de todo o genoma de FZB42 revelou uma impressionante capacidade para produzir um espectro diversificado de diferentes metabólitos secundários destinados a suprimir microrganismos nocivos e nematoides que vivem na rizosfera das plantas (CHEN et al. 2007).

Isolados ativos de *B. amyloliquefaciens* e *B. subtilis* produzem vários compostos tensoativos e lipopeptídeos de ação antimicrobiana, incluindo surfatina, iturina A, e fengicina (CHOWDHURY et al, 2015; ONGENA; JACQUES, 2008; PÉREZ-GARCÍA et al, 2011). Estes metabólitos têm atividades antifúngicas e antibacterianas, afetando a motilidade bacteriana e formação de biofilme, e agindo como elicitores na indução sistêmica de resistência (PÉREZ-GARCÍA et al., 2011).

Nam et al. (2016), examinaram as fezes de larvas do besouro rinoceronte, *Dithotomus dichotoma* para verificar a presença de microrganismos de controle biológico. Um isolado com forte atividade antifúngica foi identificado como *Bacillus amyloliquefaciens* KB3. A presença da atividade inibidora da estirpe está correlacionada com produções lipopeptídicas, incluindo iturina A e surfatina. A aplicação foliar dos filtrados da suspensão bacteriana do isolado KB3 reduziu significativamente a incidência da doença em quatro patossistemas, semelhante ao controle proporcionado pelo produto comercial a base da estirpe de *B. subtilis* QST-713. Estes resultados demonstram a presença de microrganismos com o potencial de inibir o crescimento de fungos, tais como agentes patogênicos de plantas, em diversos nichos ecológicos.

O isolado B94 também caracterizado como *B. amyloliquefaciens*, foi utilizado com agente de controle biológico para a supressão de *Rhizoctonia solani* e outros fungos fitopatogênicos, onde três componentes antifúngicos foram isolados da cultura do microrganismo e identificados como isômeros de inturina A (YU et al., 2002). As inturinas são um grupo de lipopeptídeos cíclicos produzidos por *B. subtilis* com potente atividade antifúngica. O grupo é formado por inturina A-E, bacilomicina D, F e L e micosubtilina (YU et al., 2002).

Outro isolado de *B. amyloliquefaciens* identificado por GA1, também apresentou elevada atividade inibitória contra diversos fungos patogênicos de plantas. Este isolado quando utilizado no tratamento de sementes proporcionou diminuição de doenças nas plântulas por antibiose direta contra patógenos de solo, além de reduzir a infecção pós-colheita de maçãs por *Botrytis cinera*, agente causal do mofo cinzento. Com bases nesses dados obtidos pelo isolado GA1 de *B. amyloliquefaciens*, os autores recomendam seu uso como agente de controle biológico (TOURE et al. 2004; ARGUELLES-ARIAS et al 2009).

Inúmeras cepas de *B. amyloliquefaciens* têm sido relacionadas à produção de lipopeptídeos com atividade antifúngica. Arguelles-Arias et al (2009) demonstraram que a cepa GA I produz os lipopeptídeos cíclicos iturina A, fengicina A e B e surfatina que possuem grande potencial de uso no controle biológico de patógenos associados a plantas.

3.4.7 *Bacillus licheniformis*

São anaeróbios facultativos, Gram-positivos, possuem motilidade, formam esporos elipsoidais a cilíndricos que se encontram no centro, paracentralmente e subterminalmente em esporângios não inchados. As células cultivadas em ágar glucose possuem coloração uniforme, medindo de 0,6-0,8 por 1,5-3,0 μm , ocorrem isoladamente ou em pares, e cadeias. A morfologia colonial é variável, dentro e entre as cepas, e, como ocorre com *B. subtilis*, pode dar a aparência de uma cultura mista (LOGAN; de VOS et al., 2009).

Colônias tem forma arredonda a irregular e diâmetro moderado (2-4 mm), com margens variando entre ondulada para fimbriada; a cor é esbranquiçada, e pode se tornar cremosa ou marrom e até vermelha em meios contendo ferro em quantidade suficiente; as texturas variam de úmido e brilhante ou mucoide, até membranoso com aspecto áspero e duro conforme elas secam; as colônias de *B. licheniformis* tendem a ser bastante aderentes ao ágar. A temperatura mínima de crescimento é de 15 °C, e a máxima é de 50-55 °C; um isolado obtido a partir de um ambiente geotérmico apresentou a temperatura máxima de crescimento de 68 °C (LLARCH et al., 1997). O crescimento ocorre em pH 5,7 e 6,8, mas os limites de pH não foram relatados. A espécie cresce na presença de NaCl na concentração de até 7%. A espécie é amplamente distribuída, no solo e em muitos outros ambientes, incluindo leite e outros alimentos, e amostras clínicas e veterinárias. O crescimento vegetativo pode ocorrer facilmente em alimentos mantidos a 30-50 °C, sendo relatado ocasionalmente como um agente patogénico oportunista ao homem e outros animais, e como uma causa de intoxicações alimentares (LOGAN; de VOS et al., 2009).

O organismo nunca foi relatado como patogénico para plantas e é amplamente utilizado em larga escala na produção industrial de exo-enzimas, uma vez que pode secretar grandes quantidades de proteínas de até 20-25 g/L (SCHALLMEY et al., 2004; VEITH et al. 2004).

As bacteriocinas de *B. licheniformis* são geralmente estáveis a mudanças de pH e resistentes a altas temperaturas, da ordem dos 100 °C (ABRIOUEL et al., 2011). A bacitracina

foi o primeiro antibiótico peptídico de síntese não ribossomal derivado de culturas de *B. licheniformis* e tem sido amplamente aplicada nas áreas da medicina humana e veterinária, exibindo atividade contra estirpes de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (ABRIOUEL et al., 2011; HE et al., 2006).

B. licheniformis I89 produz um composto (A89) que demonstrou atividade antimicrobiana contra vários organismos Gram-positivos isolados de ambiente natural e hospitalar (MENDO et al. 2004).

Segundo Schallmeyer et al. (2004), *Bacillus licheniformis* vem sendo amplamente empregado na obtenção de proteases, as quais são utilizadas industrialmente na produção de detergentes. Devido à atividade hemolítica, esses microrganismos são produtores de biossurfatantes em potencial (YOUSSEF et al., 2004)

Em trabalho avaliando produtos à base de *B. subtilis* e *B. licheniformis*, quando associados com a co-inoculação de *Bradyrhizobium elkanii*, Medice (2012), verificou o potencial desses organismos como promotores de crescimento em soja constatado pelo número de nódulos, a área foliar e peso seco da parte aérea das plantas, onde destacou-se que a mistura dos dois produtos biológicos, *B. subtilis* com *B. licheniformis*, resultou em incremento na promoção de crescimento.

Silva (2015) avaliando a tolerância à salinidade em plantas de *Phaseolus vulgaris* L. inoculadas com bactérias promotoras de crescimento oriundas do semiárido baiano, verificou que isolados de *Rhizobium miluonense*, *Bacillus megaterium* e *Bacillus licheniformis* apresentaram potencial como bactérias promotoras de crescimento e indutoras de tolerância ao estresse salino em feijão comum.

3.4.8 *Bacillus subtilis*

São aeróbicas, Gram-positivas, móveis, formando esporos de forma elipsoidal ou cilíndricos que se situam centralmente, paracentralmente e subterminalmente em esporângios não inchados. Células 0,7-0,8 por 2,0-3,0 µm, ocorrendo isoladamente e em pares, raramente em cadeias. A morfologia colonial é excepcionalmente variável, dentro e entre as estirpes, podendo dar a aparência de uma mistura cultura. As colônias possuem formas arredondas a formas irregulares e apresentam diâmetro moderado (2-4 mm), com margens variando de

ondular ao fimbriado. As colônias podem se tornar opacas e que podem ficar enrugadas. A cor é esbranquiçada, e pode tornar-se cremosa ou marrom. As colorações variam de creme a amarelo, laranja, rosa e vermelho, a marrom ou preto, a depender do meio utilizado (LOGAN; de VOS 2009).

A temperatura ideal de crescimento é de 28-30 ° C, com mínimo de 5-20 ° C e máximo de 45-55 °C. O crescimento ocorre entre pH 5,5 e 8,5, mas não foram registrados limites de crescimento. Pode ocorrer algum crescimento anaeróbico restringido em meio contendo glicose ou nitrato. O crescimento é observado mesmo em meio contendo um mínimo de glicose e sais de amônio como únicas fontes de carbono e nitrogênio. O crescimento é observado na presença de até 7% de NaCl, algumas estirpes toleram 10% de NaCl. Catalase-positiva, oxidase variável. Caseína, esculina, gelatina e amido são hidrolisados, enquanto que fenilalanina e ureia não são hidrolisadas. Também são capazes de degradar pectina e polissacarídeos de tecidos vegetais. Endósporos são muito difundidos no solo, poeira e na vegetação, e em muitos outros ambientes (LOGAN; de VOS 2009).

A esporulação em *B. subtilis* tem sido usada há muito tempo como modelo para diferenciação procariótica (NARULA et al. 2016). A diferenciação celular é um termo genérico para os processos pelos quais as células se especializam fenotipicamente e morfologicamente para se adaptar às condições ambientais ou para desempenhar funções específicas. Este programa de diferenciação permite que as células de *B. subtilis* produzam esporos metabolicamente inertes e resistentes ao estresse, capazes de sobreviverem a longos períodos dormentes (NARULA et al. 2016).

B. subtilis produz muitos metabólitos secundários quimicamente diversificados de interesse químicos e biólogos, incluindo lipopeptídeos cíclicos, polipeptídeos, proteínas e produtos não peptídicos (WANG et al. 2015). As estirpes têm um sistema secretório bem desenvolvido, produzindo diversos metabólitos secundários com um amplo espectro de atividades antibióticas valiosas para a medicina e a agricultura (MUKHERJ et al., 2006). A descoberta de um número crescente de produtos oriundos de *B. subtilis* enfatizou ainda mais as suas potenciais aplicações industriais. Os compostos antimicrobianos produzidos por *B. subtilis* foram estudados extensivamente como agentes biológicos de controle de patógenos de plantas, como conservantes de alimentos e como medicamentos em animais (MULLIGAN, 2005).

B. subtilis é normalmente encontrada nas camadas superiores do solo onde se acumula em grande número, formando biofilmes que são benéficos para o crescimento das plantas e proporcionam proteção contra agentes patogênicos (EARL et al., 2008). Os biofilmes de *B. subtilis* formam uma interação mutualista com a rizosfera das plantas, proporcionando uma colonização preventiva, o que impede que outros patógenos infectem a planta (BAIS et al., 2004), enquanto que as bactérias se beneficiam dos nutrientes liberados pelo sistema radicular.

Em trabalho realizado por Arnaouteli et al. (2016) verificou-se a presença de uma estirpe de *B. subtilis* com a capacidade de produzir biofilme altamente hidrofóbico, resistente ao molhamento por água, solventes e biocidas. Esta notável propriedade é conferida por uma pequena proteína secretada chamada BslA. No biofilme, a produção de BslA é rigorosamente regulada e a proteína resultante é segregada para o ambiente extracelular, onde forma uma barreira comunitária muito eficaz, permitindo que as células residentes de *B. subtilis* se abriguem sob a proteção de um manto proteico impermeável (ARNAOUTELI et al. 2016).

Biofilmes são comunidades microbianas que chamaram a atenção devido à sua notável resistência a compostos antimicrobianos e higienizantes, em comparação com os seus equivalentes bacterianos de vida livre (TAN et al., 2014). Estas propriedades tornam os biofilmes úteis, uma vez que podem ser utilizados como agentes de remoção de resíduos ambientais (EDWARDS; KJELLERUP, 2013). Os componentes predominantes da matriz de biofilme são exopolissacarídeos, DNA extracelular e proteínas segregadas (HOBLEY et al. 2015).

Arnaouteli et al. (2016) afirma que levando em conta o habitat natural de *B. subtilis*, pode-se supor que a repelência à água daria a bactéria uma vantagem evolutiva, ao aumentar a colonização da raiz da planta, pois permitindo que a comunidade bacteriana se torne mais resistente a diversos fenômenos climáticos, tais como chuva, ou ao proporcionar proteção à comunidade dos agentes antimicrobianos produzidos por concorrentes locais. Em resumo, a notável capacidade de BslA para formar uma película sólida, altamente ordenada e estável situada na interface ar-água, permite o encapsulamento de toda a comunidade de microrganismos em uma capa protetora.

Também o uso de bactérias como agentes de controlo biológico tem recebido mais atenção, uma vez que diferentes estirpes podem suprimir diversas doenças através de diversos modos de ação (WANG et al., 2014). Serenade® e Rizos® são produtos biológicos comerciais derivados

da estirpe *B. subtilis* QST 713 e que possuem registro para utilização no Brasil (BETTIOL et al. 2012).

Em trabalho realizado por Kilani-Feki et al., (2013, 2016) avaliou-se a produção de metabólitos antifúngicos produzidos por *Bacillus subtilis* V26 e sua eficiência na supressão de *Botrytis cinerea*, principal causador de podridão em tomateiro, o mesmo isolado também demonstrou alta atividade antifúngica contra diversos fungos. O sobrenadante da cultura V26 mostrou uma forte atividade de inibição do crescimento contra *B. cinerea* com baixa percentagem de concentração (9%), causando várias alterações morfológicas dos micélios.

O tratamento de frutos de tomate por V26 reduziu em 79% as perdas pós-colheitas causadas por *B. cinerea*. *B. subtilis* V26 poderia ser um potencial agente de controle biológico empregado para a proteção do tomate contra a doença pós-colheita. A elevada produção de quitosanase e de metabólitos antifúngicos por *B. subtilis* V26 pode ser útil para várias aplicações industriais e agrícolas. Os metabólitos antifúngicos produzidos por *B. subtilis* V26 foram ainda caracterizados e mostraram-se relativamente estáveis sob altas temperaturas. Esta descoberta sugere que o sobrenadante da cultura V26 provavelmente contém compostos antifúngicos termolábeis que são capazes de inibir o crescimento fúngico.

Em trabalho realizado por Yang et al. (2015), foram isoladas 98 cepas de *Bacillus* a partir de solo rizosférico de trigo. Entre as cepas isoladas, seis mostraram fortes efeitos inibitórios contra o agente patogênico do trigo, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, responsável pela doença conhecida pelo nome de Mal-do-pé do trigo, uma podridão radicular. Uma das estirpes que apresentaram atividade inibitória significativa, YB-05, foi identificada como *Bacillus subtilis*. Quando testado pelo método de dupla cultura em placa e estudos em casa de vegetação, a estirpe YB-05 foi superior ao tratamento químico para o controle do patógeno vegetal *G. graminis* var. *tritici*. Após o cultivo em meio líquida, várias substâncias antimicrobianas no meio de cultura foram detectadas por cromatografia líquida de alta resolução e espectrometria de massa de alta resolução, e a identificação de seus genes correspondentes foi verificada por análise PCR. Seis tipos principais de substâncias antifúngicas foram detectadas por análise de espectro de massa. Estes foram iturina, surfatina, plipastatina, bacilomicina, fengicina e difigidina. Neste estudo da estirpe YB-05, a biossíntese de compostos antimicrobianos era um modo de ação do isolado que possibilitou o controle da doença, o que foi indicado pelos testes *in vitro*.

Diversos trabalhos foram realizados por Araújo (2002), Higaki e Araújo (2012), Mazzuchelli e Araújo (2012) utilizando-se de *B. subtilis* no controle de nematoides em diversas culturas e também verificando os efeitos secundários que o isolado trazia as plantas. Araújo (2008) verificou o aumento da disponibilidade de nutrientes no solo pela ação de estirpes de *B. subtilis* onde foi comprovado maior absorção de nutrientes, como fósforo e nitrogênio, em plantas inoculadas com a rizobactéria nas sementes. Araújo, Hungria (1999) avaliaram o uso do *B. subtilis* na cultura da soja e observaram que houve um aumento na nodulação e no crescimento das plantas, além de um aumento significativo no rendimento da cultura no campo. Segundo os autores, foram observados que a estirpe de *B. subtilis* utilizada apresentou grande produção de fitohormônios (ácido indolacético e indolbutírico) e antibióticos durante seu crescimento.

Trabalhando com milho e algodão em casa de vegetação, Araújo (2008) observou que a inoculação de sementes de milho com *B. subtilis* apresentou potencial para incrementar o crescimento das duas culturas, e sugere a aplicação desta bactéria em condições de campo.

3.4.9 *Bacillus thuringiensis*

Segundo o Manual de Bergey's (LOGAN; de VOS, 2009), *Bacillus thuringiensis* são bactérias anaeróbias facultativas, Gram-positivas, geralmente móveis de 1,0-1,2 por 3,0-5,0 μm , que ocorrem isoladamente ou em pares e cadeias, formando elipsoidal, por vezes, cilíndrico, subterminal, às vezes paracentrais, esporos que não fazem inchar o esporângio, e que podem encontrar-se obliquamente nos esporângios. Os esporângios transportam corpos parasporais adjacentes ao esporo. Esses corpos parasporais ou inclusões proteicas cristalinas possuem atividade entomopatogênica e são produzidos no momento de sua esporulação durante a fase estacionária de seu ciclo de crescimento (BRAVO et al., 1998; MONNERAT, BRAVO, 2000). Esses cristais são compostos por proteínas denominadas δ -endotoxinas ou proteínas Cry (MONNERAT, BRAVO, 2000). Tais proteínas são altamente tóxicas e específicas, tornando-as inócuas para uma série de organismos, incluindo o homem e insetos benéficos (HERRERO et al., 2001, SIEGEL, 2001). Essas inclusões de proteína cristalina se apresentam em forma bipiramidal, cuboide, esférica a ovoide, retangular ou heteromórfica, são formadas fora do exosporium e facilmente se separam do esporo.

Assim como as colônias de *B. cereus*, as de *B. thuringiensis* são muito variáveis na aparência, mas, no entanto, distintas e facilmente reconhecidas: elas são geralmente na cor esbranquiçada a creme, e relativamente grande (2-7 mm em diâmetro). A temperatura mínima para o crescimento é de 10-15 ° C, e a máxima de 40-45 ° C. Algumas cepas podem produzir enterotoxina diarreica (LOGAN; de VOS, 2009). Embora geralmente o termo *Bacillus thuringiensis* seja empregado para uma única espécie, na verdade ele pertence a um complexo de várias espécies fenotipicamente semelhantes a outros membros do gênero grupo *B. cereus*: *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides* e *B. weihenstephanensis*. *B. thuringiensis* se distingue pela sua característica de apresentar cristais parasporais (LUTHY; WOLFERSBERGER, 2000), visíveis em microscopia de contraste de fase.

Essa bactéria pode ser isolada de amostras de solo, água, superfície de plantas, de insetos mortos, teias de aranha e grãos armazenados (BRAVO et al., 1998), tendo sido isolado a partir de todos os continentes, incluindo Antártida (FORSYTH; LOGAN, 2000).

À semelhança de outras bactérias, esta espécie pode manter-se em latência na forma de endósporos sob condições adversas. Estima-se que existam mais de 50.000 estirpes de *Bacillus* spp. em coleções espalhadas pelo mundo (MONNERAT et al., 2001). A pesquisa e inovação aplicadas em novas tecnologias são o foco de diversas instituições de pesquisas em todo o mundo e demonstra a importância dessa bactéria no controle biológico de pragas agrícolas e vetores de saúde pública (MENEZES, 2008).

Até a década de 60, a utilização de *B. thuringiensis* era voltada apenas para o controle de lepidópteros. Somente a partir dos anos 70, estudos comprovaram a eficiência do Bt contra insetos da ordem Diptera, Coleoptera, Hemiptera, Orthoptera. Feitelson et al., (1992, 1993) identificaram em seus estudos a toxicidade do Bt também para algumas espécies de nematoides, protozoários e ácaros.

B. thuringiensis já é uma alternativa útil ao uso de inseticidas sintéticos de pesticidas químicos na agricultura, gestão florestal e controle de mosquitos. É também uma importante fonte de genes para a expressão transgênica para proporcionar resistência a pragas em plantas (SCHNEPF et al. 1998).

Os primeiros trabalhos reconheceram a presença de compostos extracelulares que contribuem para a sua virulência, incluindo fosfolipases, toxina termo-lábil, e β -exotoxinas. Caracterização mais recente mostrou que as proteases, quitinases e as proteínas inseticidas

vegetativas secretadas (VIPs) podem contribuir para a virulência. Também podem produzir compostos antibióticos que têm atividade antifúngica (STABB et al. 1994), porém, as toxinas Cry são, as mais proeminentes por possuírem grande fator de virulência que permitem o desenvolvimento das bactérias em larvas de insetos mortos ou debilitados (SCHNEPF et al. 1998).

Os mecanismos de ação das proteínas Cry foram descritas, principalmente, utilizando-se trabalhos com insetos da ordem Lepidoptera (KNOWLES; DOW, 1993; MARTINS, 2009). São, atualmente, conhecidas como toxinas formadoras de poro (PFT) que causam lise das células, levando a um choque osmótico (JAMES, 2009; BRAVO *et al.*, 2011). O processo pode ser dividido em várias etapas: solubilização e processamento das toxinas, união ao receptor, inserção na membrana, agregação, formação do poro e citólise.

De forma geral o mecanismo de ação das proteínas Cry de *B. thuringiensis* envolvem a solubilização do cristal no intestino médio do inseto, com subsequente ativação das protoxinas solubilizadas pelas proteases intestinais, liberando os polipeptídios tóxicos de 60-70 kDa (BRAVO *et al.*, 2005). Depois de ativadas, principalmente pelas tripsinas, as protoxinas perdem a porção C-terminal e em alguns casos, parte da porção N-terminal, ocorrendo a liberação do fragmento tóxico (parte ativa) (MONNERAT; BRAVO, 2000; RABINOVITCH *et al.*, 2000; BRAVO *et al.*, 2004). Estes fragmentos ligam-se a receptores específicos localizados nas microvilosidades apicais das membranas das células epiteliais do intestino médio dos insetos suscetíveis (HOFMANN *et al.*, 1988; HOFTE, WHITELEY, 1989; BRAVO *et al.*, 1992; PIGGOT; ELLAR, 2007; BRAVO *et al.*, 2007). Após a ligação da toxina Cry nos receptores do intestino médio ocorre a inserção na membrana, levando a formação de poros. Subsequentemente, ocorre à lise das células, rompimento do epitélio do intestino médio, germinação dos esporos, levando a uma septicemia severa e morte do inseto (de MAAGD *et al.*, 2001; BRAVO *et al.*, 2005).

3.4.9.1 Atividade Nematicida de *Bacillus thuringiensis*

As proteínas Cry são classificadas em famílias de Cry1 a Cry75 com base na sua homologia de sequência de aminoácidos. A maioria das estirpes de *B. thuringiensis* pode sintetizar mais de um tipo de cristal. Os cristais podem ser formados por diferentes δ -endotoxinas e o seu peso molecular pode variar entre 13,6 e 142 kDa (CRICKMORE *et al.*, 2007; PRAÇA et al., 2007).

Dentre as toxinas mais estudadas, destacam-se Cry1 e Cry2 com amplo espectro inseticida a lepidópteros. Dentre as 75 famílias, Cry5, Cry6, Cry12, Cry13, Cry14, e Cry21 demonstraram exibir atividade nematicida (GUO et al., 2008).

Em trabalho avaliando a estirpe de *B. thuringiensis* YBT-1518, que apresenta os genes *cry55Aa1* e *cry6Aa2* e o gene *cry5Ba2*, Guo et al., (2008) demonstraram que todas as três proteínas exibiram toxicidade elevada ao nematoide *Meloidogyne hapla*, com CL₅₀ de 23,2 µg/ml, 23,9 µg/ml e 18,1 µg/ml, respectivamente.

Wei et al. (2003), demonstraram que seis nematoides filogeneticamente diferentes: *Acrobeloides* sp., *Caenorhabditis elegans*, *Pristionchus pacificus*, *Distolabrellus veechi*, *Panagrellus redivivus*, foram suscetíveis às proteínas cristalinas de *Bt*, demonstrando assim que o filo Nematoda é um alvo de proteínas cristalinas de *Bt*. Três das proteínas formadoras de cristais, que pertencem à família Cry5, nominadas Cry5B, Cry14A, e Cry21A, e uma das proteínas que pertencem à família Cry6, ou seja, Cry6A, são tóxicas para, pelo menos, quatro espécies de nematoides. A toxicidade foi demonstrada mediante intoxicação, alteração no desenvolvimento, na fecundidade e através de ensaios da morfologia intestinal. Além disso, as experiências que delineiam a dose tóxica mínima Cry6A salientam a utilidade de *C. elegans* para realizar a análise de estrutura-função das proteínas cristalinas de *Bt* expressa em *Escherichia coli*.

Wei et al (2003), também buscaram verificar se a forma de ação da proteína Cry aceita para insetos é a mesma para nematoides. Para estabelecer isso, os nematoides utilizados foram alimentados com cada uma das quatro proteínas cristalinas tóxicas (Cry5B, Cry6A, Cry14A e Cry21A) quando estavam na fase larval L4 de todas as cinco espécies de nematoides e, em seguida, a morfologia do intestino anterior foi examinada. Os autores encontraram boa correlação entre a suscetibilidade de nematoides, tal como determinado pelo ensaio de placa, com uma aparência alterada para o intestino do nematoide. Por exemplo, o intestino de *C. elegans* foi danificado por todas as quatro proteínas cristalinas enquanto que o intestino de *Acrobeloides* parece ser significativamente danificado somente por Cry6A. Indicações de intoxicação incluem constrição e desgaste de células intestinais, o encolhimento do intestino a partir da parede do corpo, vacuolização, e uma aparência degenerativa.

A conclusão mais importante deste trabalho é que proteínas cristalinas de *Bt* têm potencial de controlar nematoides que infectam animais e plantas. A eficácia do Cry5B, Cry14A e Cry21A contra o nematoide parasita animal, *Nippostrongylus brasiliensis*, é promissora, estes

resultados demonstram que um nematoide parasita animal pode expressar os elementos moleculares adequados (por exemplo, proteases de processamento e receptores) para responder a toxinas *Bt*. Em geral, devido à baixa toxicidade das proteínas de cristal de *Bt* para vertebrados, estas podem um dia fornecer um controle seguro, com um bom custo-benefício de nematoides parasitas, como aqueles que infectam mais de um quarto da população humana.

Em estudo realizado por Peng et al., (2011), verificou-se que a combinação das proteínas de cristal nematicidas Cry6Aa-Cry55Aa apresentou toxicidade sinérgica para *M. incognita*, e a toxicidade mais elevada pôde ser observada quando as duas proteínas estavam presentes em uma proporção de 1:1. Relataram também que pode haver diferentes modos de ação para Cry6Aa, Cry5Ba e Cry55Aa em relação a *M. incognita*, por causa de suas estruturas de proteínas diferentes e seus diferentes padrões de ligação às proteínas. Uma explicação do sinergismo observado é que as toxinas atuam no hospedeiro de diferentes formas e podem, assim, agir cooperativamente e mostrar maior toxicidade a *M. incognita* quando combinadas. Este conhecimento pode ser útil ao projetar estratégias de expressão da toxina de *B. thuringiensis* em plantas transgênicas. Quando utilizadas como agentes de biocontrole de plantas, podem ser trabalhadas de tal forma que quantidades equivalentes de Cry6Aa e Cry55Aa sejam produzidos de modo a que a combinação das toxinas torne mais eficaz o controle de *M. incognita*.

Em resumo aos trabalhos de Guo et al. (2008); Yu et al., (2008); Peng et al., (2011), Zhang et al. (2012), trabalhando com as mesmas proteínas cristalinas nematicidas, Cry6Aa2, Cry5Ba2, e Cry55Aa1, obtidas de *B. thuringiensis*, Cry55Aa, apresenta uma massa molecular de 45 KDa, Cry6Aa, apresenta uma massa molecular de 54 Kda e Cry5Ba apresenta massa molecular de 140 KDa, e todas demonstraram toxicidade a *M. hapla*, *M. incognita* e *C. elegans*.

Zhang et al. (2012), objetivaram monitorar a via de entrada de proteínas cristalinas em *M. hapla*, sabendo que os tubos de alimentação do nematoide agem como peneiras moleculares com limites de exclusão. Por exemplo, *Heterodera schachtii* é declaradamente incapaz de ingerir proteínas maiores do que 28 kDa, enquanto que *M. incognita* são capazes de absorver uma proteína de 79 kDa *in vivo* (LI et al. 2008). No entanto, não se sabe ainda qual é o limite de exclusão molecular do nematoide *M. hapla*. Vários tipos de proteínas cristalinas de *Bacillus thuringiensis* mostraram toxicidade para *M. hapla*. Os juvenis de segundo estágio (J2) foram tratados com proteínas de cristal nematicidas marcadas com NHS-rodamina (Cry55Aa, Cry6Aa e Cry5Ba) e associadas ao uso de resorcinol, utilizado neste experimento para estimular a

absorção de substâncias presentes no meio pelo estilete do nematoide. Após isso foi feita observação ao microscópio. A análise revelou que estas proteínas formadoras de cristais foram modificadas para tamanhos moleculares diferentes depois de serem ingeridas. A eficiência de absorção das proteínas cristalinas pelos J2s de *M. hapla* diminuiu com o aumento da massa molecular da proteína. Zhang et al., (2012) revelam que as proteínas de cristal nematicida de até 140kDa entraram em J2 de *M. hapla* via o estilete, porém, com concentração muito baixa (17,2%). Além disso, os autores não avaliaram proteínas maiores do que 140 kDa. Esse trabalho demonstra implicações importantes na concepção de uma abordagem visando resistência por transgenia para controlar nematoides formadores de galhas.

Sobre as proteínas com potencial nematicida, Cry5B tem sido extensivamente estudada em termos da sua atividade e modo de ação em trabalhos anteriores (MARROQUIN et al. 2000; WEI et al. 2003; GRIFFITTS et al. 2001, 2005). Tal como outras proteínas Cry inseticidas, a estrutura de Cry5B mostra uma tipologia de três domínios conservados, sugerindo um modo de ação comum (HUI et al., 2012). Na verdade, utilizando o nematoide de vida livre *C. elegans* como um modelo, os investigadores têm descrito que o modo de ação de Cry5B envolve a ligação da toxina a glicolípídeos e a formação de poros no intestino de *C. elegans* (GRIFFITTS et al 2001, 2005; KHO et al. 2011). Estes estudos fornecem uma nova explicação molecular para a atividade das toxinas proteicas de *B. thuringiensis* contra invertebrados (GRIFFITTS et al., 2005).

3.5 Bactérias promotoras de crescimento vegetal

Inicialmente, restrito a inoculação de sementes de leguminosas com *Rhizobium*, o manejo da população bacteriana da rizosfera avançou hoje em direção ao conceito de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPR - Plant growth-promoting rhizobacteria) (LALANDE et al., 1989). São bactérias com capacidade de colonizar as raízes e de exercerem efeitos benéficos no crescimento e desenvolvimento das plantas (CHOUDHARY; JOHRI, 2009; CAIXETA, 2015), sendo objeto de estudo devido aos efeitos produzidos em culturas comercialmente importantes (BENEDUZI et al., 2008).

Vários estudos demonstraram os benefícios de PGPR no crescimento e rendimento de diferentes culturas em diferentes climas, solos e temperaturas. Por exemplo, o rendimento de grãos e biomassa total de trigo inoculado com o PGPR *Azorhizobium caulinodans* aumentou

em 34 e 39%, respectivamente (WEYENS et al. 2009). A inoculação de milho com *Pseudomonas alcaligenes*, *B. polymyxa*, e estirpes de *Mycobacterium phlei* aumentaram significativamente o peso seco da parte aérea, a massa seca da raiz e a matéria seca total do milho em até 38% (EGAMBERDIEVA, 2008). Beneduzi et al. (2008) isolando microrganismos promotores de crescimento em zonas de produção de arroz do Estado do Rio Grande do Sul relataram que o isolado SVPR30, identificado pela análise da sequência do gene 16S rRNA como uma linhagem de *Bacillus* sp., foi escolhido para experimentos em estufa in vivo e provou ser muito eficiente na promoção de crescimento apresentando um aumento significativo nas raízes e parte aérea de plantas de arroz.

PGPR são encontrados em vários gêneros, incluindo *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Rhizobium* e *Serratia* (STURZ et al., 2000; SUDHAKAR et al. 2000; ANANDARAJ; DINESH 2008; LIU et al. 2013)

Os mecanismos de PGPR não são totalmente compreendidos, mas acredita-se que inclua o seguinte: a) produção de hormônios vegetais; (b) fixação de nitrogênio; c) solubilização de fosfato inorgânico e mineralização de fosfato orgânico; e (d) antagonismo a microrganismos fitopatogênicos pela produção de sideróforos, síntese de antibióticos, enzimas ou compostos fungicidas, bem como competição com microrganismos nocivos (WEYENS et al. 2009; KARAKURT et al. 2011; LIU et al. 2013).

O primeiro objetivo ao considerar a inoculação de plantas com PGPR é encontrar a melhor linhagem de bactérias ou um consórcio microbiano para o efeito pretendido na cultura-alvo (BASHAN et al., 2014). As bactérias que apresentam mais de uma característica para a promoção de crescimento são almejadas para uma possível aplicação em campo (VERMA et al., 2001).

3.5.1 Produção de Sideróforos

Sideróforos são definidos como ligantes específicos de Fe^{3+} , sendo amplamente produzidos por espécies aeróbicas e facultativamente por espécies anaeróbicas, onde eles desempenham a função de sequestrar e transportar o Fe^{3+} . São quelantes de baixo peso molecular (400- 2000 g/mol), excretados sob condições de deficiência de ferro, por fungos e bactérias com a função

de incorporar este mineral no metabolismo celular na forma absorvível por estes microrganismos Fe^{2+} (BENITE et al. 2002).

O complexo ferro-sideróforo não é prejudicial para as plantas, sendo que algumas conseguem capturar esse complexo para dentro de suas células, onde o ferro é liberado e disponibilizado para os processos biológicos (CROWLEY et al., 1988), além de inibir o crescimento de microrganismos patogênicos para as plantas (SHARMA; JOHRI, 2003; CAIXETA, 2015). A produção de sideróforos confere vantagens competitivas ao PGPR, que pode colonizar raízes e excluir outros microrganismos desse nicho ecológico (HAAS; DÉFAGO, 2005).

3.5.2 Produção de Fitohormônios

O exemplo mais estudado de fitohormônios é o hormônio auxina, primeiro hormônio de crescimento a ser descoberto em plantas, sendo o ácido indolacético (AIA) a principal auxina em abundância e relevância fisiológica (TAIZ; ZEIGER, 2004). Além disso, outros hormônios bem como certos voláteis e o cofator Pirroloquinolina quinona (PQQ) estimula crescimento da planta. O hormônio promotor do crescimento da raiz a auxina, presente no exsudato radicular, é geralmente sintetizado a partir do aminoácido exsudado triptofano.

A concentração de triptofano em exsudato difere fortemente entre plantas (KAMILOVA et al. 2006). A inoculação de sementes com a estirpe produtora de auxinas *P. fluorescens* WCS365 não resultou em aumento na massa da raiz ou na parte aérea do pepino, pimentão, ou tomate, mas levou a um significativo aumento na massa da raiz de rabanete. O rabanete produz pelo menos nove vezes mais triptofano no seu exsudado por plântula do que o pepino, o pimentão ou o tomate (LUGTENBERG; KAMILOVA 2009). Experimentos com a adição de nitrogênio inorgânico sugeriram que a promoção do crescimento das plantas é causada pela produção fatores de crescimento de planta, como AIA, giberelinas e citocininas, e não possuindo relação com a fixação de nitrogênio (OKON et al. 1998; LUGTENBERG; KAMILOVA 2009).

O AIA é estruturalmente relacionado ao aminoácido triptofano sendo identificado como a principal molécula precursora da biossíntese de AIA em bactérias (TSAVKELOVA *et al.*, 2006). A biossíntese de AIA por triptofano pode ocorrer por duas vias distintas, uma catalisada pela enzima chamada ipdC ou IpyA (índole-3pyruvate descarboxylase) (LEBUHN;

HARTMANN, 1993) e outra pela enzima IAM (indol-3-acetaldeído) (BROEK *et al.*, 1999; CAIXETA, 2015).

Em plantas existem 3 rotas identificadas: (rota do ácido indol 3-pirúvico, rota da triptamina e rota do indol-3-acetonitrila) podendo ainda existir uma via independente do triptofano, demonstrando a importância desse hormônio no desenvolvimento vegetal (TAIZ; ZEIGER, 2004).

3.5.3 Solubilização de fosfato

O fósforo (P) é um nutriente essencial às plantas, mas, em geral, encontra-se em baixa disponibilidade no solo, sendo necessárias altas dosagens de adubos fosfatados para a obtenção de alta produtividade (RAIJ, 1991; SILVA FILHO; VIDOR 2000).

Essas adubações são realizadas principalmente com fosfatos solúveis em água, atingindo dosagens de fósforo muito superiores às necessidades das culturas, pois a maior parte do adicionado torna-se indisponível às plantas (RIEDER, 1986). Os microrganismos solubilizadores de fosfatos desempenham importante papel na disponibilização das formas inorgânicas de fosfatos: (cálcio - fósforo, alumínio - fósforo e ferro - fósforo). Onde o aumento do teor de fósforo na solução propicia melhor crescimento e maior rendimento das culturas (RALSTON; MCBRIDE, 1976; KUCEY, 1987; CHABOT *et al.*, 1993; SILVA FILHO; VIDOR 2000).

O uso de microrganismos solubilizadores em inoculantes ou o manejo de suas populações no solo constituem alternativas para a melhoria do suprimento de fósforo para as plantas (SILVA FILHO e VIDOR, 2000).

Entre os gêneros relatados com a capacidade de solubilizar fosfato inorgânico estão *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Flavobacterium* e *Erwinia* (RODRÍGUEZ; FRAGA, 1999; CAIXETA, 2015).

Oliveira *et al.* (2014) consideram que a disponibilidade de P é uma etapa limitante para a nutrição da planta, tendo em vista a habilidade de solubilizar fosfato inorgânico apresentada por bactérias associativas, representando um grande potencial para a promoção do crescimento vegetal.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Microrganismos

4.1.1 Estirpes de *Bacillus thuringiensis*

Nesse trabalho foram utilizadas 16 estirpes de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) pertencentes à Coleção de Bactérias de Invertebrados da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Esta coleção começou a ser implementada em 1987 e possui 2583 estirpes de *Bacillus* spp. As estirpes utilizadas foram: S1930; S2493; S1617; S1615; S2548; S906; S1577; S1620; S2538; S2557; S2558; S2560; S09; S1295; S26; S53.

4.1.2 Demais estirpes de *Bacillus*

As demais espécies de *Bacillus* que foram utilizadas nesse experimento, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* e *B. subtilis*, foram obtidas a partir de produtos comerciais indicados disponíveis no mercado (Tabela 1).

Tabela 1: Produtos utilizados no experimento com seus respectivos fabricantes, princípios ativos, concentração e dosagens recomendadas pelos fabricantes.

Produto	Fabricante	Princípio ativo	UFC/mL	Dose
NemaControl	Simbiose	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	5×10^9	3 mL / kg de semente
Nemix	FMC	<i>B. subtilis</i> + <i>B. licheniformis</i>	$3,2 \times 10^{10}$	200 mL / ha
Nimitz®	Adama	Fluensulfone	---	1 L / ha

4.2 Produto Químico

Uma formulação EC (Concentrado Emulsionável) contendo Fluensulfone (peso molecular: 291,5) a 480 g.L^{-1} foi fornecida pela ADAMA Brasil S/A para realização deste experimento.

4.3 Material Vegetal

Os ensaios foram conduzidos em plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) (grupo Santa Cruz, cv. Santa Clara). Essas plantas foram cultivadas em casa de vegetação para avaliação do efeito dos isolados de *Bacillus* em atuar como organismo promotor de crescimento e de controle biológico de nematoides.

4.4 Nematóide (*M. incognita* e *M. javanica*)

O inóculo inicial de *M. incognita* raça 3 e *M. javanica* foi cedido pelo Laboratório de Nematologia da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, coordenado pela Dra. Regina Carneiro. Os nematoides foram multiplicados em tomateiro (*Solanum lycopersicum*, grupo Santa Cruz, cv. Santa Clara) por 3 meses em casa de vegetação.

4.5 Efeito de estirpes de *B. thuringiensis* na mortalidade de *M. incognita*.

4.5.1 Preparo das estirpes de *B. thuringiensis*

As 16 estirpes de *B. thuringiensis* citadas no item 1.5.1.1 foram cultivadas em meio Embrapa (MONNERAT *et al.*, 2007) a 30°C, por 72 horas, em incubador rotativo (Lab-Line) a 200 rpm. A composição do meio EMBRAPA é descrita a seguir: 8g/l de caldo nutriente, 1 g/l de extrato de levedura, 1g/l de KH₂PO₄; 1 mg/l de CaCO₃; 1 mg/l de MgSO₄.7H₂O; 0,1 mg/l de FeSO₄.7H₂O; 0,1 mg/l de MnSO₄.7H₂O; 0,1 mg/l de ZnSO₄.7H₂O; pH ajustado a 7,0 por adição de NaOH.

Uma gota com cada uma das estirpes de *Bt* foi visualizada em microscópio óptico de contraste de fases com aumento de 100X para observação dos esporos e cristais.

4.5.2 Preparo dos nematoides - obtenção e desinfecção de ovos e juvenis do segundo estágio (J2) de *M. incognita*

Os ovos foram obtidos de raízes de tomateiros cultivar Santa Clara (Kada) contendo galhas, cultivados em casa de vegetação, utilizando-se a técnica de Hussey, Barker (1973). Os resíduos de raízes e impurezas foram separados dos ovos pela técnica de Coolen, D'Herde (1972).

A desinfestação dos ovos foi realizada em câmara de fluxo laminar. Para tal a solução contendo os ovos foi centrifugada por 2 minutos a 3000 rpm, e após isso foi retirado o excesso de água até atingir o pellet formado pelos ovos. Em seguida, o pellet foi pipetado e colocado em um novo tubo Falcon estéril contendo solução de Gluconato de Clorexidina 0,12% (25 mL) acrescido de antibióticos [250 µL penicilina (10 µg/mL) e 250 µL estreptomicina (2,5 g/L)] (MONTALVÃO, 2016). Após 30 minutos em repouso, o volume do tubo foi completado com água destilada até atingir 50 mL e o material foi centrifugado, sendo esse processo de lavagem e centrifugação repetido por três vezes, quando então a suspensão de ovos foi colocada em uma câmara de eclosão montada com uma peneira de tela metálica e papel toalha, acoplados em um recipiente de vidro com seu interior preenchido com água até atingir o nível da peneira. Os juvenis de segundo estágio de *M. incognita* foram obtidos a partir da coleta nestas câmaras de eclosão. Os J2 produzidos nas primeiras 24 h foram descartados, sendo empregados nos ensaios apenas J2 com mais de 24 horas.

4.5.3 Ensaio de patogenicidade *in vitro*

Neste bioensaio foram testadas as 16 estirpes citadas anteriormente. Foram colocados em placas de 6 células, 1680 µL da suspensão de nematoides obtidas da câmara de eclosão com aproximadamente 45 juvenis de segundo estágio (J2) de *M. incognita* e 320 µl (16%) da suspensão bacteriana de *Bacillus*, totalizando 2 mL. As placas foram vedadas com filme de pvc e destinadas a câmara tipo BOD mantidas a 25 °C na ausência de luz. A avaliação foi realizada após 48 h da incubação, sendo acrescentado à solução 12 µL de NaOH 1N (XIANG; LAWRENCE, 2016), para ajudar a diferenciar os nematoides paralisados ou imóveis dos que estão realmente mortos. Utilizou-se um microscópio e lâmina de Petters, e após as contagens, determinou-se as porcentagens dos J2 mortos. Nas testemunhas os J2 foram incubados em água destilada esterilizada.

4.5.4 Determinação do efeito de resorcinol a *Meloidogyne incognita*.

O resorcinol é descrito na literatura como um estimulante de absorção de substâncias do meio pelo estilete do nematoide podendo ser utilizado para auxiliar nos ensaios de toxicidade. Entretanto, as testemunhas dos ensaios preliminares tratados com a dose de resorcinol relatada na literatura para *M. hapla* (ZHANG et al. 2012), apresentaram alta mortalidade. Para se obter

a concentração não letal de resorcinol, realizaram-se ensaios utilizando-se diferentes doses do produto e nematoides juvenis de segundo estágio (J2) obtidos conforme descrito anteriormente. A partir da curva de regressão gerada pela média dos ensaios, verificou-se que a concentração de 0,2% não causava toxicidade aos nematoides.

A partir deste momento foram realizados novos ensaios visando avaliar se esta concentração proporcionaria a ingestão da proteína cry6Aa. Para tal, avaliou-se a mortalidade dos nematoides após 48 horas em contato com as suspensões de *Bacillus thuringiensis* (cry6A) na concentração de 16%, 10% de resorcinol (0,2%) e 74% de suspensão de nematoide contendo aproximadamente 45 nematoides por mL. Nas testemunhas os J2 foram incubados em água destilada estéril. O material foi incubado em câmara do tipo BOD e contado com auxílio de um microscópio ótico. Para a contagem foi adicionado NaOH conforme descrito anteriormente.

Após a padronização, todas as estirpes de *B. thuringiensis* foram novamente testadas utilizando o resorcinol, seguindo a metodologia descrita anteriormente, sendo a mortalidade avaliada após um período de 48 horas.

4.5.5 Ensaio de patogenicidade de *Bacillus* spp. a *M. incognita* em plantas de tomate

As duas estirpes de *B. thuringiensis* que causaram maior toxicidade aos nematoides (S1930 e S906) foram testadas *in vivo*. A atividade das mesmas foi comparada com a dos produtos biológicos NemaControl e Nemix e com o produto químico Fluensulfone (Adama), aplicado de duas formas: 1) por pulverização foliar após o estabelecimento da muda (Adama1 – AD1); por pulverização da cova de plantio (Adama 2 – AD2).

O experimento foi conduzido no período entre agosto e outubro de 2017, em cultivo protegido na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – Brasília/DF, cujas coordenadas geográficas são: 15°73'10" (latitude sul) 47°90'13" (longitude oeste), e altitude média de 1.014m. A precipitação e a temperatura média anual são de 1.460 mm e 21,3° C, respectivamente. Os dados de temperaturas médias mínimas e máximas e precipitação pluvial durante o estudo foram coletados na estação meteorológica da Instituto Nacional de Meteorologia, localizado em Brasília/DF (Figura 3).

O ensaio foi montado em esquema fatorial 2X6, 2 espécies de nematoides e 6 tratamentos mais um tratamento controle, com 5 repetições para cada tratamento. As estirpes foram produzidas de acordo com o item 2.5.1. As sementes de tomate foram plantadas em bandejas de isopor devidamente sanitizadas, e posteriormente, foram transplantadas para sacos plásticos

contendo 2 litros de solo autoclavado mais substrato estéril na proporção de 1:1. As plantas foram adubadas com 3 gramas da formulação de N-P-K (15-09-12) mensalmente, e a cada 15 dias foram realizadas pulverizações com adubação líquida de N-P-K (08-08-08) acrescido de micronutrientes.

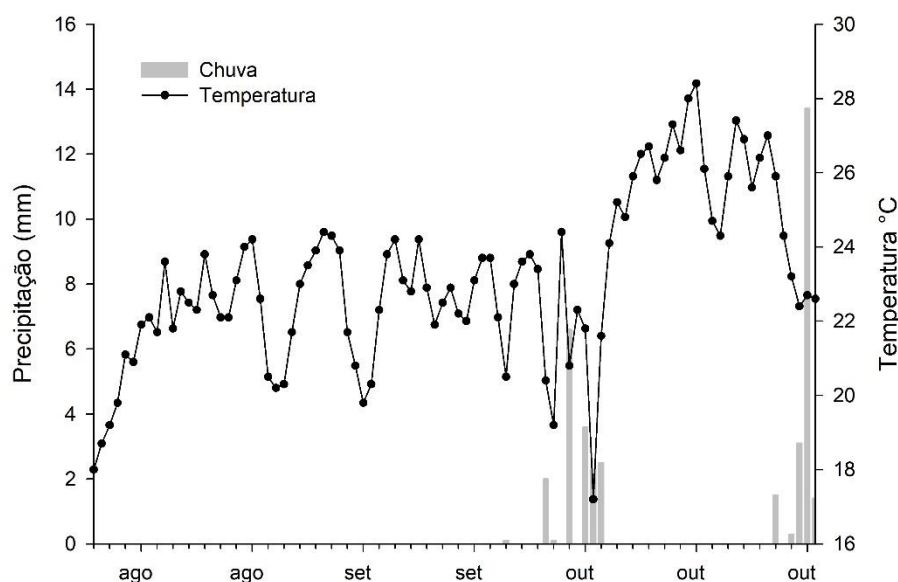


Figura 3. Precipitação pluviométrica e temperaturas máximas e mínimas ocorridas em Brasília nos meses de agosto a outubro de 2017. *Dados obtidos de estação automática INMET.

Os nematoides *M. incognita* e *M. javanica* foram obtidos a partir de plantas de tomate cultivar Santa Clara (Kada) conforme descrito anteriormente. Os nematoides foram inoculados nas plantas aos 20 dias após o transplante (DAT), sendo inoculados aproximadamente 6.000 ovos por vaso, distribuídos em três covas equidistantes, com aproximadamente 2 cm de profundidade. A testemunha recebeu apenas os nematoides. Foram feitas três aplicações das bactérias testadas: 1) no momento do plantio; 2) no momento da inoculação do nematoide; 3) 20 dias após a segunda. Nestas aplicações cada unidade experimental recebeu 5 mL de cada estirpe na proporção de 107 UFC/mL.

O experimento foi avaliado aos 45 dias após a inoculação dos nematoides. Ao término do período do ensaio, foram avaliados a massa fresca da raiz, o índice de galhas, o índice de massa de ovos, o número de ovos e o fator de reprodução do nematoide, calculado da seguinte forma: $FR = \text{População Final} / \text{População Inicial}$.

Para as variáveis índice de galhas e índice de massa de ovos utiliza-se uma escala padronizada por Hadisoeganda e Nasser (1981) (Tabela 2).

Tabela 2: Escala de massa de ovos e número de galhas de Hadisoeganda e Nasser, (1981).

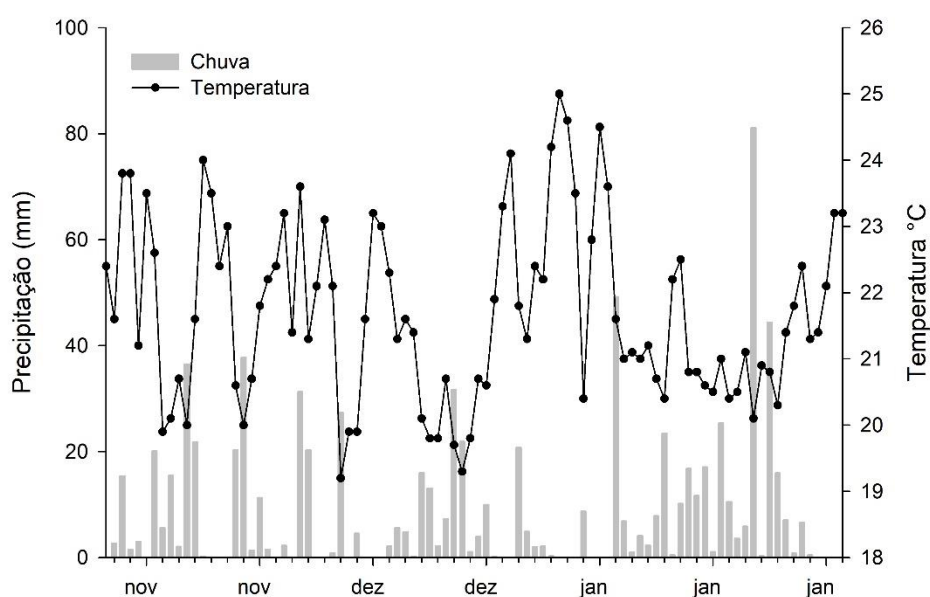
Escala	Contagem do número de galhas ou massas de ovos
0	Sem galhas ou massas de ovos
1	1-2
2	3-10
3	11-30
4	31-100
5	>100

Os sistemas radiculares das plantas foram limpos em água, pesados e depois coloridos em Floxina B a 0,005% para facilitar a identificação das massas de ovos (HADIOSEGANDA; SASSER, 1981). Após as contagens, os sistemas radiculares foram processados pelo método de Hussey e Barker (1973), para obtenção dos ovos.

As raízes dos tomateiros foram cortadas em fragmentos de aproximadamente 2 cm, colocadas em liquidificador com NaOCl (0,5%) e trituradas por 40 segundos em alta rotação. Após esse processo, a suspensão foi vertida em peneiras sobrepostas de 0,840, 0,150 e 0,025 mm para eliminação dos fragmentos maiores de raízes, após a lavagem, o material que ficou retido na última peneira foi coletado formando uma suspensão de volume conhecido (100 mL), as amostras processadas foram armazenadas em recipientes de vidro com tampa e refrigeradas a $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ até o momento da leitura. Para isso, a suspensão de ovos a ser determinada, foi homogeneizada com o auxílio de uma pipeta de Pasteur e após a homogeneização 2 mL dessa suspensão foram transferidos para proveta de 100 mL e completado seu volume para 50 mL com adição de água de torneira. Após a diluição na proporção de 1:25 essa suspensão foi transferida para um béquer de 200 mL de capacidade onde foi realizada uma nova homogeneização para contagem em câmara de Peters. A contagem foi realizada três vezes e a média dessas contagens serviu como base para o cálculo da concentração de ovos da amostra. Feito todo esse procedimento, calculou-se o fator de reprodução conforme descrito anteriormente.

4.6 Ensaio de promoção de crescimento no estágio vegetativo de plantas de tomate após inoculação por isolados de *Bacillus* spp.

O experimento foi conduzido no período entre novembro de 2017 e janeiro de 2018, em cultivo protegido na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – Brasília/DF. Os dados de temperaturas médias mínimas e máximas e precipitação pluvial durante o estudo foram coletados na estação meteorológica da Instituto Nacional de Meteorologia, localizado em Brasília/DF (Figura 4).



Sementes da cultivar de tomate Santa Clara foram semeadas em bandeja de isopor e as mudas foram mantidas em casa de vegetação até atingirem o ponto de transplante, em torno de 20 a 30 dias após a semeadura. As estirpes foram produzidas de acordo com o item 2.5.1. A suspensão bacteriana das estirpes foi padronizada após a contagem de Unidades Formadoras de Colônias realizadas em triplicata, determinou-se a concentração de 10^7 UFC/mL. No momento do transplante das mudas, estas tiveram seus sistemas radiculares mergulhados na suspensão bacteriana por aproximadamente 15 segundos, para que estas pudessem entrar em contato com todo o sistema radicular da planta. Após esse procedimento, as mudas transferidas para sacos plásticos de 2 litros contendo solo estéril acrescentado de substrato vegetal PlantMax® na proporção de 1:1 (v/v).

A altura das plantas foi medida inicialmente aos 20 DAT e após isso foram realizadas medições semanais até se atingir 75 DAT.

Ao fim do experimento foram mensuradas as massas frescas das raízes. Sequencialmente, as raízes foram destinadas a estufa de secagem a $60 \pm 2^\circ\text{C}$ por 72 horas (MONTALVÃO, 2016), concluído o período de secagem, o material foi retirado da estufa e destinado à pesagem novamente.

4.7 Detecção da presença de genes relacionados a promoção de crescimento de plantas em estirpes de *Bacillus* spp.

As estirpes testadas durante o ensaio em casa de vegetação e os produtos biológicos utilizados foram testados quanto à presença de genes relacionados ao crescimento vegetal. Para tal, foram caracterizadas via PCR para detecção dos genes da fosfatase ácida (metabolismo de solubilização de fosfato); sideróforos (capacidade de produzir complexos com ferro) e iam1, iam2 e ipdC (produção de ácido indol-acético).

Os iniciadores e a temperatura de anelamento usados estão descritos na Tabela 3. O DNA foi extraído utilizando a metodologia descrita por Bravo et al. (1998). Para tal, as estirpes foram cultivadas em meio Ágar Embrapa (MONNERAT et al., 2007) a 30°C por 16 horas. Após o crescimento, uma alça (usando se alça de platina - \emptyset : 0,5 mm) da bactéria cultivada foi colocada em 100 μL de água destilada estéril em um micro tubo.

Tabela 3. Característica dos iniciadores utilizados para detecção dos genes *fosfatase ácida* (metabolismo de solubilização de fosfato); *sideróforos* (capacidade de produzir complexos com ferro) e *iam1*, *iam2* e *ipdC* (produção de ácido indol-acético) em estirpes de *B. thuringiensis*.

Gene alvo	Sequência dos iniciadores (5' → 3') *	T _m (°C)	Nome do iniciador	Tamanho esperado do fragmento amplificado	Referência
Biossíntese de proteínas Sideróforos	GAGAATGGATTACAGAGGAT (d) TTATGAACGAACAGCCACTT (r)	55,5	Sider-F Sider-R	1730pb	Raddadi <i>et al.</i> , 2008.
Fosfatase ácida (solubilização de fosfato)	AAGAGGGGCATTACCACTTTATTA (d) CGCCTTCCCAATCRCCATAAT (r)	55,5	AcPho-F AcPho-R	734pb	Raddadi <i>et al.</i> , 2008.
Triptofano 2-monooxigenas e (Auxina)	GTGACAGCTTTCTATCGRAA (d) GTCCTTGTTCTTCCCAAATC (r)	55	IAM 1-F IAM 1-R	220pb	Caixeta, 2015
Triptofano 2-monooxigenas e (Auxina)	GGAACATCTTTTAGCTGGAGT (d) TATGCAACTCTTACTCCAGAC (r)	55	IAM 2-F IAM 2-R	191pb	Caixeta, 2015
Indole piruvato descarboxilase (auxina)	GGATAAAATGCTWCTACATGCC (d) CAGTGTAGGGATGRATTCWAT (r)	55,5	ipdC-F ipdC-R	350pb	Caixeta, 2015

* Nos iniciadores degenerados, a sequência é dada de acordo com código para DNA degenerado: K = G ou T; M = A ou C; W = T ou A; Y = C ou T; N = A, C, G ou T; R = A ou G. Iniciadores desenhados.

Após serem vigorosamente homogeneizadas em homogeneizador tipo “vortex”, as amostras foram congeladas por 20 minutos a -80 °C, em seguida, fervidas a 100 °C por 10 minutos e resfriadas em gelo por 2 minutos. Após este procedimento as amostras foram centrifugadas 14.000 rpm por 5 minutos (Hettich Mikro 200) e o sobrenadante cuidadosamente transferido sem o sedimento para um tubo novo estéril.

Para a realização dos PCRs foi preparado um Mix que consiste em 0,6 µL de dNTP mix (GE Healthcare) (10 mM), 1,0 µL de cada iniciador (IDT) (10 µM), tampão de Taq 1x (GE Healthcare) 2,5 U de Taq DNA polimerase (Amersham) e 5 µL do sobrenadante em um volume total de 30 µL.

O programa de PCR utilizado para a amplificação foi de 94 °C / 5min, 30 ciclos de 94 °C / 1 min, anelamento (vide temperatura de anelamento, Tabela 3), 72 °C / 1 min e 30 s, bem como uma extensão final de 72 °C / 5 min, conforme descrito por Caixeta, (2015).

Para análise do resultado foram aplicados 30 µL do produto de PCR misturados a 5 µL de tampão de corrida 10X em gel de agarose a 1,5%. A corrida de eletroforese foi feita em tampão TBE 1X (Tris base; ácido bórico; EDTA 0,5 M – pH 8,0). Após a eletroforese, o gel foi corado com brometo de etídio a 1µg/mL por 20 minutos e descorado em água destilada por 15 minutos. O gel foi visualizado em transluminador sob luz UV e fotografado em foto-documentador (Eagle Eye, Stratagene).

4.8 Seleção molecular de estirpes de *B. thuringiensis* tóxicas a *M. incognita*

Testaram-se 48 estirpes de *Bt* quanto a presença do gene nematocida Cry6Aa. O DNA das estirpes foi extraído utilizando a metodologia descrita por Bravo et al., (1998) relatada anteriormente.

Os iniciadores usados para cada reação estão descritos na Tabela 4. O programa de PCR utilizado para a amplificação foi de 94 ° C / 5min, 35 ciclos de 94 ° C / 1 min, anelamento, 48,5 °C/1 min, 72 °C / 1 min e 30 s, bem como uma extensão final de 72 °C / 5 min.

Tabela 4: Características do iniciador utilizado para a detecção do gene Cry6 em estirpes de *B. thuringiensis*

Gene Alvo	Sequência dos iniciadores (5' → 3')	Nome do iniciador	Tamanho		Número de acesso no Genbank
			esperado do fragmento amplificado (pb)	T _m (°C)	
Cry6	TCCACCATTCTGCTGAAGTTT (d) TAGCCCATTCTTGTGTTTGA AAA (r)	Cry6AaF	177	48,5	AAA22357
		Cry6AaR			AAM46849
					ABH03377
					AAA22358.1

Para a realização dos PCRs foi preparado um Mix que consiste de 0,6 µL de dNTP mix (GE Healthcare) (10 mM), 1,0 µL de cada iniciador (IDT) (10 µM), tampão de Taq 1x (GE Healthcare) 2,5 U de Taq DNA polimerase (Amersham) e 5 µL do sobrenadante em um volume total de 25 µL.

Para análise do resultado foram aplicados os 25 μL do produto de PCR misturados a 5 μL de tampão de corrida 10X em gel de agarose a 1,5%. A corrida de eletroforese foi feita em tampão TBE 1X (Tris base; ácido bórico; EDTA 0,5 M – pH 8,0). Após a eletroforese, o gel foi corado com brometo de etídio a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 20 min e descorado em água destilada por 15 min. O gel foi visualizado em transluminador sob luz UV e fotografado em foto-documentador (Eagle Eye, Stratagene).

4.9 Análise Estatística

Para a determinação da dose não tóxica de resorcinol foi feita análise de regressão com doses crescentes do produto e taxa de mortalidade, utilizando-se a média de 3 ensaios e com 4 repetições para cada dose. O modelo ao qual os dados mais se ajustaram foi o sigmoide.

Os dados médios de mortalidade de *M. incognita* com o uso de estirpes de *B. thuringiensis* associados ou não com Resorcinol; do fator de reprodução e da promoção do crescimento foram submetidos a análise de variância. As médias de mortalidade de *M. incognita* foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% para a formação dos grupos entre os tratamentos testados, e as médias de fator de reprodução e promoção do crescimento pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade.

Para as variáveis respostas massa fresca e massa seca da raiz foi inicialmente realizado o procedimento de análise de variância (ANOVA), o modelo avaliado foi $Y \sim T$, onde Y é a variável resposta (massa seca da raiz) e T é o tratamento em questão. Devido à normalidade e homocedasticidade dos dados não terem sido suficientemente evidenciadas com a amostra, foi descartado o modelo ANOVA e foi tentando o ajuste dos dados da amostra via modelos lineares generalizados (GLM). No caso, como as variáveis respostas *massa fresca e seca da raiz* (Y) são contínuas e não nulas, foi construído o modelo GLM da família Gama para $Y \sim T$.

A variável número de ovos por grama de raiz é uma variável referente à contagem e, neste caso, a análise de dados foi realizada usando-se modelos lineares generalizados (GLM) por meio de modelagem com família Poisson e logaritmo de base neperiana como função de ligação.

As variáveis índice de massa de ovos (escala) e índice de galhas são variáveis de natureza ordinal, pois caracterizam intervalos de contagem da massa de ovos aos 45 dias. Foi

inicialmente realizado o procedimento de análise de variância (ANOVA), teste de Tukey, a 5 % de probabilidade.

Por se tratar de variável de natureza ordinal, inicialmente foi tentado o uso de um procedimento de análise via GLM de regressão multinomial de variável resposta ordinal Y (escala da massa de ovos), considerando-se as duas possíveis variáveis explicativas: espécie (E) e tratamento (T). Pelo fato de ter ocorrido poucas observações de dados nas escalas 1 a 4, a execução do modelo GLM de regressão multinomial de variável resposta ordinal não pôde ser executado. Então foi realizado o agrupamento das escalas 1 a 4 para serem comparadas com a escala 5.

A análise básica realizada foi então feita para verificar se em 45 dias a massa de ovos já havia ou não atingido a quantidade igual ou superior à quantidade inicial da escala 5. Assim, o procedimento estatístico adotado foi a realização do modelo GLM de regressão logística com família binomial e função de ligação logit. Assim a variável resposta Y, dicotomizada passou a ser $Y = 0$ para indicar que a massa de ovos é menor que a quantidade inicial da escala 5, e $Y = 1$ para indicar que a massa de ovos é maior ou igual a quantidade inicial da escala 5.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Efeito de estirpes de *B. thuringiensis* na mortalidade de *M. incognita* *in vitro*

5.1.1 Padronização da dose não tóxica de resorcinol e validação do produto

A Figura 5 indica a concentração de resorcinol em porcentagem associado a *M. incognita* considerando uma mortalidade máxima de 15% nos ensaios (linha pontilhada). Os valores de mortalidade foram crescentes à medida que a concentração do produto aumentava. A curva seguiu a tendência sigmoide com um alto valor do coeficiente de determinação (R^2) indicando que o modelo se ajustou bem aos dados encontrados. Dessa forma, levando em consideração o limite prescrito, foi adotado o valor de 0,2% para os ensaios subsequentes. Apesar de serem poucos os trabalhos na área utilizando o resorcinol como indutor de ingestão de proteínas, Huang et al. (2006) utilizou o resorcinol para estimular a captação de dsRNA durante o processo de RNAi (RNA interferente) *in vitro* em J2 de *M. incognita*. Já Zhang et al. (2012), utilizando o nematoide *M. hapla* associando com a proteína Cry6A e com o resorcinol, a dose utilizada nestes ensaios *in vitro* não foi compatível com *M. incognita*, levando quase a totalidade da mortalidade da população. Desta forma, como a concentração a ser selecionada deveria estar abaixo da linha pontilhada que indica o limite máximo de mortalidade, adotou-se uma concentração de 0,2% para os ensaios de validação.

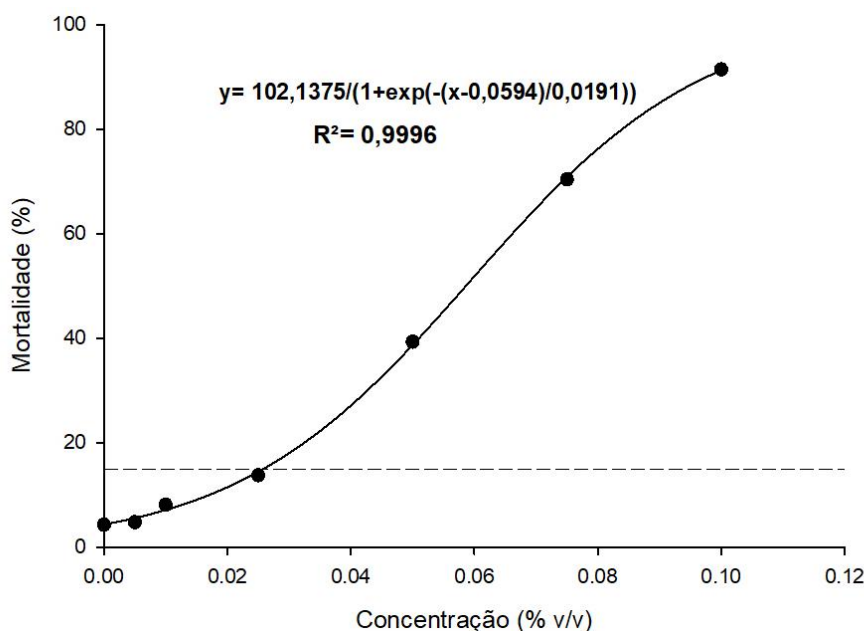


Figura 5. Mortalidade média de *M. incognita* em três ensaios quando submetidos a diferentes concentrações de resorcinol. Linha Pontilhada indica o percentual máximo de 15% de mortalidade.

A partir desse ponto buscou-se saber se esta concentração selecionada manteria as propriedades neuroestimulante do produto. Nos ensaios seguintes onde se associou o resorcinol com a suspensão bacteriana de uma estirpe de *B. thuringiensis* que expressa a proteína nematocida Cry6Aa houve uma mortalidade 3 vezes superior quando comparada ao tratamento estirpe sem resorcinol (Tabela 5). Enquanto que o controle somente com o resorcinol apresentou apenas 4,67% de mortalidade.

Tabela 5. Taxa de mortalidade de *M. incognita* a estirpe tóxica de *B. thuringiensis* quando associada ou não ao resorcinol.

Tratamentos	Mortalidade (%)
Estirpe com resorcinol	28,93 ± 1,48
Estirpe sem resorcinol	8,18 ± 2,04
Controle com resorcinol	4,67 ± 1,76
Controle com água	2,63 ± 0,54

Assim como foi demonstrado por Zhang et al. (2012) a presença do resorcinol estimulou a ingestão das proteínas nematocidas que estavam na solução, melhorando sua atividade nematocida, tendo em vista que houve um aumento de 3,5 vezes na mortalidade.

5.1.2 Ensaio de patogenicidade de *M. incognita* com o uso de estirpes de *B. thuringiensis* associados ou não com resorcinol.

Testaram-se dezesseis estirpes contra *M. incognita* utilizando-se ou não o resorcinol como indutor de ingestão de proteínas (Tabela 6). Percebe-se que na ausência do produto resorcinol, 8 estirpes (S1615, 1577, 1617, S2538, S1620, S1295, S53, 2493) se igualaram estatisticamente ao tratamento controle, não apresentando resultados satisfatórios de mortalidade. Outras sete estirpes apresentaram resultados intermediários diferenciando-se estatisticamente do grupo do controle e apresentando uma mortalidade intermediária entre 8,81 e 17,04% (S09, 2548, 2557, 2558, 2560, S26, S906), por fim, a maior mortalidade obtida sem o uso do resorcinol foi alcançada pela estirpe 1930 com 35,7%.

Analisando a coluna dos tratamentos testados com a adição do resorcinol, 7 estirpes (S2538, 2557, 2558, 2560, S1620, S1295, S53) se igualaram ao controle não apresentando mortalidade considerável mesmo na presença do produto, 8 estirpes (S1615, 1577 S09, 2548, S26, 2493, S906) apresentaram resultados intermediários (letras “b” e “c”) e novamente a estirpe 1930 apresentou o maior valor de mortalidade, 38,87%. Percebe-se que, em geral, os valores de mortalidade na presença do resorcinol foram superiores aos valores encontrados na ausência do produto, ou então iguais estatisticamente. A exceção a este fato ocorreu em relação a estirpe S2557, que teve sua mortalidade reduzida na presença do produto, provavelmente interferindo negativamente em alguma substância produzida pela estirpe.

Tabela 6. Resultados de mortalidade (%) de *M. incognita* em função das estirpes testadas na presença ou não de resorcinol.

ESTIRPE	RESORCINOL	
	SEM	COM
Controle	6,21 Ad	2,99 Ad
S1615	5,38 Bd	21,89 Ab
S1577	4,54 Bd	15,29 Ac
S1617	4,46 Bd	25,11 Ab
S2538	4,59 Ad	8,20 Ad
S09	8,81 Bc	23,06 Ab
S2548	20,28 Ab	20,58 Ab
S2557	9,66 Ac	7,54 Ad
S2558	13,85 Ac	6,28 Bd
S2560	9,75 Ac	6,25 Ad
S1620	3,90 Bd	10,28 Ad
S1295	3,45 Ad	6,04 Ad
S26	12,86 Ac	15,19 Ac
S53	6,19 Ad	8,75 Ad
S2493	2,99 Bd	28,93 Ab
S1930	35,70 Aa	38,87 Aa
S906	17,04 Ab	21,38 Ab

Mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. CV (%) = 28.72

A estirpe S2493, que apresenta o gene *cry6*, que codifica a toxina Cry6 descrita como nematocida (WEI et al., 2003; GUO et al., 2008; PALMA *et al.*, 2014) e que apresentou valor baixo de mortalidade (2,99) na ausência do resorcinol, se destacou, aparecendo no grupo de controle intermediário (28,93) com o uso do produto.

Outra estirpe que demonstrou grande aumento de mortalidade foi a S1617, com um aumento de mais de 5 vezes, onde posteriormente foi detectado que a estirpe apresentou produto de PCR com o primer *cry6* testado anteriormente.

A estirpe que causou a maior porcentagem de mortalidade nos testes *in vitro* foi a S1930, não sofrendo influência da presença ou não do resorcinol, apesar de seu uso ter causado uma maior mortalidade, no tratamento com a adição do resorcinol. A estirpe que também não apresentou produto de PCR com o primer *cry6* testado anteriormente. Percebe-se, por comparação com as estirpes que apresentaram a proteína nematocida que na presença do resorcinol, há um grande aumento de mortalidade, observado na estirpe S2493 e S1617, isso pode indicar que a provável causa da mortalidade para a estirpe S1930 não foi uma proteína nematocida e sim algum metabolito tóxico produzido pela estirpe.

Os resultados de Zheng et al. (2016) demonstram que 120 estirpes de *Bacillus* formadoras de esporos de diferentes famílias compartilham fatores de virulência que podem contribuir para sua capacidade nematocida. *B. thuringiensis*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. firmus*, *B. toyonensis*, *Lysinibacillus sphaericus*, *Brevibacillus laterosporus* e *B. brevis*, foram altamente nematocidas, o primeiro dos quais demonstrou a maior atividade. Foram identificados através da análise do sequenciamento e do genoma muitos fatores potenciais de virulência. Pelo menos quatro mecanismos possíveis foram preteridos a partir da combinação desses fatores e a atividade nematocida bacteriana, incluindo um mecanismo de formação de poros de proteínas cristalinas, um mecanismo semelhante à inibição da turingiensina e um mecanismo de degradação de proteases e/ou quitinases.

Salienta-se que os resultados obtidos e apresentados na tabela 6, devem ser analisados cuidadosamente, principalmente os negativos, devido ao fato que as estirpes analisadas podem não ser tóxicas ao nematoide em estudo, *M. incognita*, porém, podem ser para outras espécies de nematoides. Outro fator de extrema importância, é a concentração utilizada que pode ter sido insuficiente para apresentar efeito nematocida na população testada. Jouzani et al. (2008) realizando bioensaios preliminares *in vitro* demonstraram que a concentração de misturas de esporos-cristal de 22 estirpes selecionadas proporcionaram mortalidade variável entre 0% a 100% contra *M. incognita*. A toxicidade na concentração de 2×10^8 UFC/mL para todos os isolados foi cerca de 10% maior do que quanto utilizado a concentração de 1×10^8 UFC/mL. As estirpes YD5 e KON4 na concentração de 2×10^8 UFC/mL apresentaram toxicidade de 77% e 81% para *M. incognita*, respectivamente. Dessa forma fica evidente a importância da

concentração nos bioensaios de mortalidade *in vitro*, devendo serem testadas outras concentrações superiores as que foram testadas neste experimento, visando realmente selecionar as estirpes com as maiores mortalidades *in vitro* e também descartar as estirpes que não demonstrarem atividade nematocida.

5.1.3 Ensaio de patogenicidade de *Bacillus* spp. a *Meloidogyne* spp. em plantas de tomate

5.1.3.1 Fator de reprodução e número de ovos por grama de raiz

Na Tabela 7 estão representados os dados do fator de reprodução para *M. incognita* e *M. javanica*, avaliado aos 45 dias em função dos tratamentos. Percebe-se que a inoculação realizada no experimento foi bem-sucedida, visto que houve boa multiplicação das duas espécies de nematoides no tomateiro, o qual apresentou fatores de reprodução (Pf/Pi) elevados quando comparados com o inóculo inicial (6.000 ovos) (Tabela 7).

Tabela 7 – Dados do fator de reprodução para *M. incognita* e *M. javanica* aos 45 dias.

Fator de Reprodução			
<i>M. incognita</i>			
Tratamento	Média	CV	Grupo ¹
1930	6.86	27.86	bc
906	11.31	26.13	bc
AD1	0.39	30.82	a
AD2	0.13	61.17	a
Controle	11.81	45.28	bc
NemaControl	9.83	49.08	bc
Nemix	11.92	29.90	bc
<i>M. javanica</i>			
1930	16.30	19.13	c
906	19.30	21.82	c
AD1	3.78	19.12	b
AD2	0.14	44.65	a
Controle	15.03	37.38	c
NemaControl	16.66	13.73	c
Nemix	14.83	38.06	c

¹Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade. AD1: Produto químico pulverizado na parte aérea. AD2: Produto químico pulverizado na cova de plantio.

Pinho (2008), avaliando o efeito do tratamento de sementes de tomateiro com bactérias endofíticas sobre o número de galhas, massas de ovos e ovos de *Meloidogyne incognita* por grama de raiz de tomateiro, com inóculo inicial de 400 ovos por planta e com duração do experimento por 30 dias, relatou que na média de 2 ensaios, a testemunha apresentou 16.312,16 ovos por grama de raiz. Comparando estes resultados com os obtidos neste experimento, percebe-se que nenhuma das espécies avaliadas ultrapassou 2200 ovos por grama de raiz (Tabela 8), podendo indicar um desenvolvimento em condições fora das ideais, como por exemplo, temperaturas máximas e mínimas, ou ainda, a necessidade de obtenção de um inóculo com maior virulência e capacidade de reprodução.

Tabela 8 – Dados número de ovos por grama de raiz para *M. incognita* e *M. javanica* aos 45 dias.

Número de ovos/grama de raiz			
<i>M. incognita</i>			
Tratamento	Média	CV	Grupo ¹
1930	758.00	40.81	bc
906	1159.80	39.03	bd
AD1	41.80	33.12	a
AD2	18.40	58.10	a
Controle	1118.60	48.60	bd
NemaControl	951.60	53.71	bd
Nemix	1108.00	20.76	bd
<i>M. javanica</i>			
Tratamento	Média	CV	Grupo ¹
1930	1818.40	31.12	cd
906	1935.80	25.99	cd
AD1	497.00	18.58	b
AD2	21.00	27.97	a
Controle	1693.80	34.26	cd
NemaControl	2194.60	32.16	d
Nemix	1876.40	44.33	cd

¹Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade.

AD1: Produto químico pulverizado na parte aérea. AD2: Produto químico pulverizado na cova de plantio.

Dados meteorológicos demonstraram que no mês de setembro, data de início do ensaio em casa de vegetação, a temperatura média não foi a ideal, ficando em torno de 22 a 23 ° C (CPTEC/INPE, 2018) e segundo Taylor e Sasser (1978), a faixa ideal de temperatura para o desenvolvimento de *M. incognita* é de 25 a 30 ° C. Além disso, outros fatores que podem

interferir na multiplicação do nematoide são: estresse hídrico, desbalanço nutricional e compactação do solo que podem afetar o seu desempenho e a sua multiplicação mesmo em hospedeiros considerados suscetíveis, tolerantes e resistentes (RIMÉ et al. 2003).

Para a espécie *M. incognita* foi observado que os tratamentos 1930, 906, NEMACONTROL e Nemix apresentaram comportamento semelhante ao controle. Os tratamentos AD1 e AD2 proporcionaram os melhores resultados, apresentando os menores fatores de reprodução, levando inclusive a valores muito baixos, semelhantes aos de plantas com algum grau de resistência ao nematoide ($FR \leq 1$) (HADIOSEGANDA e NASSER 1981; PINHEIRO et al. 2014), o que indica que este produto poderá ser uma boa ferramenta de manejo inicial de nematoides, principalmente quando associado às demais medidas de controle existentes. Vale destacar, que apesar do tratamento S1930 ter sido estatisticamente semelhante ao controle, do ponto de vista biológico, houve uma redução média de quase 30 mil ovos quando comparados ao tratamento controle, o que possivelmente indica alguma reação dos nematoides à presença da bactéria ou a substâncias produzidas por ela. Desta forma, esta estirpe precisa ser testada em outras condições e em outras concentrações para avaliar seu potencial de inclusão no manejo integrado da praga.

Para a espécie de nematoide *M. javanica*, percebe-se que nenhum tratamento biológico foi eficiente e que sua multiplicação em média foi superior à de *M. incognita* indicando uma maior virulência do inóculo, sendo que ambos foram testados nas mesmas condições ambientais. Pinheiro et al. (2009) avaliando a reprodução de *M. incognita* raça 1 e *M. javanica* em linhagens avançadas de tomateiro industrial, também percebeu que no tratamento controle, a multiplicação de *M. javanica* foi superior à de *M. incognita*. Por outro lado, testes realizados em cana de açúcar com estes dois nematoides já citados, demonstraram fatos divergentes. Dinardo-Miranda (1999) constatou uma maior reprodução de *M. incognita* em relação a *M. javanica*, e Barbosa et al. (2009) constataram que a taxa de multiplicação de *M. javanica* ($FR=4,16$) na variedade testada foi muito menor que a de *M. incognita* ($FR=88,20$), porém, os resultados evidenciaram que *M. javanica* foi mais agressivo à variedade SP 91 1049, pois causou maiores danos na variedade testada mesmo em menor número.

Silva et al. (2016) testaram 25 genótipos de cana-de-açúcar com relação ao parasitismo de *M. incognita* e *M. javanica*. O inóculo inicial foi de 9 mil ovos do nematoide/planta e aos 120 dias após a infestação do solo foi feita a avaliação. O FR do nematoide foi superior em *M. javanica* em 16 dos 25 genótipos testados. Já em *M. incognita* a multiplicação foi superior em

9 dentre os 25 genótipos testados. Não foram encontrados genótipos resistentes, com $FR \leq 1$, porém, alguns materiais demonstraram ser tolerantes aos nematoides testados. Percebe-se a complicada relação existente entre cada genótipo avaliado e as espécies de nematoides testadas.

Ferreira et al. (2017) avaliando o efeito de diferentes espécies de *Bacillus* no controle de *M. incognita* e *M. javanica* e no desenvolvimento de plantas de cana-de-açúcar utilizando mudas da variedade RB 86-7515 e testando as bactérias: *B. subtilis* (10 L/ha), *B. firmus* (10 L/ha), *B. amyloliquefaciens* (10 L/ha) e o nematicida carbofurano 350 SC (5 L/ha – tratamento padrão), com inóculo inicial do nematoide de 5.000 ovos e avaliação feita aos 100 e aos 150 dias após a inoculação do nematoide, relataram que todos os tratamentos promoveram o aumento no número de perfilhos. Desta forma, os tratamentos testados proporcionaram bom desenvolvimento vegetativo das plantas, estimulando a produção de brotações laterais, apesar de não terem controlado os nematoides testados. Os autores também observaram maior multiplicação de *M. incognita* em relação a *M. javanica*.

Os dados obtidos neste trabalho são, de certa forma, semelhantes aos encontrados no trabalho de Ferreira et al. (2017), em que nenhum dos tratamentos biológicos conseguiu conter a multiplicação dos nematoides testados. Parte deste cenário pode ser atribuída ao extenso tempo de experimentação (mais de 100 dias) sem o devido aporte de matéria orgânica no solo, comprometendo as condições físicas e ambientais específicas, e não permitindo que as bactérias expressem todo o seu potencial neste longo período de tempo.

Nunes et al. 2010, relataram moderada redução na multiplicação de *M. incognita* na cultura da soja utilizando agentes de controle biológicos e químicos, dentre eles o produto Nemix, testados no tratamento de sementes e com aplicação posterior na parte aérea das plantas com ensaio sendo realizado em casa de vegetação. Já em campo Nunes et al. (2008), relataram que não houve redução do número de juvenis no solo e de juvenis e ovos de *M. incognita* e *Heterodera glycines* nas raízes de plantas de soja mediante tratamento com os produtos biológicos testados.

Vaz et. al. (2011), testando isolados de *B. subtilis* na microbiolização de sementes de tomate, também não obtiveram redução no número de galhas e no número de ovos de *M. javanica* e *M. incognita* em populações puras ou mistas, para nenhum dos tratamentos testados.

Pinho, (2008), estudando o efeito de diversos isolados de bactérias endofíticas nos danos e reprodução de *M. incognita*, e a relação de antagonismo com a colonização de raízes de

tomateiro relatou que dos 39 isolados bacterianos endofíticos testados, 15 reduziram concomitantemente galhas, massas de ovos e ovos por grama de raiz e apenas três não colonizaram as raízes do tomateiro, correspondendo a 80% a taxa de microrganismos que possibilitaram o controle e também colonizaram as raízes das plantas. Dentre as estirpes de *Bacillus* testadas estavam *B. pumillus* e *B. amyloliquefaciens*, as quais também colonizaram, as raízes do tomateiro. Outro isolado de *B. amyloliquefaciens* testado, não reduziu o número de ovos por grama de raiz. Neste mesmo trabalho, utilizando-se plantas de tomate com inóculo inicial de 400 ovos por planta e com duração do experimento por 30 dias, o melhor tratamento relatado foi *Acinetobacter johnsonii* que apresentou como média de dois ensaios o valor de 9.823,67 ovos por grama de raiz. A média da testemunha por sua vez foi de 16.312,16 ovos por grama de raiz havendo redução de 60% neste tratamento, valor que mesmo com uma excelente redução quando comparado ao controle, é considerado muito elevado.

Medeiros et al., (2009) trabalhando com 117 estirpes oriundas da Coleção de Culturas do Laboratório de Bacteriologia de Plantas da UFRPE relatou inconsistência nos resultados onde em um primeiro experimento com bactérias endofíticas encontrou 2 estirpes (ENM7 e ENM10) que se destacaram por seu potencial para controlar a infecção por nematoide das galhas em melão, uma vez que reduziram significativamente o índice de galhas e a massa de ovos e um outro isolado (ENM51) induziu um menor número de massa de ovos. Esses isolados que foram caracterizados como *Bacillus* reduziram o índice de galhas e a massa de ovos em até 40 e 64%. Em um segundo experimento testando novamente as estirpes selecionadas de forma isolada e em conjunto não foi observada nenhuma redução no índice de galhas ou massa de ovos, em desacordo com os resultados observados no primeiro experimento.

Medeiros et al. (2009) justificam ainda que muitos resultados insatisfatórios encontrados podem ser decorrentes do baixo tempo de inoculação, que por ser muito curto, não permitem o estabelecimento da bactéria e a produção de substâncias em concentração suficiente para serem tóxicas aos nematoides.

Neste trabalho, o período da inoculação da bactéria até o momento da infestação com os nematoides foi de 15 dias, e mesmo assim os resultados encontrados não foram os esperados. Dessa forma, estudos futuros devem considerar a microbiolização da semente, de modo a aumentar o tempo de exposição das raízes às bactérias, permitindo que haja o tempo necessário para o estabelecimento e multiplicação, sendo uma nova inoculação feita no momento do transplante. Pode-se pensar também em inocular diretamente o solo, todavia mediante a

presença de matéria orgânica para que o microrganismo testado possa colonizá-la e se multiplique, criando um ambiente supressivo ao nematoide.

5.1.3.2 Massa Fresca da raiz

Para a variável massa fresca de raiz do tomateiro (Tabela 9), percebeu-se que não houve efeito da interação entre as espécies de nematoide e os tratamentos, dessa forma, houve um comportamento semelhante dos dados, independente se a espécie em questão foi *M. incognita* ou *M. javanica*.

Os dados demonstram que a variável massa de raiz foi influenciada pelos tratamentos. As médias foram agrupadas em 2 grupos: os tratamentos biológicos apresentaram os maiores resultados, porém, sem apresentar diferença estatística entre eles e se igualando ao controle, diferindo apenas dos tratamentos químicos que apresentaram os menores valores de massa de raiz.

Tabela 9. Massa fresca da raiz (g) de plantas de tomate infestadas com as espécies *M. incognita* ou *M. javanica* e submetidas a diferentes tratamentos.

Tratamento	Massa de Raiz (g)		
	Média	CV	Grupo ¹
1930	57,05	24.47	a
906	60,8	14.08	a
AD1	51,15	18.01	ab
AD2	40,5	22.53	b
Controle	61,5	31.50	a
NemaControl	56,2	22.60	a
Nemix	57,6	30.71	a

¹Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade. AD1: Produto químico pulverizado na parte aérea. AD2: Produto químico pulverizado na cova de plantio.

Os tratamentos químicos, AD1 e AD2, foram estatisticamente iguais, apresentando os menores pesos de raiz. Este menor peso de raiz pode ser associado a menor reprodução do nematoide sendo que, nos demais tratamentos houve uma maior reprodução do nematoide e um maior peso de raiz, relacionada a quantidade de galhas presentes no sistema radicular.

Nunes et al. (2010), avaliando a massa da matéria seca das raízes de soja após tratamento com os agentes biológicos e o agente químico, relatou que o tratamento químico a base de Aldicarb igualou-se estatisticamente aos demais tratamentos, não influenciando na matéria seca da raiz da soja. Em ensaio utilizando-se de plantas de algodão e testando-se produtos biológicos e um químico, Montalvão (2016), relatou que aos 200 dias de avaliação, o tratamento químico a base do nematicida Furadan influenciou negativamente a massa fresca e a massa seca da raiz do algodoeiro, diferindo, em ambos os casos, dos demais tratamentos testados.

Apesar dos resultados encontrados por Montalvão, normalmente não são encontrados sintomas de fitotoxidez, principalmente porque os produtos são utilizados no sulco de plantio ou no tratamento de sementes, normalmente em doses baixas. Uzuele (2016), em seu trabalho também testou um novo nematicida na soja, milho e algodão, avaliando os possíveis efeitos fitotóxicos do tratamento de sementes nessas culturas e o controle dos seguintes nematoides: *H. glycines*, *M. javanica* e *Pratylenchus brachyurus* na soja, *M. incognita* e *P. zae* no milho, e *M. incognita* no algodão. Nas três culturas os tratamentos foram a base de Imidacloprido + Tiodicarbe, e do novo nematicida Tioxazafem testado em doses crescentes no tratamento de sementes. Os tratamentos testados não apresentaram efeitos fitotóxicos nas culturas testadas, além de uma boa ação nematicida para os nematoides descritos.

Contudo, neste trabalho observou-se que apesar do menor peso de raiz, os tratamentos químicos foram os que garantiram a menor reprodução do nematoide, deixando a planta praticamente isenta dos patógenos por um período de tempo maior.

5.1.3.3 Índice de galhas e índice de massas de ovos

As variáveis índice de galhas e índice de massa de ovos representam uma informação relevante pois os seus valores são utilizados como variáveis que quantificam a reprodução do nematoide. Para estas variáveis utiliza-se uma escala padronizada por Hadisoeganda e Nasser (1981) apresentada na Tabela 2 descrita anteriormente.

O valor máximo da escala é o número 5, obtido quando a raiz em observação atinge 100 ou mais galhas ou massas de ovos, interrompendo assim a contagem. Realizou-se uma análise de variância dos dados e o agrupamento foi feito pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (Tabela 10).

Tabela 10: Valores da escala de Hadisoeganda e Nasser (1981) aplicadas ao número de galhas para *M. incognita* e *M. javanica* em função dos tratamentos.

Índice de galhas			
<i>Meloidogyne incognita</i>		<i>Meloidogyne javanica</i>	
Tratamento	Médias ¹	Tratamento	Médias ²
1930	5 a	1930	5 a
906	5 a	906	5 a
Controle	5 a	Controle	5 a
NemaControl	5 a	NemaControl	5 a
Nemix	5 a	Nemix	5 a
AD1	2.8 b	AD1	4.8 a
AD2	2.2 b	AD2	2.2 b
CV (%)	0,18	CV (%)	0,45

CV: Coeficiente de variação. AD1: Produto químico pulverizado na parte aérea. AD2: Produto químico pulverizado na cova de plantio.

Percebe-se que o comportamento das duas espécies de nematoides foi bastante semelhante, o que também pode ser observado através da distribuição de frequência dos dados amostrados (Figura 6), 77% das amostras apresentando 100 ou mais galhas no sistema radicular, independentemente da espécie de nematoide e dos tratamentos avaliados.

Para as duas espécies de nematoides citadas acima, nenhum dos tratamentos biológicos foi capaz de interferir na formação das galhas. Apenas o controle químico retardou e reduziu a sua formação implicando diretamente no seu FR (Tabela 7).

Pelo fato de haver poucas observações de dados nas escalas de 1 a 4, optou-se por realizar uma análise básica para verificar se em 45 dias o número de galhas já havia ou não atingido a quantidade igual ou superior à nota 5 da escala de Hadisoeganda e Nasser (1981).

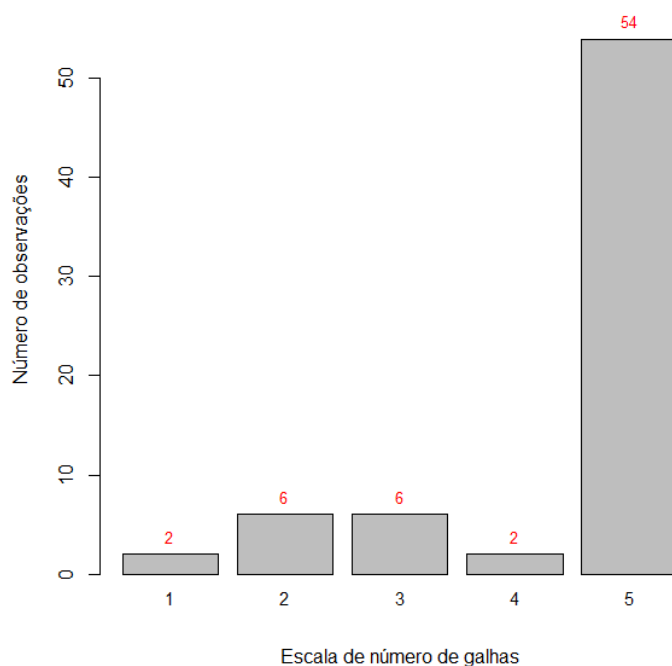


Figura 6. Distribuição de frequência para a variável resposta índice de galhas observada aos 45 dias para as espécies *M. incognita* e *M. javanica*.

Assim a variável resposta Y , dicotomizada passou a ser $Y = 0$ para indicar que o índice de massa de ovos é menor que a quantidade inicial da escala 5 (< 100), e $Y = 1$ para indicar que o índice de massa de ovos é maior ou igual a quantidade inicial da escala 5 (≥ 100).

Tabela 11: Distribuição de frequência de ocorrência de escala 5 de número de galhas por tratamento independente da espécie de nematoide avaliada.

	1930	906	AD1	AD2	Controle	NemaControl	Nemix
$Y = 0$	0	0	6	10	0	0	0
$Y = 1$	10	10	4	0	10	10	10

AD1: Produto químico pulverizado na parte aérea. AD2: Produto químico pulverizado na cova de plantio.

Conforme se observa na Tabela 11, aos 45 dias, o tratamento químico pulverizado na cova de plantio (AD2) apresentou valor abaixo da escala 5, enquanto que o tratamento químico pulverizado na parte aérea (AD1) apresentou pequeno efeito de redução (6 a 4) em termos de apresentação ou não do número de galhas em escala 5. Todas as plantas dos demais tratamentos apresentaram valor 5 na escala após 45 dias da inoculação. Em conclusão, o tratamento AD2 foi o único a “retardar” a quantidade de massa de ovos para valor abaixo da amplitude da escala 5 aos 45 dias, se comparados com os demais tratamentos.

Para a variável índice de massa de ovos os tratamentos químicos diferiram dos demais tratamentos, reduzindo os valores das escalas aplicados às massas de ovos (Tabela 12).

Tabela 12: Valores da escala de Hadisoeganda e Nasser (1981) aplicadas ao número de massa de ovos para *M. incognita* e *M. javanica* em função dos tratamentos.

Massa de ovos					
<i>M. incognita</i> ¹			<i>M. javanica</i> ²		
Fator	Médias	Grupos	Fator	Médias	Grupos
1930	5	a	1930	5	a
906	5	a	906	5	a
CONTROLE	5	a	CONTROLE	5	a
NemaControl	5	a	NemaControl	5	a
Nemix	5	a	Nemix	5	a
AD1	2.4	b	AD1	4	b
AD2	2.2	b	AD2	1.4	c

AD1: Produto químico pulverizado na parte aérea. AD2: Produto químico pulverizado na cova de plantio.

Para a espécie *M. javanica* houve diferença estatística entre os tratamentos químicos, sendo que o tratamento pulverizado na parte aérea (AD1) apresentou resultados de número de massa de ovos superior ao tratamento químico pulverizado na cova de plantio (AD2) e ambos diferindo dos demais tratamentos. No caso do nematoide *M. incognita*, os tratamentos químicos (AD1 e AD2) diferiram dos demais tratamentos sem diferir entre si. O gráfico de distribuição de frequência para massa de ovos (Figura 7) demonstra que 71% das amostras foram atribuídas ao valor 5 na escala, igualando ou ultrapassando o valor de 100 massas de ovos independentemente da espécie de nematoide e dos tratamentos avaliados.

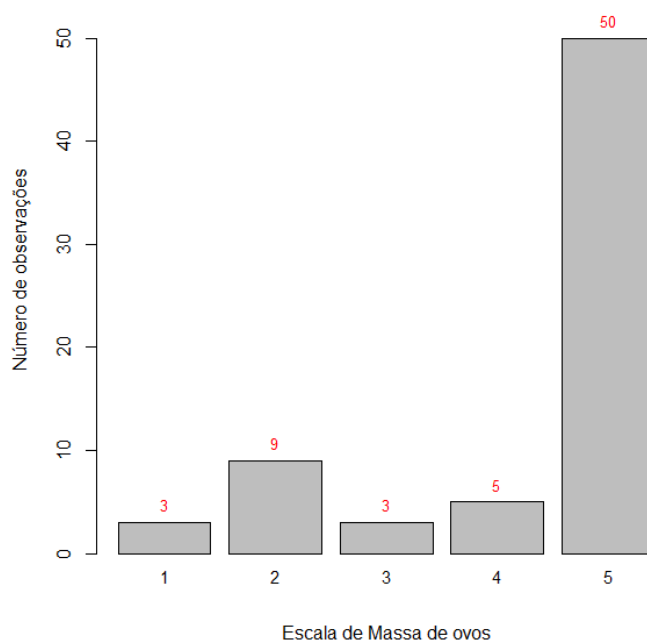


Figura 7. Distribuição de frequência para a variável resposta índice de massa de ovos observada aos 45 dias para as espécies *M. incognita* e *M. javanica*.

Conforme se observa na Tabela 13, aos 45 dias, os tratamentos químicos (AD1 e AD2) apresentaram valor abaixo da escala 5 e todos os demais apresentaram valor da escala 5. Em conclusão, a amostra aponta evidências em favor dos tratamentos AD1 e AD2 ainda “retardarem” a formação de massas de ovos para valor abaixo da amplitude da escala 5 aos 45 dias, se comparados com os demais tratamentos.

Tabela 13: Distribuição de frequência de ocorrência de escala 5 de massa de ovos por tratamento independente da espécie de nematoide avaliada.

	1930	906	AD1	AD2	Controle	NemaControl	Nemix
Y = 0	0	0	10	10	0	0	0
Y = 1	10	10	0	0	10	10	10

Normalmente, valores muito baixos dessas duas variáveis analisadas estão relacionados a plantas com algum grau de resistência aos nematoides em ensaios de competições de variedades. Normalmente, na ausência de galhas não há a formação de massas de ovos e as cultivares testadas podem influenciar na quantidade de massas e na qualidade, influenciando sua viabilidade ou mesmo a quantidade de ovos em seu interior. Semelhantemente, as escalas de notas associadas aos valores encontrados pelos tratamentos químicos pulverizado na parte aérea (AD1) e pulverizado na cova de plantio (AD2) foram bastante satisfatórios.

Através dos resultados obtidos é possível perceber a dificuldade em encontrar isolados que proporcionem uma redução no número de galhas e no número de massa de ovos dos nematoides testados. Por exemplo, Freitas *et al.* (2005) relataram que de 264 isolados de solo rizosférico de tomate testados para controlar *M. javanica* e *M. incognita*, 15 rizobactérias foram pré-selecionadas e apenas 6 diminuíram com sucesso o número de galhas em *M. javanica* e oito isolados em *M. incognita*.

Muitas vezes pode ocorrer ainda o fato de algumas estirpes estimularem ou favorecem estas variáveis analisadas. Nesse sentido, Coimbra e Campos (2005), ao avaliarem 49 rizobactérias para controlar *M. javanica* em tomateiro, encontraram que 69% e 6% dos isolados reduziram e aumentaram, respectivamente, o número de galhas por grama de raiz.

A ocorrência desses fatos não é incomum, Fernandes *et al.* (2013) avaliando o potencial de isolados de *Bacillus* spp. no controle de *M. javanica* em feijoeiro cultivados em casa de vegetação, relatou que no tratamento onde se misturou 4 isolados que estavam sendo testados e também quando usados de forma separada, houve um número de galhas superior ao

encontrado no tratamento controle. Essa situação foi constatada mesmo quando um desses tratamentos tenha apresentado redução em 4 vezes no número de galhas quando comparado ao tratamento controle. Desta forma, constatou-se que houve antagonismo na associação entre os isolados bacterianos testados.

Nunes et al. (2010), em estudo com agentes microbianos e químicos, para controle da meloidoginose em soja, concluíram que apenas o controle químico proporcionou o controle de formas ativas e ovos do parasita. Os resultados demonstraram que nas condições descritas apenas o controle químico foi eficiente em reduzir os coeficientes de reprodução avaliados neste trabalho de forma significativa.

5.2 Ensaio de promoção de crescimento

Através dos dados de alturas de plantas obtidos neste experimento (Tabela 14), foi possível identificar uma diferença estatística entre os tratamentos, indicando um melhor e mais rápido estabelecimento da cultura tratada com estes tratamentos até próximo dos 30 dias após o transplante, quando então, todos os tratamentos se igualaram estatisticamente em altura.

Tabela 14: Efeito dos tratamentos sobre a altura de plantas de tomate nas diferentes avaliações.

Tratamentos	Dias após o Transplante (cm)			
	20	27	35	70
1930	42,16 a	60,17 a	77,83 a	118,66 a
906	32,67 c	51,5 ab	72,17 a	107,5 ab
Controle	30 c	49,83 b	74,5 a	109,33 ab
NemaControl	40,83 ab	55 ab	75 a	108,17 ab
Nemix	44,33a	58,33 ab	72,5 a	101 b
AD	34,5 bc	53,17 ab	73,67 a	117 a
CV (%)	10,30	10,44	7,97	9,78

CV: Coeficiente de variação. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 0,5 % de probabilidade. AD: Tratamento químico pulverizado na parte aérea.

O tratamento que apresentou maior altura de plantas aos 20 e 27 dias após o transplante foi o tratamento com a estirpe 1930, diferindo do controle e dos demais tratamentos. Ao todo, três tratamentos diferiram do controle na primeira avaliação, 1930, NemaControl e Nemix, os demais não diferiram do tratamento controle.

Diversos fatores podem estar associados a estes resultados, como por exemplo, a capacidade da bactéria de colonizar as plantas de forma endofítica, a solubilização de nutrientes, a fixação de nitrogênio, a produção de sideróforos e a produção de hormônios, como a auxina e também de substâncias de defesas, relacionadas a indução de resistência a patógenos.

Jayakumar et al. (2018) trabalhando com um isolado endofítico de *Bacillus* sp. denominado Fc11, isolado de *Curcuma longa*, verificaram diversas propriedades de mecanismos promotores de crescimento e de biocontrole de patógenos. Verificou-se que a estirpe estudada possuía propriedades de produção de ácido indolacético (AIA) e a enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminase, responsável pela degradação de ACC (precursor do etileno) em amônia e α -cetobutirato, capazes de promover o crescimento de plantas através da redução dos níveis de etileno na planta, e também, pela fixação de nitrogênio. Foi verificado ainda que o isolado conseguiu inibir diversos fitopatógenos, tais como, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora infestans*, *Pythium myriotylum*, *Sclerotium rolfsii*, *Colletotrichum acutatum*, *Fusarium oxysporum* e *Corynespora cassiicola* quando cultivados em cultura dupla em placa de petri. Pela análise de cromatografia líquida, a base química de sua atividade antifúngica provou ser devida à produção de iturina A e uma mistura de compostos de surfactina. Além disso, verificou-se que o organismo induziu o crescimento de plantas de feijão de corda (*Vigna unguiculata*), aumentou o comprimento das raízes e sua quantidade e conferiu resistência a doenças *in vivo*.

Desta forma, percebe-se de quantas maneiras pode haver interação entre o microrganismo e a planta. Normalmente em estudos dessa natureza muitos fatores são avaliados de forma isolada, porém, as complexas relações e interações existentes entre as bactérias e as plantas, devem ser estudadas de forma abrangente, visualizando assim formas de se gerenciar ou manejar os estresses bióticos e abióticos que podem ocorrer nas culturas.

5.2.1 Massa fresca e saca da raiz

Após a conclusão do ensaio de promoção de crescimento mediu-se a massa fresca e a massa seca da raiz das plantas. Os resultados obtidos (Tabela 15) demonstraram que não houve diferença estatística no incremento da massa do sistema radicular das plantas pelos tratamentos avaliados.

Tabela 15: Valores de massa fresca e massa seca de raiz de tomateiro.

Massa de raiz (g)			
Massa Fresca		Massa Seca	
Fator	Médias	Fator	Médias
1930	46 a	1930	20,3 a
906	58,8 a	906	25,7 a
Controle	53,5 a	Controle	22,7 a
NemaControl	55,4 a	NemaControl	22,8 a
Nemix	61,4 a	Nemix	29,3 a
AD	55,4 a	AD	24,9 a
CV (%)	36		27,99

CV: Coeficiente de variação. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 0,5 % de probabilidade. AD: Tratamento químico pulverizado na parte aérea.

Egamberdieva et al. (2017) com o objetivo de isolar bactérias endofíticas não-rizobianas dos nódulos radiculares do grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) e avaliar sua capacidade de melhorar o crescimento e o desempenho simbiótico das plantas e controlar a podridão radicular no grão-de-bico sob condições salinas, encontraram um total de 40 isolados bacterianos de tecidos radiculares internos de grão-de-bico. Quatro isolados bacterianos foram selecionados, nomeadamente *Bacillus cereus* NUU1, *Achromobacter xylosoxidans* NUU2, *Bacillus thuringiensis* NUU3, e *Bacillus subtilis* NUU4, que demonstraram possuir características benéficas para a planta e/ou atividade antagônica contra *Fusarium solani*. A linhagem *B. subtilis* NUU4 demonstrou significativa capacidade de promoção do crescimento das plantas, melhorando o desempenho simbiótico da planta hospedeira com rizóbio, aumentando a altura da parte aérea, o número de nódulos, o peso seco da raiz e o peso seco da parte aérea sob condições de solo salino, e ainda promovendo rendimento em solo salino quando comparado ao tratamento controle. Além disso, o isolado bacteriano foi capaz de reduzir a taxa de infecção da podridão radicular no grão-de-bico causada por *F. solani*.

Selvakumar et al. (2008) avaliando as bactérias presentes nos nódulos de Kudzu (*Pueraria thunbergiana*) isolaram e caracterizaram três bactérias promotoras do crescimento de plantas a partir de nódulos esterilizados na superfície da raiz de Kudzu. Com base no sequenciamento do gene 16S rRNA, os isolados foram designados como *Bacillus thuringiensis* KR-1, *Enterobacter asburiae* KR-3 e *Serratia marcescens* KR-4. Em condições *in vitro*, todos os três isolados foram descritos como produtores de ácido indolacético, e de outros atributos de promoção do crescimento de plantas, como a solubilização de fósforo, a produção de cianeto de hidrogênio (HCN), onde segundo o autor, a produção e liberação de HCN por microrganismos rizosféricos tem sido proposta como uma possível linha de defesa contra fitopatógenos. Todos os três isolados em condições de casa de vegetação promoveram crescimento do comprimento das raízes e da parte aérea das plântulas de trigo, com aumento concomitante da biomassa seca da parte aérea e da raiz quando comparadas ao controle e influenciaram positivamente os parâmetros de absorção de nutrientes das plântulas de trigo testadas.

Szilagyi-Zecchin et al., (2015), verificando a atuação da bactéria *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42, na produção de mudas orgânicas de duas cultivares (Santa Clara I-5300 e Cereja 261) de tomateiro mediante a inoculação nas sementes e também investigando as características bacterianas relacionadas com a promoção do crescimento vegetal. Verificaram que a estirpe FZB-42 proporcionou estímulo ao crescimento da parte aérea na concentração de 20% nas plântulas da cv Cereja. Na produção de mudas, a bactéria FZB42 na concentração de 20% promoveu o crescimento enquanto a concentração de 80% o reduziu. A inoculação nas duas concentrações aumentou os teores clorofila *a*, *b* e totais das mudas de tomateiro. Nas raízes das mudas, o volume e a massa seca foram inferiores a testemunha, quando inoculado com FZB42 a 80%. FZB42 na concentração de 20% não diferiu da testemunha, para as três variáveis radiculares avaliadas

Dessa forma, é possível observar que na concentração maior do isolado FZB42, houve influência negativa na massa da raiz. O autor relaciona esses resultados a alta concentração de auxina com consequente indução a produção de etileno, um inibidor do crescimento da raiz. Segundo Taiz e Zeiger (2004) baixas concentrações de auxina promovem o crescimento de raízes, enquanto que altas concentrações inibem o crescimento. Dessa forma, as raízes precisam de uma concentração mínima de auxina para crescerem, porém, são fortemente inibidas na presença de altas concentrações que promovam o crescimento de parte aérea. A estirpe FZB42 apresentou resultados positivos para produção de compostos indólicos e sideróforos, e na dose

de 20%, mostrou-se vantajosa na produção de mudas, ao aumentar a parte aérea em 47,7% na cultivar Santa Clara, e 15,5% na cultivar Cereja, quando comparados à testemunha.

Percebe-se que praticamente todos os tratamentos analisados proporcionaram um bom desenvolvimento inicial da parte aérea das plantas de tomate, porém, o valor médio de massa seca e de massa fresca de raiz não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos. Analisando os resultados e comparando-os aos trabalhos citados anteriormente, pode-se presumir que uma das causas do não incremento da massa fresca e massa seca pode ser a presença de grande quantidade de auxina nos períodos iniciais, o que levou a um rápido crescimento vegetativo e a não produção de raiz em quantidade suficiente para diferir dos demais tratamentos.

5.3 Detecção de genes de produção de crescimento

Através dos dados obtidos e apresentados na Tabela 16 é possível observar que as duas estirpes provenientes do banco apresentam genes relacionados a produção de crescimento. Apesar de apresentar genes relacionados a solubilização de fosfatos e à produção de auxinas, o tratamento 906, não foi capaz de garantir um crescimento inicial tão vigoroso quanto o da estirpe 1930. As demais bactérias oriundas dos produtos biológicos não demonstraram nenhum resultado quanto a presença dos genes testados.

Tabela 16. Caracterização molecular das estirpes de *Bacillus* para a presença dos genes de promoção de crescimento vegetal.

Estirpes	Solubilização de fosfato	Produção de sideróforos	IAM 1	IAM 2
*S29	+	+	+	+
1930	+	-	+	-
906	+	-	-	+
NemaControl	-	-	-	-
Nemix	-	-	-	-

Detecção de genes: + = Detectado; - = Não detectado. * = Estirpe controle. IAM 1 e 2: Precursoras do AIA.

Caixeta (2015), avaliando a capacidade de promoção de crescimento por estirpes de *B. thuringiensis* identificou que as 100 estirpes analisadas não apresentaram capacidade de fixação de nitrogênio, solubilização de fosfato e produção de sideróforos *in vitro*, porém, 100% das amostras foram positivas para a produção de AIA em quantidade que variou de 1,17 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a

7,44 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Das 100 estirpes analisadas 45 apresentaram amplicons esperados para todos os genes avaliados, sendo que 71 estirpes apresentaram amplicons de tamanhos esperados para o gene codificador da enzima fosfatase ácida e 57 foram positivos para os genes da via de síntese de sideróforos. Os genes envolvidos nas rotas de biossíntese do hormônio AIA se mostraram mais frequentes em estirpes de *Bt*, sendo que das estirpes analisadas 91 foram positivas para a presença do gene *ipdC*, 97 para os genes *iam1* e 93 para o gene *iam2*.

Smyth et al. (2011) em seu estudo, relataram que a produção de fatores comumente associados com a atividade de promoção de crescimento avaliados *in vitro* não são fortes indícios dos efeitos de crescimento ou produção em plantas em pleno desenvolvimento. Em particular, o isolado de *Pseudomonas fluorescens* MKB37 que melhorou significativamente o rendimento de grãos, exibiu mineralização de fosfato, produção de sideróforos, produção de protease e atividade da ACC desaminase, mas não teve efeito significativo na promoção do crescimento de plântulas e não produziu auxina *in vitro*. Por outro lado, *Micrococcus luteus* MKB24, que produziu o maior nível de auxina, influenciou significativamente o comprimento do coleóptilo em testes de germinação, mas não teve efeito significativo na promoção de crescimento e aumento do rendimento em condições de casa de vegetação. Da mesma forma, não houve associação entre a atividade da ACC desaminase e a promoção do crescimento das plantas.

Shao et al. (2015) realizando experimentos em casa de vegetação com o isolado SQR9 da espécie *B. amyloliquefaciens* demonstraram que a produção de AIA de forma isolada não pode explicar os efeitos gerais observados no crescimento de plantas, uma vez que sua estimulação pode ser atribuída a múltiplos fatores, incluindo geração de fitohormônios, produção de compostos voláteis e liberação de enzimas extracelulares.

Apesar da falta de correlação entre os resultados dos testes *in vitro* e *in vivo*, a caracterização das estirpes não pode deixar de ser feita, principalmente devido ao grande número de estirpes testadas em avaliações de bioprospecção (BENEDUZI et al., 2008; GOES et al., 2012; CAIXETA, 2015).

Para o desenvolvimento de ferramentas biotecnológicas com microrganismos promotores de crescimento e também controladores de fitopatógenos devem-se realizar inicialmente testes de colonização radicular. Após isso, realizar a avaliação das estirpes em casa de vegetação e em campo, para poder afirmar o seu potencial como bioinoculante agrícola. Lugtenberg e Kamilova (2009) relatam que testes de colonização do sistema radicular das plantas devem ser

realizados com as estirpes testadas como promotoras de crescimento. Dessa forma, somente terão a capacidade de promover o crescimento se conseguirem colonizar e sobreviver na rizosfera plantas.

5.4 Seleção molecular de estirpes de *B. thuringiensis* tóxicas a *M. incognita*.

Os resultados revelaram uma presença muito baixa do gene nematocida *cry6* nas estirpes selecionadas. Apenas uma estirpe apresentou o gene *cry6*, a estirpe S1617, representando apenas 2% do total da amostra analisada (Tabela 17).

De acordo com a metodologia utilizada no trabalho, buscou-se apenas a detecção do gene *cry6*, dessa forma, não se pode afirmar que as estirpes trabalhadas não são produtoras de outras proteínas nematocidas.

Tabela 17. Resultado das estirpes avaliadas para presença do gene *cry6*.

Estirpe	Resultado	Estirpe	Resultado	Estirpe	Resultado
S601	-	S2558	-	S65	-
S906	-	S70	-	S73	-
S907	-	S2538	-	S92	-
S908	-	S1338	-	S89	-
S1705	-	S1577	-	S85	-
S2493	*	S13	-	S75	-
S53	-	S69	-	S93	-
S1450	-	S83	-	S78	-
S2195	-	S1783	-	S86	-
S2193	-	S72	-	S90	-
S09	-	S76	-	S43	-
S1930	-	S74	-	S348	-
S2548	-	S108	-	S256	-
S1617	+	S518	-	S1615	-
S1620	-	S99	-	S1295	-
S1615	-	S278	-	S279	-

- : Sem amplificação; + : Com amplificação. *: Estirpe Controle positivo.

Diferentemente do trabalho de Jouzani et al. (2008) onde foram testados 70 isolados de *Bt* usando 12 iniciadores específicos para os genes *cry5*, *cry6*, *cry12*, *cry13*, *cry14* e *cry21*, que codificam proteínas ativas contra nematoides, e encontraram 22 isolados (31,5%) que contêm no mínimo um gene *cry* ativo contra nematoides. As estirpes contendo o gene *cry6* foram as mais abundantes e representam 22,8% dos isolados. Cepas de *Bt* contendo genes *cry14* também foram abundantes (14,2%). Os genes *cry21* e *cry5* foram menos abundantes, e encontrados em 4,2% e 2,8% das estirpes, respectivamente. Por outro lado, Bravo et al. (1998) analisando com base em PCR multiplex com *primers* gerais e específicos, um total de 496 amostras de *Bacillus thuringiensis* que foram isoladas de 503 amostras de solo coletadas das cinco macrorregiões do México, encontraram que das proteínas que são nematicidas e foram analisadas neste trabalho (Cry5, Cry12, Cry13 e Cry14) nenhuma estirpe carregando os genes *cry5*, *cry12*, *cry13*, *cry14* ou *cry21* foi encontrada.

6. CONCLUSÕES

- Definiu-se uma metodologia de bioensaio *in vitro* utilizando-se *Bacillus thuringiensis* e o resorcinol como indutor de ingestão de proteínas em *M. incognita*.
- Existem estirpes tóxicas ao nematoide *M. incognita in vitro* e que possuem seu potencial aumentado com o uso do resorcinol.
- Os tratamentos biológicos não apresentaram resultados satisfatórios de controle dos nematoides *M. incognita* e *M. javanica* quando testados *in vivo*.
- A estirpe S1617 apresentou resultado positivo para a amplificação do gene *cry6*.
- A estirpe S1930 apresentou resultados satisfatórios na promoção de crescimento vegetal até próximo aos 30 dias após o transplante das mudas de tomate.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

- Estirpes de *B. thuringiensis* que são tóxicas contra *M. incognita* no meio EMBRAPA testadas neste trabalho, precisam ser testadas em novos bioensaios com outras concentrações e também, outros meios de cultura que viabilizem a maior produção de metabolitos secundários para determinar a sua total toxicidade e também realizar ensaios de sinergismos com as estirpes que se mostrarem mais tóxicas.
- Devem ser realizados novos bioensaios com as proteínas purificadas Cry6 oriundas das estirpes S2493 e S1617, associando com o uso do resorcinol para verificar o seu efeito nematicida.
- Estirpes de *B. thuringiensis* possuem potencial para a promoção de crescimento vegetal, sendo necessário realizar ensaios em casa de vegetação com demais culturas para selecionar a melhor estirpe para teste em campo.
- Apesar da detecção dos genes relacionados a promoção de crescimento, devem ser realizados ensaios para mensurar a produção de auxina *in vitro* e a detecção da solubilização de fosfato e produção de sideróforos.
- Os tratamentos biológicos não apresentaram resultados satisfatórios de controle dos nematoides quando testados *in vivo*, porém, a estirpe 1930 foi a que apresentou o menor fator de reprodução na espécie *M. incognita*, sem diferir estatisticamente do tratamento controle, devendo ser novamente testada em outras condições.
- Encontrar estirpes tóxicas a *M. javanica*, sendo que nenhum dos tratamentos biológicos foi capaz de reduzir seu FR.
- Avaliar a toxicidade de estirpes de *Bt* a inóculos iniciais menores dos que foram utilizados neste experimento (6.000 ovos).

8. REFERÊNCIAS

ABRÃO, MARLUCI MUNDIN; MAZZAFERA, PAULO. Efeitos do nível de inóculo de *Meloidogyne incognita* em algodoeiro. **Bragantia**, Campinas, v. 60, n. 1, p. 19-26, 2001.

ABREU, C. L. M. **Controle de *Alternaria solani* em tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) com óleos essenciais**. 2006. 71 f. Tese (Doutorado em Agronomia/Horticultura) Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2006.

ABRIOUEL, H.; et al. Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. **FEMS Microbiol Rev.** v. 35. p. 201-232. 2011.

AGRIOS, G.N.; Plant diseases caused by nematodes. In: GEORGE, N. AGRIOS, F.N. (Ed.). **Plant Pathology**. 4 ed. San Diego: Academic Press, 1997. p.565-597.

ALVARENGA, M. A. R.; **Tomate – Produção em campo, em casa de vegetação e em hidroponia**. P. 367. UFLA, Universidade Federal de Lavras. 2004.

ALVES, F. R; CAMPOS V. P. Efeito do aquecimento do solo na resistência de plantas a *Meloidogyne javanica* e *M. incognita* raça 3. **Nematologia Brasileira**, v. 25 p.153-162, 2001.

AMARAL, D. R.; OLIVEIRA, D. F.; CAMPOS, V. P.; CARVALHO, D. A. Efeitos de alguns extratos vegetais na eclosão, mobilidade, mortalidade e patogenicidade de *Meloidogyne exigua* do cafeeiro. **Nematologia Brasileira**, Campinas, v. 26, n. 1, p. 43-48, 2002.

ANANDARAJ, M.; DINESH, R. Use of microbes for spices production. **Organic spices**. 101-132. 2008.

ANWAR, S. A.; MCKENRY, M. V. Incidence and Population Density of Plant-Parasitic Nematodes Infecting Vegetable Crops and Associated Yield Losses in Punjab, Pakistan. **Pakistan J. Zool.** v. 44, p.327-333. 2012.

ARAÚJO, F. F.; HUNGRIA, M.; Nodulação e rendimento de soja co-infectada com *Bacillus Subtilis* e *Bradyrhizobium Japonicum/Bradyrhizobium Elkanii*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n.9, p. 1633-1643, 1999.

ARAÚJO, F. F.; et al.; Influência de *Bacillus subtilis* na eclosão, orientação e infecção de *Heterodera glycines* em soja. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n.2, p. 197-203, 2002.

ARAÚJO, F. F.; Inoculação de sementes com *Bacillus subtilis*, formulado com farinha de ostras e desenvolvimento de milho, soja e algodão. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, p. 456-462, 2008.

ARAÚJO, F. F.; MARCHESI, G. V. P.; Uso de *Bacillus subtilis* no controle da meloidoginose e na promoção do crescimento do tomateiro. **Cienc. Rural**, Santa Maria. v. 39, n. 5, p. 1558-1561, 2009.

ARGUELLES-ARIAS. A.; et al.; *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens. **Microbial Cell Factories**. v. 8. 2009.

ARNESEN, L.P.S.; FAGERLUND, A.; GRANUM, P.E. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. **FEMS Microbiology Reviews**, v.32, n.4. p.579-606, 2008.

ARNAOUTELI, S.; MACPHEE, C. E.; STANLEY-WALL, N. R.; Just in case it rains: building a hydrophobic biofilm the *Bacillus subtilis* way. **Current Opinion in Microbiology**. v. 34 n.7–12. 2016.

ASH C.; et al.; Comparative analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and related species on the basis of reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. **Int J Syst Bacteriol**. v. 41. p. 343-346. 1991.

BAIS, H. P.; FALL, R.; VIVANCO, J. M.; Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. **Plant Physiol**. v. 134. p. 307–319. 2004.

BAKER, K.F., R.J. COOK; Biological Control of Plant Pathogens. **APS Press**, St. Paul, USA (1982)

BARÀK, I., RICCA, E., CUTTING, M. S. From fundamental studies of sporulation to applied spore research. **Molecular Microbiology**. v.55. n.2. p.330-338. 2005.

BARBOSA, B. F. F.; SANTOS, J. M.; SOARES, P. L. M.; BARBOSA, J. C. Avaliação Comparativa da Agressividade de *Meloidogyne javanica* e *M. incognita* à Variedade SP 911049 de cana-de-açúcar. **Nematologia Brasileira**. v. 33. p. 243- 247. 2009.

BARRONS, K. C., Root-knot resistance in beans. **Jour. Heredity**. v.31. p. 35-38. 1940.

BASHAN, Y.; et al. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). **Plant and Soil**. v. 378. p. 1–33. 2014.

BENEDUZI, A., et al.; Evaluation of genetic diversity and plant growth promoting activities of nitrogen-fixing bacilli isolated from rice fields in South Brazil. **Applied Soil Ecology**. v. 39. n. 3. p. 311-320. 2008.

BENITE, A. M. C., MACHADO, S. P.; MACHADO, B. C. Sideróforos: uma resposta dos microorganismos. **Química Nova**. v. 25. n. 6b. p.1155-1164. 2002.

BETTIOL, W.; et al.; **Produtos Comerciais à Base de Agentes de Biocontrole de Doenças de Plantas**. Embrapa Meio Ambiente. Jaguariúna. 2012

BISCHOFF, K. M.; et al.; Purification and characterization of a family 5 endoglucanase from a moderately thermophilic strain of *Bacillus licheniformis*. **Biotechnol Lett**. v. 28, p. 1761–1765. 2006.

BLOEMBERG, G. V.; LUGTENBERG, B. J. J.; Molecular basis of plant growth promotion and biocontrole by rhizobacteria. **Curr. Opin. Plant Biol**. v. 4. p. 343-350. 2001

BORRIS, R.; et al. Relationship of *Bacillus amyloliquefaciens* clades associated with strains DSM7T and *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* subsp. nov. based on their discriminating complete genome sequences. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** v.61. p.1786–1801. 2011.

BORRIS, R.; *Bacillus*, a plant beneficial bacterium. In: **Principles of Plant-Microbe Interactions**. Microbes for Sustainable Agriculture, ed. LUGTENBERG, B. (Berlin: Springer), p. 379–391. 2015.

BRAND, D., et al., Production of fungal biological control agents through solid state fermentation: a case study on *Paecilomyces lilacinus* against root-knot nematodes. **Micología Aplicada Internacional**. v. 22. n. 1. p. 31-48. 2010.

BRAVO, A.; JANSENS, S.; PEFEROEN, M. Immunocytochemical localization of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins in intoxicated insects. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 60, p. 237-246, 1992.

BRAVO, A.; et al.; Characterization of Cry genes in Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied Environmental and Microbiology**. 4965 – 4972. 1998.

BRAVO, A.; GÓMEZ, I.; CONDE, J.; MUÑOZ-GARAY, C.; SÁNCHEZ, J.; ZHUANG, M.; GILL, S.S.; SOBERÓN, M. Oligomerization triggers differential binding of a pore-forming toxin to a different receptor leading to efficient interaction with membrane microdomains. **Biochem Biophys Acta**. v. 1667. p.38–46. 2004.

BRAVO, A., GILL, S. S.; SOBERON, M. ***Bacillus thuringiensis* mechanisms and use**. In: GILBERT, L.I.; IATROU, K.; GILL, S.S. (eds.), **Comprehensive Molecular Insect Science**, v. 6, Elsevier, p. 175-206. 2005.

BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M.; Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, v. 49, n. 4, p. 423 – 435. 2007.

BRAVO, A.; LIKITVIVATANAVONG, S.; GILL, S. S. SOBERÓN, M. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. **Insect Biochemistry**, v. 41, n.7, p. 423-431. 2011.

BRIDGE, J.; Keynote: Nematodes of bananas and plantains in Africa: research trends and management strategies relating to the small scale farmer. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n.540, p.391-408, 2000.

BRINGEL, J. M. M.; SILVA, G. S. Efeito antagônico de algumas espécies de plantas a *Helicotylenchus multincinctus*. **Nematologia Brasileira**, v. 24, n. 2, p. 179-181, 2000

BROEK, A.V. Auxins upregulate expression of the indole-3- Pyruvate decarboxylase gene in *Azospirillum brasilense*. **Journal of Bacteriology**. v. 181, p. 1338-1342, 1999.

BURKETT-CADENA. M.; et al.; Suppressiveness of root-knot nematodes mediated by rhizobacteria. **Biol Control**. v. 47. p. 55–59. 2008.

CAIXETA, C. F. **Seleção de estirpes de Bacillus thuringiensis tóxicas à Helicoverpa armigera e promotoras de crescimento vegetal**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 82 p. Dissertação de Mestrado. 2015.

CANO, R. J.; BORUCKI, M. K. Revival and identification of bacterial spores in 25- to 40-million-year-old Dominican amber. **Science**. v.268. n. 5213. p.1060-1064. 1995.

CAMPOS, V.P.; SOUZA, J.T.; SOUZA, R.M. **Controle de fitonematoides por meio de bactérias**. In: LUZ, W.C. DA; FERNANDES, J.M.; PRESTES, A.M.; PICININI, E.C. (Eds). Revisão Anual de Patologia de Plantas. Passo Fundo: RAPP, p.285-327. 1998.

CARNEIRO, R. M. D. G.; MORAES, E. C. Avaliação de resistência de cultivares do tomateiro ao nematoide das galhas, em estufa. **Nematologia Brasileira**, v. 1, n. 17, p. 49- 56, 1993.

CARNEIRO, R. M. D. G.; COFCEWICZ, E.T.; The taxonomy of Coffee – Parasitic root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp. In: Souza RM (Ed.) **Plant–Parasitic Nematodes of coffee**. Dordrecht. Springer. p. 87-122. 2008.

CHABOT, R.; ANTOUN, H.; CESCAS, M. P. Stimulation de la croissance du maïs et de la laitue romaine par des microorganismes dissolvant le phosphore inorganique. **Can. J. Microbiol.** v. 39. p.941-947. 1993.

CHEN. X-H.; et al.; Structural and Functional Characterization of Three Polyketide Synthase Gene Clusters in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB 42. **Journal of Bacteriology.** p. 4024 – 4036. 2006.

CHEN X. H.; et al. Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. **Nat Biotechnol** v. 25. n. 9. p. 1007–1014. 2007.

CHITWOOD, D. J. Phytochemical based strategies for nematode control. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, CA, US, v. 40, p. 221-249, 2002.

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

CHOWDHURY, S. P.; et al.; Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42: a review. **Front Microbiol.** v. 6. 2015.

CLEMENTS, L. D.; MILLER, B. S.; STREIPS, U. N.; Comparative growth analysis of the facultative anaerobes *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, and *Escherichia coli*. **Syst. Appl. Microbiol.** v. 25. p. 284–286. 2002.

COIMBRA, J. L.; CAMPOS, V. P. Efeito de exsudatos de colônias e de filtrados de culturas de actinomicetos na eclosão, motilidade e mortalidade de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne javanica*. **Fitopatol. bras.** v. 30, n. 3, p.232-238. 2005.

COOLEN, W.A.; D'HERDE, C.J.; A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue. Ghent: State Agriculture **Research Centre**, 1972.

CRICKMORE, N.; et al. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. Disponível em: <http://www.btnomenclature.info/>. Acesso em: 09 Out. 2016.

CROWLEY, D.E.; REID, C.P.P.; SZANISZLO, P.J. Utilization of microbial siderophores in iron acquisition by oat. **Plant Phys.** v.87. p. 680-685, 1988.

de MAAGD, R. A.; BOSCH, D.; STIEKEMA, W. *Bacillus thuringiensis* toxin-mediated insect resistance in plants. **Trends in Plant Science.** v.4, p.9-13, 1999.

de VOS, P.; et al.; (Eds.) **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.** Vol. 3: The Firmicutes. 2 ed. 2009.

DIDELOT, X.; et al.; Evolution of pathogenicity in the *Bacillus cereus* group. **Systematic and Applied Microbiology**, v.32, n.2. p.81-90, 2009.

DIEESE - Departamento Intersindical de Estatística e Estudos Socioeconômicos. **A Produção Mundial e Brasileira de Tomate.** 2010. Disponível em: < <https://www.dieese.org.br/projetos/informalidade/estudoSobreAproducaoDeTomateIndustrialNoBrasil.pdf> > Acesso em 12 nov. 2016.

DINARDO-MIRANDA, L.L. Reação de variedades de cana-de-açúcar ao parasitismo de *Meloidogyne javanica* e *M. incognita*. **Nematologia Brasileira.** Piracicaba. v. 23. p. 76-83. 1999.

DRIKS, A. *Bacillus subtilis* spore coat. **Microbiology and molecular Biology Reviews.** v.63. n.1. p.1-20. 1999.

DRIKS, A. The dynamic spore. **PNAS**, v.100. n.6. p.3007-3009. 2003.

DUC, L. H., et al. Characterization of *Bacillus* Probiotics Available for Human Use. **Applied and Environmental Microbiology.** v.70. n.4. p.2161–2171. 2004.

DUFOUR, R.; GUERRERA, M.; EARLES, R. Appropriate technology transfer for rural areas: alternative nematode control. **NCAT Agriculture Specialists**. 2003. Disponível em: <www.attra.ncat.org>. Acesso em: 02 de novembro de 2017.

EARL, A. M.; LOSICK, R.; KOLTER, R. Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. **Trends Microbiol.** v.16, p. 269–275. 2008.

EDWARDS, S.J.; KJELLERUP, B.V.; Applications of biofilms in bioremediation and biotransformation of persistent organic pollutants, pharmaceuticals/personal care products, and heavy metals. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 97 p. 9909–9921. 2013.

EGAMBERDIEVA, D.; et al. High incidence of plant growth-stimulating bacteria associated with the rhizosphere of wheat grown in salinated soil in Uzbekistan. **Environ. Microbiol.** v. 10 p.1–9. 2008.

EGAMBERDIEVA, D.; WIRTH, S. J.; SHURIGIN, V. V.; HASHEM, A.; ABD_ALLAH, E. F. Endophytic Bacteria Improve Plant Growth, Symbiotic Performance of Chickpea (*Cicer arietinum* L.) and Induce Suppression of Root Rot Caused by *Fusarium solani* under Salt Stress. **Frontiers in Microbiology**. v. 8. 2017.

EISENBACK, J.D.; TRIANTAPHYLLOU, H.; Root-Knot nematode: *Meloidogyne* sp. and races. In: Nickle, W. R. (ed). **Manual of agricultural Nematology**. v.3, p. 191-274, 1991.

EMMERT, E. A.; HANDELSMAN, J. Biocontrol of plant disease: A (gram-) positive perspective. **FEMS Microbiol. Lett.** v. 171. p.1–9. 1999.

FAO/STAT - Food and Agriculture Organization of the United Nations. Fao Stat, rice production. Retrieved from: <http://www.fao.org/faostat/en/#data>. Access in: 05 Janeiro de 2018.

FEITELSON, J. S.; PAYNE, J.; KIM, L. *Bacillus thuringiensis*: Insects and beyond. **Bio. Technol.**10: 271–275. 1992.

FEITELSON, J. S.; The *Bacillus thuringiensis* family tree. In **Advanced engineered pesticides**. ed Kim L. (Marcel Dekker, Inc. New York, N.Y), pp 63–71. 1993.

FELTRIN, D. M.; et al.; Produtividade e qualidade de frutos de cultivares de tomateiro fertirrigado com cloreto e sulfato de potássio. **Revista Ciências Agroveterinárias**, v. 4, p. 17-24, 2005.

FERNANDES, R. H.; et al. Controle de *Meloidogyne javanica* na Cultura do Feijoeiro com Isolados de *Bacillus* spp. **R. Tróp.: Ci. agr. biol.**, v.7. n.1. 2013.

FERRAZ, L. C. C. B.; D. J. F. BROWN.; An introduction to nematodes, plant nematology. A student textbook. Sofia, Bulgaria: **Pensoft Publishers**. 2002.

FERRAZ, C. C. B.; MONTEIRO, A. R. Nematoides. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). Manual de fitopatologia: princípios e conceitos. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres. v. 1, p. 168-201. 1995.

FERRAZ, L. C. C. B.; MONTEIRO, A. R. Nematoides. In: Bergamim Filho, A., Kimati H.; Amorim L. Manual de Fitopatologia, v.1: Princípios e conceitos. 4 ed. São Paulo: Ceres, cap. 13, p. 277-315. 2011.

FERREIRA, R. J.; SOARES, P. L. M.; de CARVALHO, R. B.; dos SANTOS, J. M.; BATISTA, E. S. P.; BARBOSA. J. C. Espécies de *Bacillus* no controle dos nematoides das galhas e no desenvolvimento de cana-de-açúcar. **Nematropica**. v.47. n.2. 2017.

FILGUEIRA, F.A.R. **Novo Manual de Olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças** – Viçosa, UFV, 2000.

FORSYTH, G.; LOGAN, N. A.; Isolation of *Bacillus thuringiensis* from Northern Victoria Land, Antarctica. **Lett. Appl. Microbiol.** 30: 263–266. 2000.

FREITAS, L. G., et al. Isolamento e seleção de rizobactérias para o controle de nematoides formadores de galhas (*Meloidogyne* spp.) na cultura do tomateiro. **Nematologia Brasileira**. Vol. 29, Nº 2. 215-220. 2005

FUKUMOTO, J. Studies on the production of bacterial amylase. Isolation of bacteria secreting potent amylases and their distribution. **J. Agr. Chem. Soc. Japan.** v.19. p.487-503. 1943.

GIERTH, K.; et al.; Plant tolerance for managing plant parasitic nematodes. **OILB / SROP Bulletin**, v. 27, p. 67-73. 2004

GIORDANO, L. B.; SILVA, J. B. C. Clima e época de plantio. In: SILVA, J. B. C; GIORDANO, L. B. (Eds.). **Tomate para processamento industrial**. Brasília, DF: EMBRAPA, CNPH. 2000. p. 60-71.

GOES, K. C. G. P.; FISHER, M. L. C.; CATTELAN, A. J.; NOGUEIRA, M. A.; CARVALHO, C.G.P.; OLIVEIRA, A.L. M. Biochemical and molecular characterization of high population density bacteria isolated from sunflower. **Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 22, p. 437-447. 2012.

GONÇALVES, L. A.; **Levantamento e manejo de nematoides fitoparasitas em áreas cultivadas com olerícolas na região centro-oeste do estado de São Paulo**. Botucatu. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”. Tese Doutorado. 2014

GUINEBRETIERE, M.-H., et al.; Ability of *Bacillus cereus* Group Strains To Cause Food Poisoning Varies According to Phylogenetic Affiliation (Groups I to VII) Rather than Species Affiliation. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48. n.9. p. 3388–3391. 2010.

GUINEBRETIERE, M.-H.; et al.; *Bacillus cytotoxicus* sp. nov. is a new thermotolerant species of the *Bacillus cereus* group occasionally associated with food poisoning. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 63. p. 31-40. 2013.

GRIFFITTS J.S., et al. *Bt* toxin resistance from loss of a putative carbohydrate-modifying enzyme. **Science**. v. 293. p. 860–864. 2001.

GRIFFITTS, J.S., et al. Glycolipids as receptor for *Bacillus thuringiensis* crystal toxin. **Science**. v. 307. p. 922–925. 2005.

GROSSMAN, A.D., LOSICK, R. Extracellular control of spore formation in *Bacillus subtilis*. **PNAS**. v.85. p.4369-4373. 1988.

GUO, S.; et al. New Strategy for Isolating Novel Nematicidal Crystal Protein Genes from *Bacillus thuringiensis* Strain YBT-1518. **Appl Environ Microbiol**. Nov; 74 (22): 6997–7001. 2008

HAAS, D.; BLUMER, C.; KEEL, C.; Biocontrol ability of fluorescent pseudomonads genetically dissected: importance of positive feedback regulation. **Curr. Opin. Biotechnol**. 11:290-297. 2000.

HAAS, D.; DÉFAGO, G. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. **Nat Rev Microbiol**. 2005.

HABIB, M. E. M.; ANDRADE, C. F. S. Bactérias entomopatogênicas. In: **Controle Microbiano de Insetos**. (ed.) ALVES, S. B.; 2 ed. Piracicaba. 1998.

HADISOEGANDA, W. W.; SASSER, J. N., Resistance of tomato, bean, southern pea and garden pea cultivars to root-knot nematodes based on host suitability. **Plant Disease**. v. 66. p.145-50. 1981.

HAFEZ, M.B.; Fouad, A.; El-Dezouky, W.; Accumulation of metal ions on *Bacillus licheniformis*. **J. Radioanal. Nuc. Chem**. v.251. p. 249–252. 2002.

HE, L.; CHEN, W.; LIU, Y.; Production and partial characterization of bacteriocin-like peptides by *Bacillus licheniformis* ZJU12. **Microbiological Research**. v.161. p.321-326. 2006.

HENDRIKSEN, N.B.; HANSEN, B.M.; JOHANSEN, J.E. Occurrence and pathogenic potential of *Bacillus cereus* group bacteria in a sandy loam. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.89, n.2, p.239-249, 2006.

HERRERO, S.; OPPERT, B.; FERRÉ, J.; Different mechanisms of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in the indianmeal moth. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n.3, p.1085-1089, 2001.

HIGAKI, W. A.; ARAÚJO, F. F.; *Bacillus subtilis* e abamectina no controle de nematoides e alterações fisiológicas em algodoeiro cultivado em solos naturalmente infestados. **Nematropica**. v. 42, p. 295-303, 2012.

HILBERT, D. W.; PIGGOT, P. J. Compartmentalization of gene expression during *Bacillus subtilis* spore formation. **Microbiology and Molecular Biology reviews**, v. 68. n.2. p.234-262. 2004.

HOBLEY, L.; et al. Giving structure to the biofilm matrix: an overview of individual strategies and emerging common themes. **FEMS Microbiol Rev**. v. 39. p. 649–669. 2015.

HOFMANN C.; et al. Binding of the delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* to brush-border membrane vesicles of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). **Eur. J. Biochem**. v. 173. p.85–91. 1988.

HOFTE, H.; WHITELEY, H. R.; Insecticidal crystal protein of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiology Review**, v. 53, n. 2, p. 242-255, 1989.

HOU, C. T.; LABEDA, D. P.; ROONEY, A. P. Evaluation of microbial strains for linoleic acid hydroxylation and reclassification of strain ALA2. **Antonie Van Leeuwenhoek** 88, 167–171. 2005.

HUANG, Z.; et al.; Transformation of *Pseudomonas fluorescens* with genes for biosynthesis of phenazine-1-carboxylic acid improves biocontrol of rhizoctonia root rot and in situ antibiotic production. **FEMS Microbiol. Ecol.** 49:243-251. 2004.

HUANG, G.; ALLEN, R.; DAVIS, E. L.; BAUM, T. J.; HUSSEY, R. S.; Engineering broad root-knot resistance in transgenic plants by RNAi silencing of a conserved and essential root-knot nematode parasitism gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v.103. n.39. p.14302–14306. 2006.

HUI, F.; et al., Structure and glycolipid binding properties of the nematocidal protein Cry5B. **Biochemistry** v. 51. p.9911–9921. 2012.

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

INSUNZA, V.; ABALLAY, E.; MACAYA, J. Nematicidal activity of aqueous plant extract on *Xiphinema* index. **Nematologia Mediterrânea**, Bari, IT, v. 29, p. 35-40, 2001.

JAMES, C.; **Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops**. ISAAA Brief No. 41. 2009.

JAYAKUMAR, A.; KRISHNA, A.; MOHAN, M. et al. Plant Growth Enhancement, Disease Resistance, and Elemental Modulatory Effects of Plant Probiotic Endophytic *Bacillus* sp. Fcl1. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**. p 1-9. 2018.

JENSEN, G.B.; HANSEN, B.M.; EILENBERG, J.; MAHILLON, J. The hidden lifestyles of *Bacillus cereus* and relatives. **Environmental Microbiology**, v.5, n.8, p.631-640, 2003.

JEYARAM, K.; et al.; Distinct differentiation of closely related species of *Bacillus subtilis* group with industrial importance. **Journal of microbiological methods**, v. 87. p. 161-164. 2011.

Jl. S. H.; et al. Biocontrol Activity of *Bacillus amyloliquefaciens* CNU114001 against Fungal Plant Diseases. **Mycobiology**. v.41 n.4. p. 234–242. 2013.

JOUZANI, G. S.; et al. Molecular detection of nematocidal crystalliferous *Bacillus thuringiensis* strains of Iran and evaluation of their toxicity on free-living and plant-parasitic nematodes. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 54. p. 812-822. 2008.

KAMILOVA, F., et al.; Effects of the tomato pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* and of the biocontrol bacterium *Pseudomonas fluorescens* WCS365 on the

composition of organic acids and sugars in tomato root exudate. **Mol. Plant Microbe Interact.** v. 19. p.1121–1126. 2006.

KAMILOVA, F.; et al.; Commercialization of microbes: manufacturing, inoculation, best practice for objective field testing, and registration. In: **Principles of Plant Microbe Interactions**. Microbes for Sustainable Agriculture, ed. LUGTENBERG, B. (Berlin: Springer), 319–327. 2015.

KAMRAN, M., ANWAR, S. A., JAVED, N., KHAN, S. A. AND SAHI, G. M., Incidence of root-knot nematodes on tomato in Sargodha, Punjab, Pakistan. **Pak. J. Nematol.**, v. 28, p.253-262, 2010.

KARAKURT, H., et al. Effects of plant growth promoting rhizobacteria on fruit set, pomological and chemical characteristics, color values, and vegetative growth of sour cherry (*Prunus cerasus* cv. Kütahya). **Turkish Journal of Biology.** 35. 283-291. 2011.

KARSSSEN, G.; MOENS, M; Root-knot nematodes. In: Perry RN, Moens M, editors. **Plant Nematology**. Wallingford, UK: CABI Publishing; p. 59–90. 2006

KERRY, B.R. Biological Control. In: BROWN, R.H.; KERRY, B.R. **Principles and practice of nematode control in crops**. London : Academic Press, p.233-263. 1987.

KHO, M.F., et al., The pore-forming protein Cry5B elicits the pathogenicity of *Bacillus* sp. against *Caenorhabditis elegans*. **Plos One.** v. 6. n.12. 2011.

KILANI-FEKI, O.; et al. Heterologous expression and secretion of an antifungal *Bacillus subtilis* chitosanase (CSNV26) in *Escherichia coli*. **Bioprocess Biosyst. Eng.** v. 36, p. 985–992. 2013.

KILANI-FEKI, O.; et al. Improvement of antifungal metabolites production by *Bacillus subtilis* V26 for biocontrol of tomato postharvest disease. **Biological Control.** v. 95. p. 73–82. 2016.

KILIC-EKICI, O.; YUEN, G.Y.; Comparison of strains of *Lysobacter enzymogenes* and PGPR for induction of resistance against *Bipolaris sorokiniana* in tall fescue. **Biol. Control** 30:446-455. 2004.

KOKALIS-BURELLE, N.; et al.; Plant growth-promoting rhizobacteria as transplant amendments and their effects on indigenous rhizosphere microorganisms. **Applied Soil Ecology**. v. 31. p. 91–100. 2006.

KOLSTO, AB.; TOURASSE N. J.; OKSTAD, O. A.; What Sets *Bacillus anthracis* Apart from Other *Bacillus* Species? **Annual Review of Microbiology**, Vol. 63: p. 451-476. 2009.

KLOEPPER, J.W.; RYU, C.-M.; ZHANG, S. Induced Systemic Resistance and Promotion of Plant Growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology*, 94(11): 1259-1266. 2004.

KNOWLES, H. B.; DOW, J. The crystal δ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis*: Models for their mechanism of action on the insect gut. **BioEssays**. v. 15. p. 469 - 476. 1993

KUCEY, R.M.N. Increased phosphorus uptake by wheat and field beans inoculated with a phosphorus-solubilizing *Penicillium bilaji* strain and with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 53. p. 2699-2703. 1987.

LALANDE, R.; BISSONNETTE, N.; COUtlÉE, D.; ANTOUN, H. Identification of rhizobacteria from maize and determination of their plant-growth promoting potential. **Plant Soil** v.115. n.1. p.7–11. 1989.

LATORRE, B. A. et al. Plagas de las hortalizas: manual de manejo integrado. Santiago: FAO, 520 p. 1990.

LEBUHN, M.; HARTMANN, A. Method for determination of indole-3- acetic acid and related compounds of l-tryptophan catabolism in soils. **Journal of Chromatography A**. v. 629. n. 2. p.255-266. 1993.

LECHNER, S.; et al.; *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of de *Bacillus cereus* group. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.48, n.4, p.1373-1382, 1998.

LI, X.Q.; et al.; Resistance to root-knot nematode in tomato roots expressing a nematocidal *Bacillus thuringiensis* crystal protein. **Plant Biotechnol J** 5:455–464. 2007.

LI, X.Q.; et al.; Expression of Cry5B protein from *Bacillus thuringiensis* in plant roots confers resistance to root-knot nematode. **Biological Control**. V. 47, p. 97–102. 2008.

LI, H.; et al.; Endophytic bacterium, *Bacillus amyloliquefaciens*, enhances ornamental hosta resistance to diseases and insect pests. **J Plant Interact**. 10: 224–229. 2015

LISBOA, M. P.; **Caracterização de um peptídeo antimicrobiano produzido por uma linhagem de *Bacillus amyloliquefaciens* isolado do solo**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. Dissertação Mestrado. 2006.

LIU, F.; et al. Plant growth-promoting rhizobacteria affect the growth and nutrient uptake of *Fraxinus americana* container seedlings. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 97, n. 10. p. 4617–4625. 2013.

LLARCH, A.; et al.; Isolation and characterization of thermophilic *Bacillus* spp. from geothermal environments on Deception Island, South Shetland archipelago, **Microb Ecol**. v. 34. n.1. p.58-65. 1997.

LOGAN, N. A.; de VOS, P. **Genus I. *Bacillus* Cohn 1872**, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 174AL. Vol3. **The firmicutes 2nd Edition**. 2009.

LOGAN, N.A.; BERKELEY, R. C.; Identification of *Bacillus* strains using the API system. **J. Gen. Microbiol**. 130: p. 1871–1882. 1984.

LORDELLO, L. G. E.; Contribuição ao conhecimento dos nematoides que causam galhas em raízes de plantas em São Paulo e estados vizinhos. **An. Esc. Super. Agric. Luiz de Queiroz**, Piracicaba, v. 21, p. 181-218, 1964.

LORDELLO, R. R. A.; LORDELO, A. I. L.; CIA, E.; FUZZATO, M. G. Avaliação da resistência de algodoeiro a nematoides de galhas. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, VII, Botucatu. **Resumos**, p.19. 1984.

LUGTENBERG, B.; KAMILOVA, F.; Plant-growth promoting rhizobacteria. **Annual review microbiology**, 63: 541-556. 2009.

LUTHY, P.; WOLFERSBERGER, M. G.; Pathogenesis of *Bacillus thuringiensis* toxins. **Florida Entomologist**. v.82. n.2. p. 254-262. 2000.

MAQBOOL, M.A.; HASHMI, S.; GHAFFAR, A.; Problem of root knot nematode in Pakistan and strategy for their control. p. 229-240. In: **Advances in Plant Nematology** (Eds.) MAQBOOL, M.A., GOLDEN, A.M., GHAFFAR, A. & KRUSBERG, L.R. Karachi, Pakistan, National Nematological Research Centre, University of Karachi. 1988.

MADHAIYAN, M.; et al.; *Bacillus methylotrophicus* sp. nov., a methanol-utilizing, plant-growth-promoting bacterium isolated from rice rhizosphere soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v.60. n.10. p.2490–2495. 2010.

MARROQUIN, L.D.; et al.; *Bacillus thuringiensis* (Bt) toxin susceptibility and isolation of resistance mutants in the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**. v. 155. n.4. p. 1693–1699. 2000.

MARTINS, E. S.; **Estudo da atividade de proteína Cry, derivadas de *Bacillus thuringiensis* ativas para insetos-praga do algodoeiro**. Brasília. Universidade de Brasília. Tese Doutorado. 2009.

MATOS, E.S.; SHIRAHIGE, F.H.; MELO, P.C.T.; Desempenho de híbridos de tomate de crescimento indeterminado em função de sistemas de condução de plantas. **Horticultura Brasileira**. v. 30. p.240-245. 2012

MAZZUCHELLI, R. C. L.; ARAÚJO, F. F.; Controle biológico e químico de nematoides em Cana-de-açúcar. **Colloquium Agrariae** (UNOESTE), v. 8, p. 6-12, 2012.

MEDEIROS, J. E.; SILVEIRA, E. B.; MARIANO, R. L. R.; PEDROSA, E. M. R. Inconsistency of the biological control of *Meloidogyne incognita* race 2 in melon by endophytic and rhizosphere bacteria. **Horticultura Brasileira**. v.27. p. 319-324. 2009.

MEDICE, R. **Efeito de produtos alternativos no controle de oídio e *Bacillus* spp. como promotores de crescimento da soja.** Botucatu. Universidade Estadual Paulista. Tese (Doutorado). 2012.

MENDO, S. Purification and characterization of a new peptide antibiotic produced by a thermotolerant *Bacillus licheniformis* strain. **Biotechnology Letters.** v. 26. p.115–119. 2004.

MENEZES, R. S.; **Seleção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* e determinação da atividade de proteínas Cry tóxicas para importantes Lepidópteros da cultura do milho no Brasil.** Brasília. Universidade de Brasília, 2008.

MINAMI, K.; HAAG, H. P. O tomateiro. 2. ed. Campinas: **Fundação Cargill.** p. 397. 1989

MOELLER, R.; et al.; Resistance of *Bacillus subtilis* Spore DNA to Lethal Ionizing Radiation Damage Relies Primarily on Spore Core Components and DNA Repair, with Minor Effects of Oxygen Radical Detoxification. **Applied and Environmental Microbiology.** v. 80. n.1. p.104-109. 2014.

MONNERAT, R. G, BRAVO, A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. In: Controle Biológico, eds. Melo, I.S. e Azevedo, J.L, Jaguariúna, SP, **Embrapa Meio Ambiente.** v. 3, p.163-200, 2000.

MONNERAT, R. G.; SILVA, S. F.; SILVA-WERNECK, J. O. S.; Catálogo do banco de germoplasma de bactérias do gênero *Bacillus*. Brasília: **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.** 2001.

MONNERAT, R. G.; et al.; Characterization of brasilian *Bacillus thuringiensis* strains active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatallis*. **Biological Control.** v. 41. p. 291-295, 2007.

MONTALVÃO, S. C. L. Uso de *Bacillus* spp. para o controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e *Meloidogyne incognita* no algodoeiro (*Gossypium hirsutum*). 170p. Brasília. Tese de Doutorado. Universidade de Brasília, Brasília-DF. 2016.

MORRIS, K. A.; LANGSTON, D. B.; DAVIS, R. F.; NOE, J. P.; DICKSON, D. W.; TIMPER, P. Efficacy of Various Application Methods of Fluensulfone for Managing Root-knot Nematodes in Vegetables. **Journal of Nematology**. v. 48. n. 2. p. 65–71. 2016.

MOURA, R. M.; ROSA, R. C. T.; PEDROSA, E. M. R.; Estudo de interação *Meloidogyne-Fusarium* em tomateiro portador do gene MI em condições temperaturas altas do solo. **Nematologia Brasileira**. v 25. p. 229-233. 2001

MULLIGAN, C. N.; Environmental applications for biosurfactants. **Environ. Pollut.** v. 133. n.2. p.183–198. 2005.

MUKHERJ, S.; DAS, P.; SEM, R.; Towards commercial production of microbial surfactants. **Trends Biotechnol.**, v. 24. n. 11. p. 509–515. 2006

NAKAMURA, L. K. *Bacillus pseudomycoides* sp. nov. **Int. J. Syst. Bacteriol.** v. 48. p. 1031-1034. 1998.

NAM, H. S.; et al. Biological control potential of *Bacillus amyloliquefaciens* KB3 isolated from the feces of *Allomyrina dichotoma* larvae. **Plant Pathol J.** v. 32. n.3. p.273–280. 2016.

NARULA, J.; FUJITA, M.; IGOSHIN, A. O. Functional requirements of cellular differentiation: lessons from *Bacillus subtilis*. **Curr Opin Microbiol.** v. 34. p.38-46. 2016.

NUNES, H. T., **Agentes microbianos no controle de nematoides e fungos fitopatogênicos de soja e sua compatibilidade com agroquímicos**. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Jaboticabal, 2008.

NUNES, H. T., et al. Uso de agentes microbianos e químico para o controle de *Meloidogyne incognita* em soja. **Acta Sci., Agron. (Online)**, Maringá, v. 32, n. 3, p. 403-409, Sept. 2010.

OKA, Y.; SHUKER, S.; TKACHI, N. Nematicidal efficacy of MCW-2, a new nematicide of the fluoroalkenyl group, against the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. **Pest. Manag. Sci.** v. 65. p.1082-1089. 2009.

OKA, Y.; SHUKER, S.; TKACHI, N. Systemic nematicidal activity of fluensulfone against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* on pepper. **Pest. Manag. Sci.**, 68: 268-275. 2011.

OKA, Y.; SHUKER, S.; TKACHI, N. Influence of soil environments on nematicidal activity of fluensulfone against *Meloidogyne javanica*. **Pest. Manag. Sci.** v. 69. p.1225-1234. 2013.

OKA, Y. Nematicidal activity of fluensulfone against some migratory nematodes under laboratory conditions. **Pest Manag Sci.** v. 70. n. 12. p.1850-1858. 2014.

OKON, Y.; BLOEMBERG, G. V.; LUGTENBERG, B. J. J. Biotechnology of biofertilization and phytostimulation. In: **Agricultural Biotechnology**, ed. Altman, A. p. 327–349. New York: Marcel Dekker. 1998.

OLIVEIRA, C. M. G.; KUBO, R. K. Controle químico de nematoides em algodoeiro com terbufós. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO, 2., 1999, Ribeirão Preto. **Anais.** Campina Grande: Embrapa-CNPA, p. 446-448. 1999.

OLIVEIRA, D.C. **Enxertia de plantas de pimentão em *Capsicum* spp. no manejo de Nematoides de galha.** 2007. 134p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2007.

OLIVEIRA, A. L. M., et al.; Biodiversity of soil bacteria and its applications for a sustainable agriculture. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v.3, n.1, p. 56-77, 2014.

ONGENA M.; JACQUES, P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. **Trends Microbiol.** v.16. p. 115–125. 2008.

OREM, J. C. **Filogenia e perfil plasmidial de bactérias aeróbias formadoras de endósporos isoladas de solo.** Universidade de Brasília. Brasília. Dissertação Mestrado. 2014.

PALAZZINI, J. M.; et al. Potential biocontrol agents for *Fusarium* head blight and deoxynivalenol production in wheat. **Crop Prot.** v. 26. p.1702–1710. 2007.

PALMA, L.; MUÑOZ, D.; BERRY, C.; MURILLO, J.; CABALLERO, P. *Bacillus thuringiensis* Toxins: An Overview of Their Biocidal Activity. **Toxins.** v. 6 n.12. p. 3296–3325. 2014.

PARK, S.; RITTMAN, B. E.; BAE, W. Life-cycle kinetic model for endospore-forming bacteria, including germination and sporulation. **Biotechnology and Bioengineering.** v. 104. p. 1012-1024. 2009.

PENG, D.; Synergistic activity between *Bacillus thuringiensis* Cry6Aa and Cry55Aa toxins against *Meloidogyne incognita*. **Microb Biotechnol.** v. 4. n. 6. p.794–798. 2011.

PEREIRA, J.; BURLE, M. L.; RESCK, D.V.S. Adubos verdes e sua utilização no cerrado. In: Simpósio sobre manejo e conservação do solo no cerrado. 1990, Goiânia, GO. **Anais.** Campinas: Fundação Cargil. p. 140-154. 1992.

PÉREZ-GARCÍA, A.; ROMERO, D.; DE VICENTE, A. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of Bacilli in agriculture, **Curr Opin Biotechnol.** v. 22, n. 2 p.187-193. 2011.

PERRY, R. N. et al. **Root-knot nematodes.** Wallingford: CABI, 2009.

PINHEIRO, J. B.; et al. Reprodução de *Meloidogyne incognita* Raça 1 e *Meloidogyne javanica* em Linhagens Avançadas de Tomateiro Industrial. Brasília: Embrapa Hortaliças 19p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento n° 55). 2009.

PINHEIRO, J. B.; AMARO, G. B; PEREIRA, R. B. **Ocorrência e controle de nematoides em hortaliças folhosas.** Brasília: Embrapa Hortaliças. 9p. (Embrapa Hortaliças. Circular Técnica 89). 2010.

PINHEIRO, J. B.; AMARO, G. B.; PEREIRA, R. B. **Nematoides em pimentas do gênero *Capsicum***. Brasília: Embrapa Hortaliças. 9p. (Embrapa Hortaliças. Circular Técnica 104). 2012.

PINHEIRO, J. B.; PEREIRA, R. B.; SUINAGA, F. A. **Manejo de nematoides na cultura do tomate**. Brasília: Embrapa Hortaliças. 12 p. (Embrapa Hortaliças. Circular Técnica 132). 2014.

PINHEIRO, J. B.; **Nematoides**. AGEITEC. Agencia Embrapa de Informação Tecnológica. Disponível em: <
<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cenoura/arvore/CONT000gnhpbfhf02wx5ok0edacxlslvdgr.html>> Data de acesso: 05/03/2018

PINHO, R. S. C. **Aspectos do antagonismo de bactérias endofíticas a *Meloidogyne incognita* em tomateiro**. Dissertação (Mestre em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras. p. 47. 2008.

PRAÇA, L. B.; et al. *Bacillus thuringiensis* **Berliner (Eubacteriales: Bacillaceae): aspectos gerais, modo de ação e utilização** / Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Documentos 239. 40 p. 2007.

PRIEST, F.G.; Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. **Bacteriology Reviews**. v. 41. n. 3. p. 711-753. 1977.

PRIEST, F.G.; et al.; *Bacillus amyloliquefaciens* sp. nov, nom. rev. **Int. J. Syst. Bacteriol.** v. 37. p.69–71. 1987.

PIGGOT, C. R.; ELLAR, D. J.; Role of Receptors in *Bacillus thuringiensis* Crystal Toxin Activity. **Microbiology and Molecular Biology**, v. 71, n. 2, p. 255-281. 2007.

RABINOVITCH, L.; BRAZÃO-E-SILVA, C.M; ALVES, R.S.A- Controle biológico de vetores de doenças tropicais utilizando *Bacillus* entomopatogênicos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (eds.) Controle biológico. Jaguariúna-SP: EMBRAPA Meio Ambiente, p. 17-90. 2000.

RASI, G. C. **Estudo de atividade de peptídeos tipo bacteriocina de *Bacillus thuringiensis***. Brasília. Universidade de Brasília. Dissertação Mestrado. 2010.

RAIJ, B. van. **Fertilidade do solo e adubação**. Piracicaba: Agronômica Ceres, Associação Brasileira para a Pesquisa da Potassa e do Fosfato. 343p. 1991

RALSTON, D. B.; Mc BRIDE, R. P. Interaction of mineral phosphate-dissolving microbes with red pine seedlings. **Plant Soil**, 45:493-507, 1976.

RAVENSBERG, W. J. Commercialization of microbes: present situation and future prospects. In: Principles of Plant-Microbe Interactions. Microbes for Sustainable Agriculture, ed. LUGTENBERG, B. **Springer**. p. 309–317. 2015.

REVA, O. N.; et al.; *Bacillus endophyticus* sp. nov., isolated from the inner tissues of cotton plants (*Gossypium* sp.). **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** v. 52. p.101–107. 2002.

RIEDER, J.H. Destinação racional dos jazimentos fosfáticos nacionais. In: ENCONTRO NACIONAL DE ROCHAS FOSFATADAS, 3., Brasília, **Anais**. Brasília, IBRAFOS, 1986. p.139-170. 1986.

RITZINGER, C. H. S.; FANCELLI, M. Manejo integrado de nematoides na cultura da bananeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v.28. n. 2. p. 331-338. 2006.

RYU, C. M.; et al.; Plant growth-promoting rhizobacterial systemically protect *Arabidopsis thaliana* against *Cucumber mosaic virus* by a salicylic acid and NPR1-independent and jasmonic acid-dependent signaling pathway. **The Plant J.** v. 39. p.381-392. 2005.

RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**. v.17. p.319-339, 1999.

ROONEY, A. P.; et al.; Phylogeny and molecular taxonomy of the *Bacillus subtilis* species complex and description of *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* subsp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 59, p. 2429–2436. 2009

RUANO, O. et al. Algodão (*Gossypium hirsutum* L.) – Doenças causadas por nematoides. In: VALE, F.X.R.; ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Controle de doenças de plantas – grandes culturas**. v. 2. Viçosa: Departamento de Fitopatologia; Brasília, DF: Ministério da Agricultura e do Abastecimento, p. 583-603. 1997.

RUCKERT, C.; et al.; Genome sequence of *B. amyloliquefaciens* type strain DSM7T reveals differences to plant-associated *B. amyloliquefaciens* FZB42. **J. Biotechnol.** v.155. p.78-85. 2011.

RUIZ-GARCÍA, C.; et al., *Bacillus velezensis* sp. nov., a surfactant-producing bacterium isolated from the river Velez in Malaga, southern Spain. **Int J Syst Evol Microbiol** 55, 191–195. 2005a

RUIZ-GARCÍA, C.; et al. *Bacillus axarquiensis* sp. nov. and *Bacillus malacitensis* sp. nov., isolated from river-mouth sediments in southern Spain. **Int J Syst Evol Microbiol** 55, 1279–1285. 2005b

SABRY, S.A.; Microbial degradation of shrimp-shell waste. **J. Basic Microbiol.** v.32. p. 107–111. 1992.

SCHISLER, D. A.; KHAN, N. I.; BOEHM, M. J.; Biological control of *Fusarium* head blight of wheat and deoxynivalenol levels in grain via use of microbial antagonists. **Adv exp med boil.** v. 504. p. 53–69. 2002.

SCHNEPF, E.; et al. *Bacillus thuringiensis* and Its Pesticidal Crystal Proteins. **Microbiol Mol Biol Rev.** v. 62. n.3. p.775–806. 1998

SCHALLMEY, M.; SINGH, A.; WARD, O. P.; Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. **Can J Microbiol.** v. 50. p. 1– 17. 2004.

SEAPA/MG - Secretaria de Estado de Agricultura, Pecuária e Abastecimento de Minas Gerais. **Tomate**. Belo Horizonte – MG. 2017. Disponível em: <http://www.agricultura.mg.gov.br/images/Arq_Relatorios/Agricultura/2017/Fev/perfil_tomate_fev_2017.pdf> Acesso em: 20 Fev. 2018.

SELVAKUMAR, G., KUNDU, S., GUPTA, A.D. et al. Isolation and Characterization of Nonrhizobial Plant Growth Promoting Bacteria from Nodules of Kudzu (*Pueraria thunbergiana*) and Their Effect on Wheat Seedling Growth. **Current Microbiology**. v. 56. n. 2. p 134–139. 2008.

SETLOW, P. I will survive: DNA protection in bacterial spores. **Trends in Microbiology**, v.15. n.4. p.172-180. 2007.

SHARMA, A.; JOHRI, B. N. Growth promoting influence of siderophore-producing *Pseudomonas* strains GRP3A and PRS9 in maize (*Zea mays* L.) under iron limiting conditions. **Microbiological Research**, v.158, p.243-248, 2003.

SHAO, J., XU, Z., ZHANG, N. et al.; Contribution of indole-3-acetic acid in the plant growth promotion by the rhizospheric strain *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9. **Biology and Fertility of Soils**. v. 51. n. 3. p 321–330. 2015.

SIEGEL, J.P.; The mammalian safety of *Bacillus thuringiensis* based insecticides. **Journal of Invertebrate Pathology**. v.77, p.13-21, 2001.

SILVA. E. S.; **Tolerância à salinidade em plantas de *Phaseolus vulgaris* l. inoculadas com bactérias promotoras de crescimento oriundas do semiárido baiano**. Cruz das almas. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Dissertação (Mestrado) 2015.

SILVA, J. B. C.; et al.; Cultivo de tomate para industrialização: importância econômica. Gama: EMBRAPA Hortaliças (Sistema de produção, 1). 2003. Disponível em: <<https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Tomate/TomateIndustrial/>>. Acesso em: 06 nov. 2017.

SILVA, M. S.; BANDEIRA, M. A.; MARANHÃO, S. R. V. L.; CARVALHO, R. M.; PEDROSA, E. M. R. Comportamento de genótipos RB de cana-de-açúcar ao parasitismo dos nematoides das galhas. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**. v.11, n.2, p.73-79, 2016

SILVA FILHO, G. N.; VIDOR, C. Solubilização de fosfatos por microrganismos na presença de fontes de carbono. **Rev. Bras. Ciênc. Solo**, Viçosa. v. 24, n. 2, p. 311-319, 2000.

SMYTH, E.; MCCARTHY, J.; NEVIN, R.; KHAN, M.; DOW, J.; O'GARA, F.; DOOHAN, F. In vitro analyses are not reliable predictors of the plant growth promotion capability of bacteria; a *Pseudomonas fluorescens* strain that promotes the growth and yield of wheat. **Journal of Applied Microbiology**. v. 111. p. 683-692. 2011.

STABB, E. V.; JACOBSON, L. M.; HANDELSMAN, J.; Zwittermycin A-producing strains of *Bacillus cereus* from diverse soils. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 60. n.12. p. 4404–4412. 1994.

STEIN, T.; *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. **Mol Microbiol.** 56: 845–857. 2005.

STRESHINSKAYA, G.M.; et al.; Carbohydrate-Containing Cell Wall Polymers of some Strains of the *Bacillus Subtilis* Group. **Microbiology**. v. 80. p. 21-29. 2011.

STURZ, A. V.; CHRISTIE, B. R; NOWAK, J. Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production. **Critical Reviews in Plant Sciences**. v. 19. p.1-30, 2000.

SUDHAKAR, P., et al.; Effect of foliar application of Azotobacter, Azospirillum, and Beijerinckia on leaf yield and quality of mulberry (*Morus alba*). **J. Agr. Sci.** v.134. p. 227–234. 2000.

SZILAGYI-ZECCHIN, VIVIAN J. et al. Crescimento de mudas de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) estimulado pela bactéria *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42 em cultura orgânica. **Rev. de Ciências Agrárias**. v. 38, n. 1. p. 26-33. 2015.

TAN, S. Y.; et al.; Emerging frontiers in detection and control of bacterial biofilms. **Curr Opin Biotechnol.** v. 26. p. 1–6. 2014.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiología vegetal. Porto Alegre: Artmed, 719 p. 2004.

TAYLOR, A. L.; MCBETH, C. W.; Spot treatments with chloropicrin and ethylene dichloride for control of root-knot. **Proc. Helminth. Soc. Wash.** 8: 53-55. 1941.

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

TAYLOR, A. L.; SASSER, J.N. Biología, identificación y control de los nematodos del nódulo de la raíz (Especies de *Meloidogyne*). **North Carolina State University Graphics,** 1983. 111 p

THANTHIANKUL, S., et al.; Chitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. *pakistani*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 56. p.395–401. 2002.

TIMMS-WILSON, T. M., et al.; Chromosomal insertion of phenazine-1-carboxylic acid biosynthetic pathway enhances efficacy of damping-off disease control by *Pseudomonas fluorescens*. **Mol. Plant-Microbe Interact.** v. 13. p.1293-1300. 2000.

TOURE, Y.; et al. Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. **Journal of applied microbiology,** v. 96. p.1151-1160. 2004.

TOURASSE, N.J.; et al. The *Bacillus cereus* group: novel aspects of population structure and genome dynamics. **Journal of Applied Microbiology,** v.101: p. 579-593. 2006.

TSAVKELOVA, E. A.; et al.; Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. **Applied Biochemistry and Microbiology,** v.42, p.117-126, 2006.

URRUTIA, M.M.; BEVERIDGE, T.J.; Formation of short-range ordered aluminosilicates in the presence of bacterial surface (*Bacillus subtilis*) and organic ligands. **Geoderma**. v. 65. p. 149–165. 1995.

VAZ M. V., et al. Controle biológico de *Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne incognita* com *Bacillus subtilis*. **Perquirere**. v. 8. p. 203–212. 2011.

VEITH, B.; et al.; The Complete Genome Sequence of *Bacillus licheniformis* DSM13, an Organism with Great Industrial Potential. **J Mol Microbiol Biotechnol**. v.7. p.204–211. 2004.

VERMA, S.C.; et al.; Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. **Journal of Biotechnology**, v. 91, p. 127-141, 2001.

VREELAND, R.H., ROSENZWEIG, W. D., POWERS, D.W.; Isolation of a 250 million-year-old halotolerant bacterium from a primary salt crystal. **Nature**. v. 407. n. 6806. p.8 97-900. 2000.

XIANG, N.; LAWRENCE, K. S. Optimization of In Vitro Techniques for Distinguishing between Live and Dead Second Stage Juveniles of *Heterodera glycines* and *Meloidogyne incognita*. **PLoS ONE**. v.11. n.5. 2016.

WANG, S.L.; HWANG, J.R. Microbial remediation of shellfish wastes for the production of chitinases. **Enzyme Microb. Technol.**28: 376–382. 2001.

WANG, S.L.; et al.; Purification and characterization of two antifungal chitinases extracellularly produced by *Bacillus amyloliquefaciens* V656 in a shrimp and crab shell powder medium. **J. Agric. Food Chem.**50: 2241–2248. 2002

WANG, L. T.; et al.; Comparison of gyrB gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA-DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group. **Int J Syst Evol Microbiol**. v.57. p. 1846-1850. 2007.

WANG X., XUE Y., HAN M., BU Y., LIU C. The ecological roles of *Bacillus thuringiensis* within phyllosphere environments. **Chemosphere**. v.108 p.258–264. 2014.

WANG, T.; et al.; Natural products from *Bacillus subtilis* with antimicrobial properties. **Chinese Journal of Chemical Engineering**. 23. 744–754. 2015.

WATTIAU, P.; et al.; A PCR test to identify *Bacillus subtilis* and closely related species and its applications to the monitoring of wastewater biotreatment. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 56. p. 816-819. 2001.

WEI, JZ; et al.; *Bacillus thuringiensis* crystal proteins that target nematodes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 100. n. 5. p. 2760–2765. 2003.

WEYENS, N.; et al.; Exploiting plant-microbe partnerships to improve biomass production and remediation. **Trends Biotechnol**, v.27. p.591-598. 2009.

WELKER, N. E.; CAMPBELL, L. L.; Unrelatedness of *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis*. **J. Bacteriol**. v.94. p.1124–1130. 1967.

WHITEHEAD, A. G. **Plant nematode control**. Wallingford, UK: CAB International. 1998.

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

WOESE, C.R. 1987. Bacterial evolution. **Microbiol. Rev.** v. 51. n. 2. p. 221–271. 1987.

WUNSCHHEL, D., Fox, K.F., Black, G.E., Fox, A., Discrimination among the *B. cereus* group, in comparison to *B. subtilis*, by structural carbohydrate profiles and ribosomal RNA spacer region PCR. **Syst. Appl. Microbiol.** v. 17. n. 4. p. 625–635. 1995.

XU D.; CÔTÉ J. C.; Phylogenetic relationships between *Bacillus* species and related genera inferred from comparison of 3' end 16S rDNA and 5' end 16S-23S ITS nucleotide sequences. **Int J Syst Evol Microbiol.** v.53. p. 695-704. 2003.

YANG, L. et al.; Isolation and identification of *Bacillus subtilis* strain YB-05 and its antifungal substances showing antagonism against *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. **Biological Control.** v. 85, p. 52-58. 2015.

YOSHIDA S.; et al.; Antimicrobial Activity of Culture Filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 Isolated from Mulberry Leaves. *Phytopathology.* v. 91 n.2 p.181-187. 2001.

YOUSSEF, N. H.; et al.; Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. **Journal of Microbiology Methods,** v. 56, p. 339-347, 2004.

YU, G. Y.; et al. Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. **Soil Biol Biochem.** v. 34. p. 955–963. 2002.

YU Z.; et al. A novel negative regulatory factor for nematocidal Cry protein gene expression in *Bacillus thuringiensis*. **J. Microbiol Biotechnol.** v.6. p.1033-1339. 2008.

ZHANG, F.; et al. In Vitro Uptake of 140 kDa *Bacillus thuringiensis* Nematicidal Crystal Proteins by the Second Stage Juvenile of *Meloidogyne hapla*. **PLoS ONE.** v.7. n. 6. 2012.

ZHENG, Z.; ZHENG, J.; ZHANG, Z.; PENG, D.; SUN, M. Nematicidal spore-forming Bacilli share similar virulence factors and mechanisms. **Scientific Reports.** v. 6. 2016.