

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL

JEAN BONHEUR FREDERIC

**AÇÃO DE PRODUTO BIOLÓGICO NA ECLOSÃO, MORTALIDADE E NA
REPRODUÇÃO DE *Meloidogyne incognita* NO TOMATEIRO**

**Montes Claros
2018**

Jean Bonheur Frederic

**Ação de produto biológico na eclosão, mortalidade e na reprodução de
Meloidogyne incognita no tomateiro**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, área de concentração em Produção Vegetal da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Cândido Alves da Costa

Co-Orientador: Prof. Fernando da Silva Rocha

**Montes Claros
Dezembro de 2018**

Frederic, Jean Bonheur

F852a Ação de produto biológico na eclosão, mortalidade e na reprodução de *Meloidogyne*
2018 *incognita* no tomateiro / Jean Bonheur Frederic. Montes Claros, 2018.

55 f.

Dissertação (Mestrado) - Área de concentração em Produção Vegetal,
Universidade Federal de Minas Gerais / Instituto de Ciências Agrárias.

Orientador: Prof. Cândido Alves da Costa.

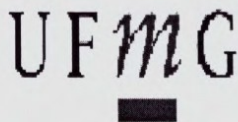
Banca examinadora: Prof.^a Nilza de Lima Pereira Sales, Prof.^a Izabel Cristina Vaz
Ferreira de Araújo, Prof. Fernando da Silva Rocha.

Inclui referências: f. 40-49.

1. Tomate. 2. Controle biológico. 3. Doenças e pragas -- Controle. Costa, Cândido
Alves da (Orientador). II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências
Agrárias. III. Título.

CDU: 632

Jean Bonheur Frederic



Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Agrárias
Mestrado em Produção Vegetal

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

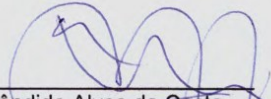
Aos 18 dias do mês de dezembro de 2018, às 08:00 horas, sob a Presidência do Professor Cândido Alves da Costa, D. Sc. (ICA/UFMG) e com a participação dos Professores Fernando da Silva Rocha, D. Sc. (Coorientador - ICA/UFMG), Nilza de Lima Pereira Sales, D. Sc. (ICA/UFMG) e Izabel Cristina Vaz Ferreira de Araújo, D. Sc. (UNICERP), reuniu-se a Banca de defesa de dissertação de **JEAN BONHEUR FREDERIC**, aluno do Curso de Mestrado em Produção Vegetal. O resultado da defesa de dissertação intitulada: "Ação de produto biológico na eclosão, mortalidade e na reprodução de *Meloidogyne incognita* no tomateiro"

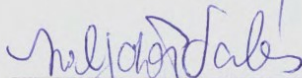
foi expresso pelo conceito "B" (nota 85,0), sendo o aluno considerado (aprovado/reprovado) Aprovado. E, para constar, eu, Professor Cândido Alves da Costa, Presidente da Banca, lavrei a presente ata que depois de lida e aprovada, será assinada por mim e pelos demais membros da Banca examinadora.

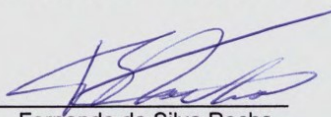
OBS.: O aluno somente receberá o título após cumprir as exigências do ARTIGO 89 do regulamento do Curso de Mestrado em Produção Vegetal, conforme apresentado a seguir:

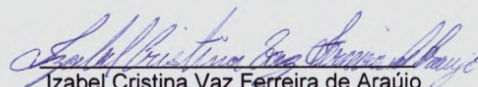
Art. 89 – Para dar andamento ao processo de efetivação do grau obtido, o candidato deverá, após a aprovação de sua Dissertação e a realização das modificações propostas pela banca examinadora, encaminhar à secretaria do colegiado do curso, com a anuência do orientador, 3 (três) exemplares da dissertação e 1 (um) CD, no prazo de 60 (sessenta) dias.

Montes Claros, 18 de dezembro de 2018.


Cândido Alves da Costa
Orientador


Nilza de Lima Pereira Sales
Membro


Fernando da Silva Rocha
Coorientador


Izabel Cristina Vaz Ferreira de Araújo
Membro

**Aos meus pais, Frederic
Innocent e Macula Frederic, por
todo amor, apoio e incentivo,
dedico.**

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela fé que me move, por encher minha vida de bênçãos, iluminar meu caminho e nunca deixar faltar força e coragem.

Aos meus pais: Frederic Innocent e Macula Frederic pelo exemplo de caráter, por serem o chão onde me apoio, pelo incentivo e o esforço na realização dos meus projetos.

A querida Esposa Myriam e filha Esther em momento difícil sempre estavam em meu lado e me ajudaram.

Aos meus orientadores Prof. Cândido Alves da Costa e Prof. Fernando da Silva Rocha pela confiança e paciência, por todos os ensinamentos e pela amizade construída. Foi muito engrandecedor ser orientada por vocês!

A todos os membros do laboratório de Fitopatologia de forma especial a técnica Fátima pelas orientações e ajuda inestimável, as quais foram fundamentais.

Aos professores Luiz Arnaldo Fernandes e sua Família, Leidivan, Reginaldo, Gustavo, Paulo Sérgio, Cândido Alves Costa, Ernane, Leonardo Menteiro, Junio Cota, Professora Silvia, Fernando Rocha e Professor Alcinei Místico por todas as oportunidades que me concederam e por mais uma vez contribuírem em minha passagem para voltar em meu país.

A todos os Funcionários do ICA-UFMG, especialmente do setor de transporte pela prestatividade.

Aos amigos especialmente: Maria Nilva Ameida, Anita, Wesley, Humberto, madrinha Patty Viera, Loic Aymard M'foumbyt M'foumbyt, Beni Nzamu Iluku, Kodzo Etiam Wisdom Totou, Eduardo, Ceara e Armando. Companheirismo durante os anos do mestrado e por compartilhar os momentos de dificuldade.

Um Agradecimento muito grande especialmente amiga Maria Nilfa Ameida pelas suas ajudas e também ao amigo William pela tutoria em fisiologia vegetal.

Aos Professores, Luiz Arnaldo, Fernando Rocha, Leidivan, Cândido pelo carinho, o suporte, as palavras de incentivo nos momentos difíceis e por sempre torcer por mim durante os anos do mestrado.

A querida Mãe em Cristo Irmã Jean Cantave e seus Irmãos Eliot Cantave, Manley Cantave e Kabod Cantave por suas ajudas durante toda minha vida.

A todos os amigos e familiares que tornaram meus dias mais felizes e contribuíram para o meu crescimento pessoal.

A todos funcionários da secretaria de pós-graduação da produção vegetal: Edvado, Clara e outras.

A todos meus irmãos e irmãs biológicos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela disponibilização da bolsa CAPES demanda social e à OEA, pelo Programa de Alianças para Educação e a Capacitação – PAEC Edital n. 001/2016, no âmbito do Acordo de Cooperação entre a Organização dos Estados Americanos – OEA e o Grupo Coimbra de Universidades Brasileiras – GCUB.

MUITO OBRIGADO!

AÇÃO DO PRODUTO BIOLÓGICO Nem-Out™ NA ECLOSÃO, MORTALIDADE E NA REPRODUÇÃO DE *Meloidogyne incognita* NO TOMATEIRO

RESUMO

Os nematoides das galhas é um dos principais patógenos causadores de doenças na cultura do tomateiro. O controle biológico com agentes antagonista tem sido pesquisado visando aumentar a eficiência do controle dos nematoides. Assim, objetivou-se avaliar diferentes concentrações do produto comercial Nem-Out™ sobre a eclosão, mortalidade e na reprodução de *Meloidogyne incognita* em tomateiro, sob duas formas de aplicação do produto. Para avaliar a ação do produto foram preparadas diferentes concentrações diluídas em água a saber: 1,25; 2,5; 5; 10; 20 e 40 g L⁻¹. A seguir, ovos de *M. incognita* foram colocados em câmara de eclosão contendo soluções das diferentes concentrações e mantidas em sala a temperatura ambiente. A primeira leitura do número de juvenis do segundo estágio (J2) de *M. incognita* eclodidos foi feita 48 horas e as demais a cada 24 horas por 14 dias. Ovos mantidos em água foram considerados como testemunha. Para avaliar a mortalidade, os J2 de *M. incognita* foram expostos nas mesmas concentrações por 24 horas. Após esse período, eliminou as soluções e realizou a contagem do número de J2 móveis e imóveis. Os J2 que permaneceram imóveis após 12 horas em água foram considerados mortos. No estudo da ação do produto biológico na redução populacional de *M. incognita* em tomateiro usou as concentrações mencionadas e duas formas de aplicação (via irrigação e cova). Nas mudas de tomateiro foram inoculados 3.692 ovos de *M. incognita*. As avaliações de infectividade e reprodução foram feitas trinta dias após a inoculação. Observou-se redução significativa na eclosão dos J2 de *M. incognita* nas concentrações de 20 e 40 g L⁻¹. A partir da concentração de 5 g L⁻¹ houve menor motilidade e maior mortalidade dos J2, causando 92% de mortalidade nesta concentração. A infectividade e a reprodução de *M. incognita* foram influenciadas significativamente pelo efeito da interação entre concentrações e forma de aplicação do produto. O aumento das concentrações do Nem-Out™ resultou em crescimento linear do FR na aplicação via superfície, enquanto na aplicação via cova houve efeito quadrático com o aumento das concentrações. As concentrações de 1,25 e 2,5 g L⁻¹ aplicadas via superfície proporcionaram menor número de ovos/ g de raiz. A aplicação do produto biológico na superfície proporcionou maior massa do sistema radicular, independente da concentração. O produto biológico possui ação nematicida e na promoção do crescimento do sistema radicular.

Palavras chave: Nematoides das galhas, *Bacillus* spp., *Trichoderma longibrachiatum*, enzimas, controle biológico.

ACTION OF THE BIOLOGICAL PRODUCT Nem-Out™ IN ECLOSION, MORTALITY AND REPRODUCTION OF *Meloidogyne incognita* IN TOMATO

ABSTRACT

Root-knot nematodes are one of the main pathogens that cause diseases in the tomato crop. Biological control with antagonistic agents has been investigated aiming to increase the nematoid control efficiency. Thus, the objective of this study was to evaluate different concentrations of the commercial product Nem-Out™ on hatching, mortality and reproduction of *Meloidogyne incognita* in tomato, under two forms of application this product. To evaluate the action of the product, dilutions were made in water to obtain the following concentrations: 1.25; 2.5; 5; 10; 20 and 40 g L⁻¹. Eggs of *M. incognita* were placed in hatch chamber containing solutions of the different concentrations and kept in room at room temperature. The number of juveniles of the second stage (J2) of *M. incognita* hatched was done 48 hours and the others readings every 24 hours for 14 days. Eggs kept in water were considered as controls. To assess mortality, J2 of *M. incognita* were exposed at the same concentrations for 24 hours. After this period, the solutions were eliminated and counted the number of J2 mobile and immobile. The J2 that remained immobile after 12 hours in water were considered dead. In the study of the action of the biological product in the population reduction of *M. incognita* in tomato used the mentioned concentrations and two forms of application (via irrigation and pit). In tomato seedlings were inoculated 3,692 eggs of *M. incognita*. Infectivity and reproduction evaluations were done thirty days after inoculation. There was a significant reduction in the hatching of J2 of *M. incognita* at concentrations of 20 and 40 g L⁻¹. Observed a significant reduction in the hatching of J2 of *M. incognita* at the concentrations of 20 and 40 g L⁻¹. From the concentration of 5 g L⁻¹ there was less motility and higher J2 mortality, causing a 92% mortality at this concentration. The infectivity and reproduction of *M. incognita* were significantly influenced by the effect of the interaction between concentrations and the application of the product. In the surface application, the increase of the concentrations of the Nem-Out™ resulted in linear growth of the FR, whereas in the application through the pit there was a quadratic effect with the increase of the concentrations. Concentrations of 1.25 and 2.5 g L⁻¹ applied via the surface provided lower number of eggs per gram of root. The application of the biological product on the surface provided a larger mass of the root system, regardless of the concentration. The biological product has nematicidal action and the promotion of root system growth.

Key words: Root-knot nematodes, *Bacillus* spp., *Trichoderma longibrachiatum*, enzymes, biological control.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Gráfico 1-	Porcentagem de juvenis do segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne incognita</i> eclodidos após exposição dos ovos a diferentes concentrações do produtor comercial Nem-Out™ por 14 dias. Barras seguidas da mesma letra não diferenciam entre si pelo teste Kruskal-Wallis.....	30
Gráfico 2-	Porcentagem de motilidade (A) e mortalidade (B) de juvenis do segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne incognita</i> após exposição a diferentes concentrações do produtor comercial Nem-Out™. Barras seguidas da mesma letra não diferenciam entre si pelo teste Kruskal-Wallis.....	31
Gráfico 3-	Massa do sistema radicular de tomateiro em função de diferentes concentrações de Nem-Out™.....	34
Gráfico 4-	Número de galhas de <i>Meloidogyne incognita</i> por grama de raiz de tomateiro em função de diferentes concentrações de Nem-Out™ e do tipo de aplicação. ** Significativo a 1% pelo teste t.....	35
Gráfico 5-	Número de massa de ovos de <i>Meloidogyne incognita</i> por grama de raiz de tomateiro em função de diferentes concentrações de Nem-Out™ e do tipo de aplicação. ** Significativo a 1% pelo teste t.....	36
Gráfico 6-	Número de ovos de <i>Meloidogyne incognita</i> por grama de raiz de tomateiro em função de diferentes concentrações de Nem-Out™ e do tipo de aplicação. ** Significativo a 1% pelo teste t.....	38
Gráfico 7-	Fator de reprodução de <i>Meloidogyne incognita</i> em raiz de tomateiro em função de diferentes concentrações de Nem-Out™ e do tipo de aplicação. ** Significativo a 1% pelo teste t.....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores médios \pm erro padrão da massa do sistema radicular, infectividade e fator de reprodução (FR) de <i>Meloidogyne incognita</i> em tomateiro em função das diferentes concentrações de Nem-Out TM e tipo de aplicação.....	34
Tabela 2 - Valores médios do número de galhas de <i>Meloidogyne incognita</i> por grama de raiz de tomateiro em função de diferentes concentrações de Nem-Out TM e do tipo de aplicação.	35
Tabela 3 - Valores médios do número de massa de ovos de <i>Meloidogyne incognita</i> por grama de raiz de tomateiro em função de diferentes concentrações de Nem-Out TM e do tipo de aplicação.....	36
Tabela 4 - Valores médios do número de ovos de <i>Meloidogyne incognita</i> por grama de raiz de tomateiro em função de diferentes concentrações de Nem-Out TM e do tipo de aplicação...	37
Tabela 5 - Valores médios do fator de reprodução de <i>Meloidogyne incognita</i> em tomateiro em função de diferentes concentrações de Nem-Out TM e do tipo de aplicação.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

J2	Juvenil do segundo estágio
DIC	Delineamento inteiramente casualizado
UFC	Unidades Formadoras de colônias
FR	Fator de Reprodução
g	Gramas
°C	Graus Celsius
p/v	Peso por volume
µm	Micra ou milésima parte do milímetro
mL	Mililitros
g L ⁻¹	Gramas por mililitros

APÊNDICE

Tabela 1 - Resumo da Análise de Variância das médias da massa radicular de tomateiro, N° de galhas, N° de massa de ovos, N° de ovos e fator de reprodução de <i>Meloidogyne incognita</i> , em função de concentrações de Nem-Out TM e do tipo de aplicação.....	53
Quadro 1 - Saída do resultado da análise de variância da porcentagem de juvenis do segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne incognita</i> eclodidos após exposição dos ovos a diferentes concentrações do produtor comercial Nem-OutTM por 14 dias (Software R. Versão 3.5.1.).....	54
Quadro 2 - Saída do resultado da análise de variância da porcentagem de motilidade e mortalidade de juvenis do segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne incognita</i> em diferentes concentrações do produto comercial Nem-OutTM por 14 dias (Software R. Versão 3.5.1.).....	55

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – REFERENCIAL TEÓRICO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	A cultura do tomateiro e os nematoides das galhas.....	15
2.2	Controle biológico de <i>Meloidogyne</i> spp. com bactérias	16
2.2.1	Ação de enzimas produzidas por bactérias sobre nematoide.....	19
2.3	Controle biológico de <i>Meloidogyne</i> spp. com <i>Trichoderma</i> sp.....	22
2.4	Produto biológico a base de NemOut™ no controle de nematoide	23
3	OBJETIVOS	25
3.1	Objetivo geral	25
3.2	Objetivos específicos.....	25

CAPÍTULO 2 - AÇÃO DO PRODUTO BIOLÓGICO Nem-Out™ NA ECLOSÃO, MORTALIDADE E NA REPRODUÇÃO DE *Meloidogyne incognita* NO TOMATEIRO

1	INTRODUÇÃO	26
2	MATERIAL E MÉTODOS	27
2.1	Obtenção de mudas de tomateiro.....	27
2.2	Identificação e multiplicação de <i>Meloidogyne incognita</i>	27
2.3	Obtenção de ovos e juvenis do segundo estágio de <i>Meloidogyne incognita</i>	27
2.4	Instalação e avaliação dos experimentos.....	28
2.5	Análise estatística.....	29
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
3.1	Eclosão e na mortalidade de juvenis.....	30
3.2	Infectividade e reprodução de <i>M. incognita</i> em tomateiro.....	33
4	CONCLUSÕES	41
5	REFERÊNCIAS	43
	APÊNDICE	53

CAPÍTULO 1: REFERENCIAL TEÓRICO

1. INTRODUÇÃO

O tomateiro é uma planta originária nos Andes, de região que envolve o Peru, Bolívia e Equador (FILGUEIRA, 2000). É uma das hortaliças-fruto mais importante no mundo pela sua versatilidade do uso, seja in natura ou industrializado. O fruto é boa fonte de ácido fólico, vitamina C e potássio (FONTES E SILVA, 2005).

Apesar de sua origem Sul Americana, o consumo de tomate no Brasil foi introduzido no Brasil no século XIX pelos imigrantes europeus, já amplamente consumido nos seus lugares de origem (FILGUEIRA, 2000).

O tomateiro pertence à família Solanaceae e nome científico inicialmente foi dado por Lineaus como sendo *Solanum lycopersicon*. Já Miller em 1754 como sendo *Lycopersicon sculentum*, por considerar o tomate pertencente ao gênero diferente do Solanum. Entretanto, atualmente considerando as bases de estudos filogenéticos usando sequências de DNA e estudos mais aprofundados da morfologia e distribuição de plantas, há uma aceitação do binômio *Solanum lycopersicon*, por pertencer ao gênero *Solanum* (Peralta et al., 2006).

No meio agrícola, o tomateiro é considerado uma das plantas mais afetadas por doenças, o que leva à drástica redução da produção de frutos. Dentre os problemas fitossanitários do tomateiro destacam-se os nematoides, especialmente os causadores de galhas. Das quatro espécies mais importantes que atacam a cultura do tomate, o *Meloidogyne incognita* é o de maior ocorrência no Brasil (FILGUEIRA, 2000).

Dentre as principais formas de manejo de nematoide na cultura está o controle biológico. Enzimas produzidas por bactérias (*Bacillus* sp.) e fungos (*Trichoderma* sp.) podem interferir no ciclo de vida e/ou no comportamento dos fitonematoides, reduzindo assim sua densidade populacional. Deste modo, produtos que contenham agentes antagonistas e/ou substâncias produzidas por estes agentes tem potencial para o controle dos nematoides de galhas. O aditivo para compostagem Nem-Out™ possui em sua composição básica enzimas (proteases, pectinases, celulasas, xilanases) e microrganismos (*Bacillus subtilis*, *B. licheniformes*, *Trichoderma longibrachiatum*) presentes em sua formulação, os quais agem proporcionando a decomposição do tecido vegetal e na adequação da flora microbiana do processo de compostagem e/ou em microorganismos da rizosfera. Partindo deste princípio, o produto comercial supracitado tem potencial para o controle população de nematoides de galhas na rizosfera do tomateiro.

São poucos os estudos que avaliam a atuação e eficácia do aditivo Nem-Out™ na população da rizosfera de plantas de tomate. Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito de concentrações do produto comercial Nem-Out™ na eclosão, mortalidade e na reprodução de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* em tomateiro.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cultura do tomateiro e nematoide das galhas

O tomateiro (*Solanum lycopersicon* L.), originário da América do Sul, é uma planta da família Solanaceae. É considerado um alimento importante na nutrição humana. O fruto é rico em água, aproximadamente 94%, sendo que nos 6% correspondente à matéria seca encontram-se açúcares (glucose e frutose), sólidos insolúveis em álcool (proteínas, substâncias pécticas, hemicelulose e celulose), ácidos orgânicos (ácido cítrico e málico), minerais e vitaminas, especialmente as vitaminas A e C (FILGUEIRA, 2000).

O tomateiro é uma das principais hortaliças cultivadas mundialmente. Segundo dados da FAOSTAT (2018), a China é o país com maior área colhida no mundo (1.003.992 ha) com uma quantidade produzida de 56.423.811 toneladas de tomate. Entretanto, a maior produtividade é de 507,04 toneladas alcançada da Holanda. No Brasil, 9º maior produtor de tomate no mundo, a produção total em 2016 foi de 4.169.447 toneladas. Os Estados brasileiros de São Paulo, Goiás e Minas Gerais são os maiores produtores de tomate (IBGE, 2017).

A cultura do tomateiro é uma das mais atacadas por doenças na agricultura, o que pode influenciar enormemente a produção de frutos em quantidade e qualidade. Dentre os problemas fitossanitários do tomateiro destacam-se os nematoides por serem a causa de grandes perdas nas lavouras de tomate no Brasil. Dentre os fitonematoides, dois grupos se destacam por serem bastante comuns nas áreas brasileiras: *Meloidogyne* e *Pratylenchus*, sendo que o primeiro provoca galhas nas raízes e ocorre na maioria dos plantios intensivos de tomate e de outras hortaliças, interferindo na absorção de água e de nutrientes na planta (EMBRAPA, 2003).

Quatro espécies do gênero *Meloidogyne* se destacam como causadoras de galhas nos tomateiros: *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* e *M. hapla*. As duas primeiras são as de ocorrência comuns no território brasileiro com maior número de hospedeiros entre as hortaliças. Todavia, outra espécie, *M. enterolobii* (Sin. *M. mayaguensis*) foi registrada no Estado de São Paulo como causadora de danos econômicos a diversas espécies olerícolas, entre elas o tomateiro (CARNEIRO et al., 2006).

A densidade populacional de nematoide é fortemente influenciada pelo cultivo sucessivo da cultura numa mesma área, o que é uma característica nas áreas de plantio de tomateiro. FILGUEIRA (2000) recomenda fazer a rotação de culturas por 3 a 5 anos com culturas não solanáceas com o objetivo de reduzir a população de nematoides no solo. Outras medidas de controle é o uso de cultivares resistentes. O melhoramento genético no tomateiro resultou no desenvolvimento de cultivares com resistência a nematoides com *M. javanica*, *M. incognita* e *M. arenaria*. Todavia, essas variedades de tomateiro não são resistentes ao *M. enterolobii* (GUIMARÃES et al., 2003). Rosa et al. (2014) ao estudar a reação de dois genótipos experimentais e dez híbridos de tomateiro a *M. enterolobii* concluiu que todos esses materiais são sensíveis a esta espécie de nematoide. Assim, o cultivo de tomateiro em área com histórico de *M. enterolobii* constitui em sério risco de perda de produtividade. Outras medidas de controle de nematoides são o uso do controle químico e agentes antagonistas, dentre outros.

Segundo Agrios (2004), o ciclo de vida do nematoide, considerando a fase de ovo até a fase adulta, varia de 28 a 70 dias, dependendo da temperatura, sendo que no inverno o ciclo é maior. O ciclo de vida tem início com o ovo, inicialmente com uma célula apenas e que depois de várias mitoses ocorre o desenvolvimento do embrião e, conseqüentemente, a formação do juvenil do primeiro estágio. O juvenil do segundo estágio se forma após a primeira ecdise. Após eclosão, o juvenil do segundo estágio (J2) migra do solo para as raízes do tomateiro, penetrando atrás da coifa até atingir o sistema radicular da planta. Ainda na fase juvenil do segundo estágio existe células do primórdio sexual, diferenciando-se em machos e fêmeas, após o processo de parasitismo no hospedeiro. Após 4 ecdises, ocorre a fase adulta, sendo o macho com formato filiforme, enquanto que a fêmea tem formato piriforme, sendo capaz de ovopositar até 2580 ovos (CAMPOS, 2000).

Os sintomas típicos causados pelo nematoide do gênero *Meloidogyne* são engrossamentos das raízes (galhas), o que dificulta a translocação de água e nutrientes para a parte aérea das plantas, como consequência, resultam no amarelecimento, murcha e morte da planta, além de abrir portas de entrada para outros patógenos do solo (FILGUEIRA, 2000). A galha é resultado de hipertrofia e hiperplasia celular, iniciada poucas horas após a penetração dos J2 e estabelecimento do parasitismo.

2.2 Controle biológico de *Meloidogyne* spp. com bactérias

Um dos maiores enfoques dos estudos de bactérias antagônicas a nematóides tem sido no gênero *Pasteuria*, cujo primeiro relato foi feito no início do século passado. Observa-se, desde então, um número relativamente grande de trabalhos realizados com esse gênero, visando ao controle biológico de fitonematóides. Na década de 90, à grande dificuldade de produção massal de endosporos, *Pasteuria* spp era o entrave para o emprego comercial (Campos et al., 1998; Norinsuisansho Nogyo Kenkyu, 2001). No entanto, hoje este problema foi sanado e temos produtos com formulação à base de *Pasteuria* sp. sendo comercializado pela empresa Syngenta.

O termo rizobactéria é usualmente empregado para bactérias de solo adaptadas à região da rizosfera. No entanto, como há vários relatos de que tais microrganismos são capazes de colonizar desde a superfície até o córtex da raiz (Sturz, 1995), o termo rizobactéria estará sendo empregado aqui para especificar qualquer bactéria obtida da parte externa da raiz ou cujo método empregado no seu isolamento não permita especificar se as suas colônias se encontravam na parte externa ou interna das raízes. Quanto às bactérias endofíticas, em princípio são todas aquelas que passam todo o seu ciclo de vida ou parte dele no interior dos tecidos vegetais e que aparentemente não acarretam qualquer sintoma de doenças. Conforme a definição de bactérias endofíticas, muitas delas poderão também ser encaradas como rizobactérias e *vice-versa*.

Em princípio, pode-se dividir as rizobactérias em filamentosas (actinomicetos) e não filamentosas. Em geral, observa-se que aquelas com característica não filamentosa podem ser isoladas e cultivadas em meios de cultura com relativa facilidade, o que permite o uso de tais microrganismos para a produção de substâncias biologicamente ativas. Os primeiros trabalhos na área de nematóides, com 244 isolados de rizobactérias, permitiram observar que 12% desses microrganismos apresentavam algum efeito antagônico a *Meloidogyne incognita* (Campos et al.,

1998). Também existe evidência de controle dos nematóides *Meloidogyne* spp. em banana, milho e tomate, através do emprego das rizobactérias *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas putida* (Aalten *et al.*, 1998).

Em alguns estudos com bactérias do gênero *Bacillus* foram obtidos resultados tão bons que os autores decidiram patentear a combinação de *Bacillus thuringiensis* e *B. sphaericus*, denominada NOVO-BIOTECH-7996, para o controle de fitonematóides (Bchir & Bchir, 2000). Analogamente, o uso de *Bacillus firmus* (Feldman *et al.*, 1999) e da combinação de *B. firmus* e *B. cereus* (Peleg *et al.*, 2002) também foram patenteados para o controle de fitonematóides, especialmente aqueles do gênero *Meloidogyne*. Enfim, o número expressivo de patentes recentemente publicadas sobre tal assunto deixa evidente o potencial que as rizobactérias apresentam para o controle de fitonematóides (alguns exemplos são: Heins *et al.*, 2003; Warrior *et al.*, 2001; Ellis *et al.*, 2001; Heins *et al.*, 1999; Germida *et al.*, 1999; Elawad & Hague, 1999; Germida *et al.*, 2001; Bchir, 1997).

Reconhecendo o grande potencial das rizobactérias, Coimbra (1998) realizou o isolamento e através de testes *in vivo* em tomateiro, observou-se que 40,8% desses isolados apresentavam algum tipo de antagonismo a *Meloidogyne javanica*.

Em princípio, podem ser vários os mecanismos de ação de rizobactérias (Weller & Cook, 1983; Higinbotham, 1968; Cleland, 1990; Hagen, 1990; Stirling, 1991), sendo um deles correspondente à produção localizada de metabólitos com propriedades nematocidas, o que pode auxiliar no desenvolvimento de novos métodos de controle de fitonematóides menos tóxicos ao homem e meio ambiente, mais eficientes e de custos mais baixos. Os resultados são bastante animadores, pois já se demonstrou a capacidade de produção de substâncias tóxicas a fitonematóides por parte de rizobactérias dos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Desulfovibrio*, *Clostridium*, *Chromobacterium* e *Enterobacter* (Dicklow *et al.*, 1995; Fortuner & Jacq, 1976; Johnston, 1959; Rodriguez-Kabana *et al.*, 1965; Wilt & Smith, 1970; Lizuka *et al.*, 1962; Becker *et al.*, 1988). No caso específico de *Pseudomonas fluorescens*, sabe-se que a substância ativa no controle de *Globodera rostochiensis* em batata é o 2,4-diacetilfloroglucinol (Cronin *et al.*, 1997).

Ali *et al.* (2002), observaram que isolados de *Pseudomonas aeruginosa*, capazes de produzir substâncias nematocidas, reduziram significativamente a densidade populacional de *Meloidogyne javanica* quando eram inoculados em sementes antes do plantio.

As bactérias endofíticas colonizam um nicho ecológico semelhante aos dos patógenos de que causam doenças vasculares, o que pode favorecê-las como candidatas potenciais a agentes de biocontrole. Em decorrência, têm sido estudadas no controle de fungos (Brooks *et al.*, 1994; Nowak *et al.*, 1995) e bactérias fitopatogênicas (Assis *et al.*, 1998; Nascimento, 1998).

Hallmann *et al.* (1995) avaliaram, em casa de vegetação, o efeito de 72 isolados de bactérias endofíticas obtidas de pepino e algodão no controle de *Meloidogyne incognita*. Observou-se que *Aerococcus viridans*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas vesicularis*, *Serratia marcerens* e *Sphingomonas paucimobilis* reduziram em até 50 % a infecção pelo nematóide em plantas de pepino, evidenciando o potencial de bactérias endofíticas para o controle de nematóides.

Em 2000, com 81 isolados de bactérias endofíticas, obtidos do sistema radicular de espécies de *Brachiaria* sp., *Crotalaria* sp., *Zea mays*, *Capsicum annum*, *Tagetes erecta*, *Lycopersicon esculentum* e *Triticum aestivum*, Naves (2000) observou que os metabólitos de sete isolados foram altamente promissores para a produção de substâncias com propriedades tóxicas a *Meloidogyne* spp. Quando na forma bruta, os metabólitos de tais bactérias afetaram tanto a mortalidade quanto a eclosão de juvenis do segundo estágio de tal nematóide, com efeitos similares ou superiores aos observados para o nematicida Aldicarb.

Os actinomicetos são bactérias Gram positivas, pertencentes à ordem Actinomycetales, com crescimento filamentosso assemelhando-se a hifas fúngicas. Em meio de cultura sólido formam-se filamentos ramificados, firmemente aderidos ao Agar, que se ramificam como micélio fúngico, formando esporos assexuados em suas extremidades (Pereira, 1995). Em geral, o gênero *Streptomyces* tem 70 a 90 % de ocorrência nas amostras de solo, seguido de *Nocardia*, *Actinomyces* e *Micromonospora* (Siqueira, 1988). Poucos trabalhos têm explorado o uso de actinomicetos no controle de doenças de plantas, apesar da enorme quantidade de metabólitos secundários produzidos. Existem evidências sobre a sua importância na rizosfera, influenciando o crescimento de plantas através da sua ação sobre patógenos dessa região (Crawford *et al.*, 1993). Espécies de *Streptomyces*, por exemplo, têm demonstrado eficácia na proteção de plantas contra fungos e bactérias fitopatogênicas tanto em casa de vegetação quanto no campo (Filnow & Lockwood, 1985; Reddi & Rao, 1971; Tu, 1986; Crawford *et al.*, 1993).

Os primeiros relatos da associação entre actinomicetos e nematóides ocorreram em 1851 (Sayre & Starr, 1988). Naquela época não se conhecia detalhadamente esse grupo de microrganismos, porém o autor o descreveu como um procarioto filamentosso, concluindo que se tratava de um actinomiceto. Desde então, há vários relatos de isolamento de tais microrganismos dos corpos de diversos nematóides (Dürschner, 1984; Walter & Kaplan, 1990; Nour *et al.*, 2003). Além disso, actinomicetos também já foram isolados de cistos de *Hetrodera trifolli* e de massa de ovos de *Tylenchulus semipenetrans* (Hay & Skip, 1993; Walter & Kaplan, 1990).

Alguns trabalhos têm demonstrado a eficácia dos actinomicetos na redução populacional de fitonematóides. Dicklow *et al.* (1993), por exemplo, verificaram que um isolado do gênero *Streptomyces* reduziu o número de galhas de *M. incognita* raça 4 em raízes de pimenta, bem como as populações de *Tylenchulus reniformis* e *Pratylenchus penetrans* em raízes de tomate e de morango, respectivamente. Posteriormente, tal microrganismo foi identificado como *Streptomyces costaricanus* (Esnard *et al.*, 1995). Krechel *et al.* (2002) estudaram o efeito de vários isolados do gênero *Streptomyces* sobre *M. incognita* em casa de vegetação e observaram reduções de 50 a 85 % no número de galhas e de 40 a 100 % no número de ovos.

Isolados de *Streptomyces* eficientes no controle da sarna da batateira em campo e em inibir o crescimento de fungos e bactérias fitopatogênicos *in vitro*, também demonstraram capacidade de redução populacional de *Pratylenchus penetrans* em raízes de alfafa (Samac & Kinkel, 2001)

Antes do plantio de tomate e banana, Jonatham *et al.* (2000) aplicaram vários isolados de actinomicetos em solo infestado com *M. incognita*. Após doze semanas, constataram redução do número de ovos e de galhas, bem como promoção do crescimento vegetativo de ambas as culturas.

Um caso bastante estudado e explorado de produção de nematicidas a partir de microrganismos consiste na utilização de *Streptomyces avermectilis*. O emprego deste actinomiceto permite a obtenção de substâncias genericamente conhecidas como avermectinas, que apresentam excelente atividade contra nematóides como *Meloidogyne incognita*, *Hoplolaimus galeatus*, *Tylenchulus semipenetrans* e *Tylenchorhynchus dubius* (Campos *et al.*, 1998; Garabedian & Van Gundy, 1983; Sasser *et al.*, 1982; Blackburn *et al.*, 1996). Tais substâncias e seus derivados semi-sintéticos podem apresentar efeito nematicida até dez vezes superior ao do aldicarbe, no entanto, com baixa toxicidade a mamíferos (Garabedian & Van Gundy, 1983). Desta forma, um produto a base de avermectina foi patenteado para uso no controle de vários fitonematóides (Shen *et al.*, 2002).

Coimbra (2003) realizou o isolamento de actinomicetos de diversas espécies vegetais para o controle de *Meloidogyne javanica* e observou que, na forma bruta, os metabólitos de nove isolados apresentavam efeito similar ao de aldicarbe.

2.2.1 Ação de enzimas produzidas por bactérias sobre nematoide

Em alguns casos, as bactérias antagonistas são capazes de produzir enzimas tais como proteases, collagenases e lipases que atuam como fatores de patogenicidade e de virulência contra os nematóides de vida livre e parasitas vegetais. A espécie *Bacillus nematocida* estirpe B16 produz a serina protease alcalina que degrada a cutícula de juvenil e a casca de ovo de *Panagrellus redivivus* (Niu *et al.*, 2006a). Quando o extrato bruto (100%) da enzima purificada foi utilizado, ocorreu 95% de morte após uma exposição de 48 horas. Esta espécie bacteriana também produz a protease neutra Bae16 e a serina protease Bace16 extracelular que também possuem atividades degradantes da cutícula contra *P. redivivus* e do nematóide fitoparásita *Bursaphelenchus xylophilus* (Niu *et al.*, 2006b, 2007). A protease alcalina extracelular BLG4 da estirpe G4 de *Brevibacillus laterosporus* degrada 95% da epiderme de *P. redivivus* após uma exposição de 60 horas (Huang *et al.*, 2005). A protease neutra NPE-4 também é produzida por *B. laterosporus* G4 e atua de forma sinérgica com BLG4 na degradação da cutícula e da epiderme dos nematoides (Huang *et al.*, 2005; Tian *et al.*, 2006; Tian *et al.*, 2007). Os esporos de *B. laterosporus* se ligam às cutículas de nematóides, mas os mecanismos de ligação e germinação ainda não foram estudados (Tian *et al.*, 2007). A clonagem e sequenciação do gene que codifica as enzimas produzidas por *B. nematocida* B16 e *B. laterosporus* G4 mostraram que são altamente conservadas entre essas bactérias (Niu *et al.*, 2006a; Tian *et al.*, 2006).

Stenotrophomonas maltophilia G2 tem alta atividade nematicida contra *B. xylophilus* e *P. redivivus* e sua serina protease foi encontrada responsável pelo fator de patogenicidade envolvido na degradação da cutícula (Huang *et al.*, 2009). Chitinases produzidas por *S. maltophilia*, *Lysobacter enzymogenes* e *Bacillus* sp. D2 contribui para a degradação da casca do ovo e inibe a eclosão em *Globodera rostochiensis* e outros nemátodos, tanto no interior como no solo (Cronin *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2006; Margino *et al.*, 2012).

As espécies do gênero *Pseudomonas* produzem uma série de compostos com atividade contra nematodes. A protease extracelular aprA da estirpe CHA0 de *P. fluorescens* causa a morte e inibe a incubação de ovos em *M. incognita* (Siddiqui *et al.*, 2005). Uma mutação no gene regulador global GacA, que controla a expressão de aprA, diminui a atividade da bactéria contra *M. incognita*. O

cianeto de hidrogênio e o 2-4-diacetilphloroglucinol produzido pelo CHA0 também desempenham um papel no controle de nematoides (Siddiqui e Shaukat, 2003). O antibiótico 2,4-diacetilphloroglucinol produzido pela estirpe F113 de *P. fluorescens* é responsável pela capacidade dessa cepa para dobrar a incubação de ovos em *G. rostochiensis* e também diminuir três vezes a mobilidade dos juvenis incubados in vitro e no solo. Os mutantes incapazes de produzir os antibióticos não foram tão eficientes quanto a cepa do tipo selvagem (Cronin et al., 1999).

Pseudomonas aeruginosa e outras bactérias patogênicas humanas, como *Burkholderia pseudomallei*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Serratia marcescens*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes* e *Staphylococcus aureus*, produzem moléculas com atividade tóxica contra nematoides. Estas moléculas são consideradas como causadoras de fatores de virulência contra *C. elegans* e incluem a antibiótica fenazina e cianeto de hidrogênio de *P. aeruginosa*, e uma endotoxina neuromuscular, uma citolisina, duas proteases extracelulares (gelatinase e serina protease) e uma variedade diversa de toxinas de outras bactérias (Kurz e Ewbank, 2000; Qin et al., 2000; Garsin et al., 2001; Sifri et al., 2002). Todos esses estudos foram conduzidos com a principal intenção de estudar patogênese no ser humano usando *C. elegans* como modelo. Infelizmente, essas bactérias têm poucas chances de serem liberadas para serem usadas como agentes de controle biológico de nematoides parasitas.

Bacillus thuringiensis é considerado um agente de biocontrole muito bem sucedido no manejo de pragas de insetos (Bravo et al., 2011). Após a esporulação, *B. thuringiensis* produz a proteína Cry (cristal) que tem propriedades inseticidas e nematicidas. Existem mais de 300 genes de *B. thuringiensis* que codificam proteínas Cry que são classificadas em 68 famílias de acordo com sua similaridade de seqüência (Crickmore et al., 1998; www.lifesci.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt). Entre estas famílias, Cry5, Cry6, Cry12, Cry13, Cry14, Cry21 e Cry55 mostram toxicidade contra nematoides (Guo et al., 2008), mas apenas Cry5B, Cry5Ba2, Cry6A, Cry6Aa2 e Cry55Aa1 foram encontrados ativos contra nematoides parasitas de plantas (Guo et al., 2008; Luo et al., 2013). Essas proteínas quando ingeridas por nematoides são clivadas pelas proteases intestinais e os produtos causam a lise de células epiteliais, resultando na morte da praga alvo. Cry6A com 54-kDa está entre as proteínas na faixa de tamanho que podem ser ingeridas por *M. incognita*. As plantas de tomate transgênico que expressam Cry6A reduziram a reprodução de *M. incognita* (Li et al., 2007). Cry5Ba2, Cry6Aa2 e CryrAa1 mostraram toxicidade para juvenis de *M. hapla* (Guo et al., 2008). Além disso, as proteínas Cry de *B. thuringiensis* produzem uma série de outros fatores de virulência, como inclusões de citrato (citólítico), exotoxinas de baixa massa molecular, serina proteases, quitinases, colagenases e uma metaloproteinase (Guttmann e Ellar, 2000; Raymond et al., 2010; Jisha et al., 2013; Luo et al., 2013).

Os compostos voláteis podem ser orgânicos ou inorgânicos e podem ser produzidos por bactérias. As bactérias do gênero *Xenorhabdus* são transportadas no intestino do nematóide entomopatogênico *Steinernema*, enquanto que *Heterorhabdite* carrega o gênero bacteriano *Photorhabdus*. Essas bactérias produzem toxinas que aumentam a virulência do transportador de nematóide em relação aos insetos (Aatif et al., 2012). Quando essas bactérias foram testadas contra

fitonematoides, demonstraram que inibem a eclosão e promovem a mortalidade de juvenis de *Meloidogyne* por alelopatia através da produção de amônia (Grewal et al., 1999).

Os compostos orgânicos voláteis (COVs) liberados por bactérias têm um baixo ponto de ebulição, natureza lipofílica e estão no estado líquido apenas sob alta pressão de vapor (Baldwin et al., 2006; Heil e Ton, 2008; Asensio et al., 2008). A produção de COVs é influenciada por condições ambientais, disponibilidade e fonte de nutrientes, oxigênio, umidade e comunidade microbiana (Leff e Fierer, 2008; McNeal e Herbert, 2009; Insam e Seewald, 2010). Muitas bactérias produzem COVs que exercem alguma influência sobre os nematoides. Alguns desses COVs têm efeitos prejudiciais sobre os nematoides, causando imobilidade, repelência ou morte, enquanto os outros podem atraí-los. No banco de dados de voláteis emitidos por microorganismos (DOVE-MO), existem 671 VOCs produzidos por 212 espécies bacterianas (Effmert et al., 2012). Os COVs produzidos por bactérias têm alguns efeitos antagônicos contra os nematoides. Gu et al. (2007) realizaram seleção *in vitro* de COVs obtidos a partir de 200 isolados bacterianos pertencentes a sete espécies. Entre esses 22 isolados que mostraram 100% de atividade nematicida contra *P. redivivus* e *B. xylophilus*, 21 isolados pertenciam a três espécies do gênero *Bacillus* (*B. simplex*, *B. subtilis* e *B. weihenstephanensis*) e uma de *Serratia marcescens*. Os nove COVs que inibiram 100% dos nematoides foram 2-octanol, benzeno-acetaldeído, decanal, benzaldeído, 2-nonanona, 2-undecanona, ciclo-hexeno, dissulfureto de dimetilo e fenol. O benzaldeído produzido por todos os isolados bacterianos mostrou maior atividade nematicida. *Bacillus megaterium* YFM3.25 e *Lysinibacillus mangiferahumi* M-GX18T produziram uma série de COVs que mataram os juvenis de *M. incognita* e inibiram a eclosão (Huang et al., 2010; Yang et al., 2012).

Os COVs podem ser classificados como fatores de virulência, permitindo que bactérias saprófitas explorem nematoides como fonte de nutrientes. Niu et al (2010) demonstraram que *B. nematocida* B16 produz pelo menos sete COVs que atraem *C. elegans* em direção a suas colônias e, uma vez que as bactérias entram no intestino de nematoide, secretam duas proteases, denominadas Bace16 e Bae16 com uma ampla faixa de substrato que almeja principalmente proteínas vitais do intestino causando a morte do hospedeiro. Este mecanismo de atração e subsequente morte do nematoide não foi demonstrado para fitonematoides, mas fornece uma estrutura para futuras investigações e aplicação no biocontrole. Os COVs também podem atuar como moléculas de sinalização na comunicação de células bacterianas de maneira dependente da densidade, um comportamento coordenado para regular a expressão de genes conhecidos como detecção de quórum. Entre estes infoquímicos, as lactonas homoserina são comumente encontradas.

Várias espécies de *Streptomyces* e *Bacillus* produzem dissulfureto de dimetilo, que mostra atividade inibitória contra nematodes e também induz resistência sistêmica em plantas (Schöller et al., 2002; Faruk et al., 2010). Além disso, os COVs produzidos por *Bacillus subtilis*, *B. amyloliquefaciens* e *Enterobacter cloacae* promovem o crescimento de *Arabidopsis thaliana* (Ryu et al., 2003). Assim, os COVs desempenham diversos papéis na interação entre nematoides e plantas e podem ser usados para o desenvolvimento de novas aplicações no gerenciamento integrado de fitonematoides.

2.3 Controle biológico de *Meloidogyne* spp. com *Trichoderma* sp.

Os fungos do gênero *Trichoderma* são saprófitos, ubíquos e altamente interativos na raiz e no solo, bem como no interior de plantas (POMELLA; RIBEIRO, 2009). Se reproduzem assexuadamente tendo a sua fase teleomófica pertencente ao gênero *Hypocrea*. Embora sejam considerados fungos de vida livre, já há evidências de que espécies de *Trichoderma* podem ser oportunistas, simbiontes avirulentos de plantas, bem como parasitas de outros fungos (SAMUELS, 2006). São encontrados com mais frequência em solos de regiões de clima temperado e tropical (HARMAN *et al.*, 2004), sendo algumas espécies cosmopolitas enquanto outras limitadas em sua distribuição geográfica (SAMUELS, 2006). *Trichoderma* sp. se caracteriza pelo crescimento rápido em meio de cultura, com a produção de um micélio aéreo e esparso, com a formação de pústulas conidiogênicas brancas ou verdes (BISSET, 1991). Possuem coloração verde ou hialina sendo às vezes amarelos. Quando presentes, os clamidósporos são tipicamente globosos para subglobosos e são formados dentro ou nas pontas das hifas.

A grande importância econômica desses fungos para a agricultura se deve à capacidade de atuarem como antagonistas a uma gama de fitopatógenos de várias plantas cultivadas, como promotores de crescimento e indutores de resistência de plantas a doenças (FORTES *et al.* 2007; SILVA *et al.*, 2011; STEFANELLO e BONETT, 2013; AGUIAR *et al.*, 2013). O antagonismo é baseado em diferentes mecanismos como a competição por espaço e nutrientes o micoparasitismo e a produção de metabolitos antifúngicos (MOTLAGH e SAMIMI, 2013).

Um importante mecanismo de *Trichoderma* é a antibiose que ocorre quando metabólitos produzidos por *Trichoderma* sp. inibem o crescimento de outros fungos. Esses metabólitos podem ser voláteis ou não voláteis (BENÍTEZ *et al.*, 2004). Muitas espécies de *Trichoderma* já estudadas produzem metabólitos secundários tóxicos, como antibióticos e enzimas líticas capazes de inibir e destruir propágulos de fungos fitopatogênicos (HARMAN, 2000). Um outro ação esta relacionado a promoção de crescimento de plantas pela aplicação de isolados de *Trichoderma* spp. foi inicialmente relacionada ao controle de microrganismos prejudiciais as plantas. Entretanto pesquisas mostraram que tal efeito está relacionados à produção de hormônios ou fatores de crescimento; maior eficiência no uso de alguns nutrientes e aumento da disponibilidade e absorção de nutrientes pela planta (SILVA *et al.*, 2011; CONTRERAS-CORNEJO, 2009; AGUIAR *et al.*, 2013). *Trichoderma* pode solubilizar vários nutrientes, tais como fosfato de rocha, Fe^{3+} , Cu^{2+} , Mn^{4+} e Zn, que podem estar indisponíveis para determinadas plantas (HARMAN *et al.*, 2000).

A associação de *Trichoderma* com as raízes pode ainda induzir mecanismos de defesa na planta protegendo-a de vários patógenos (BENÍTEZ *et al.*, 2004). Os isolados de *Trichoderma* sp. colonizam a epiderme e as células do córtex das raízes e, dessa forma, ativam vias de sinalização, desencadeando respostas de defesa nas plantas (Brotman *et al.*, 2010). Estas produzem depósitos de parede celular, e fatores bioquímicos que limitam tanto o crescimento do próprio *Trichoderma*, quanto a entrada de agentes patogênicos (HARMAN *et al.*, 2004; MOTLAGH e SAMIMI, 2013). Segundo Romeiro (2007), plantas levadas ao estado de indução apresentam aumento nas atividades de enzimas, tais como, quitinases, glucanases e peroxidases, envolvidas nas rotas de percepção da

presença de patógenos em potencial e nas rotas de sinalização bioquímica a pontos distantes do sítio onde o sinal foi originado.

Na literatura existem poucas informações sobre os mecanismos utilizados pelas espécies de *Trichoderma* sobre os fitonematoides. O parasitismo direto de ovos e juvenis pelo aumento da atividade de quitinases e proteases produzido por *Trichoderma* é um indicativo da capacidade de infectar ovos (Sharon et al. 2001; Suarez et al., 2004; Sahebani e Hadavi, 2008), e indução dos mecanismos de defesa do hospedeiro. Enzimas extracelulares, tais como quitinase e protease, com atividade antifúngica, participam da relação de interação de *Meloidogyne* spp. e *Trichoderma* sp. (Sharon, et al. 2001). Dentre os potenciais do uso de *Trichoderma* como agente de biocontrole podemos citar: é inócuo ao ser humano e ao meio ambiente, é de fácil propagação, principalmente, em substratos naturais e apresenta meia vida de prateleira quando formulado com boa viabilidade (Spiegel e Chet, 1998).

Para Harman *et al.* (2010), embora inúmeros microrganismos tenham sido apontados como antagonistas a patógenos oriundos do solo, poucos evoluíram para uso em escala comercial. No Brasil, a baixa disponibilidade de produtos a base de *Trichoderma* devidamente registrados no Ministério da Agricultura Pesca e Abastecimento (MAPA) e a falta de divulgação sobre os seus princípios e vantagens restringem a sua utilização (MACHADO *et al.*, 2012), principalmente no controle de *Meloidogyne* spp. Atualmente, algumas empresas vem comercializando isolados de *trichoderma* sp. no controle de fungos e nematoides mas poucos estudo foram feitos com relação a eficiência do controle em condições de campo e in vitro.

2.4 Produto biológico a base de Nem-Out™ no controle de nematoide

A compostagem é o processo biológico de decomposição e de reciclagem da matéria orgânica contida em restos de origem animal ou vegetal para formar um composto orgânico, um material estável e rico em húmus e nutrientes, com atributos físicos, químicos e biológicos superiores ao material original (matéria orgânica). Na agricultura, restos vegetais comumente ficam nas áreas de cultivo, causando alguns inconvenientes tais como abrigo para pragas, animais peçonhentos, multiplicação de agentes patogênicos e etc. Para atender a necessidade e acelerar o processo de decomposição dos restos vegetais são aplicados aditivos para compostagem, tornando sustentáveis esses restos de matéria orgânica e favorecendo a reciclagem de nutrientes.

O aditivo para compostagem Nem-Out™ possuem em sua composição básica enzimas (proteases, pectinases, celulasas, xilanases) e microrganismos (*Bacillus subtilis*, *B. licheniformes*, *Trichoderma longibrachiatum*) presentes em sua fórmula, os quais agem proporcionando a adequação da flora microbiana do processo de compostagem ao concorrerem com microrganismos indesejáveis. Com isso, promovem a diminuição de maus odores e da quantidade de revolvimento para a sua aeração. O aditivo permite que o composto seja estabilizado em menor tempo e com melhor qualidade. Por outro lado, as enzimas, bactérias (*Bacillus* sp.) e fungos (*Trichoderma* sp.) presentes na formulação dos aditivos para compostagem comercializados podem atuar nas fases do desenvolvimento dos fitonematoides.

Silva (2015) ao adicionar doses crescentes do aditivo Nem-Out™ em substrato com ovos de *Meloidogyne inconita* encontrou redução linear da densidade populacional e do fator de reprodução do nematoide. Esse resultado foi atribuído à presença de *Bacillus* no aditivo ea presença de enzimas e outros produtos metabólitos. Segundo esta autora, a presença do fungo *Thicoderma* no aditivo pode também ter contribuído para a supressão do nematoide, não só pela produção de metabólitos, mas também pelo parasitismo direto sobre ovos de nematoides através da produção de quitinase e pela indução de mecanismos de defesa da planta, embora não tenha realização sobre ovos do nematoide e nem sobre ação direta sobre os juvenis infectivos.

Alguns trabalhos têm sido feitos visando estudar a influência de *Bacillus* no controle do nematoide de galhas. Araújo e Marchesi (2009) ao avaliarem o efeito de *Bacillus subtilis* (PRBS-1) como promotor de crescimento e agente de supressão de nematóides formadores de galhas (*Meloidogyne* spp.) no cultivo do tomateiro, observaram redução da massa de ovos na raiz e concluíram que tal bactéria diminui a reprodução de nematoide formador de galhas em raízes desta planta.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da mistura de agentes de biocontrole e enzimas na eclosão, mortalidade e na reprodução de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* em tomateiro.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito de diferentes concentrações da mistura de agentes de biocontrole e enzimas na eclosão de *Meloidogyne incognita*;
- Avaliar o efeito de diferentes concentrações da mistura de agentes de biocontrole e enzimas na motilidade e mortalidade de *Meloidogyne incognita*;
- Avaliar o efeito de diferentes concentrações da mistura de agentes de biocontrole e enzimas na infectividade e reprodução de *Meloidogyne incognita* em tomateiro em casa de vegetação.

CAPÍTULO 2: AÇÃO DO PRODUTO BIOLÓGICO Nem-Out™ NA ECLOSÃO, MORTALIDADE E NA REPRODUÇÃO DE *Meloidogyne incognita* NO TOMATEIRO

1. INTRODUÇÃO

Meloidogyne incognita é uma das principais espécies de nematoides das galhas na cultura do tomateiro devido sua ampla distribuição geográfica e elevada gama de hospedeiros. Em sistema de cultivo extensivo e protegido esta espécie causa enormes perdas na produção desta hortaliça. Perdas causadas por *M. incognita* são estimadas em 38% na cultura do tomateiro (KATHY, 2000), podendo chegar a 100% dependendo da densidade populacional e da distribuição na área cultivada.

Os sintomas causados pelos nematoides de galhas são: lesões nas raízes, formação de galhas, amarelecimento, murcha e morte da planta (AGRIOS, 2004). Além de causar galhas radiculares os nematoides favorecem a penetração de outros patógenos no sistema radicular devido aos ferimentos provocados nas raízes (FILGUEIRA, 2000).

A aplicação de nematicidas químicos tem sido cada vez mais restrito seu uso pelos produtores para controlar os nematoides. Isto ocorre devido ao alto risco de contaminação ao meio ambiente e ao homem, em alguns casos, são de baixa eficiência. Desta forma, uma alternativa promissora e segura é o manejo com agentes de controle biológico.

Espécies de *Bacillus* e *Trichoderma* produzem metabólitos com atividade nematicida, inibindo deste o processo de eclosão e penetração do nematoide até sua reprodução ou atuando como promotor de crescimento de plantas (HOWELL, 1997; KAVITHA et al., 2007; SAHEBANI e HADAVI, 2008; CARVALHO, 2017; MOREIRA e FERREIRA, 2015).

Produtos a base de agentes de controle biológico, principalmente com espécies de *Bacillus* e de *Trichoderma* tem sido desenvolvido, visando o controle de fitonematoides. Há no mercado o Nem-Out™ um aditivo para compostagem resultante da mistura de enzimas (proteases, pectinases, celulasas, xilanases) e microrganismos (*Bacillus subtilis*, *B. licheniformes*, *Trichoderma longibrachiatum*) com a finalidade de otimizar o processo de decomposição da matéria orgânica de maneira equilibrada. Considerando os microrganismos presentes na composição deste aditivo com potencial ação antagônicas contra nematoides, podemos visualizá-lo como uma alternativa no manejo de *Meloidogyne* spp. na cultura do tomateiro. São poucos os estudos que avaliam a atuação e eficácia do aditivo Nem-Out™ na população da rizosfera de plantas de tomateiro (SILVA, 2015). Portanto, existe uma carência de estudos para avaliar concentrações da mistura desses agentes de biocontrole desde o processo de eclosão até a reprodução de *Meloidogyne* spp. Desta forma, o objetivo do presente estudo é avaliar o efeito de concentrações do produto comercial Nem-Out™ na eclosão, mortalidade e na reprodução de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* em tomateiro.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção de mudas de tomateiro

Sementes de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) cv. Kada grupo santa cruz foram semeadas em bandejas contendo substrato Tropstrato HT e mantidas em casa de vegetação. Mudas de tamanho ideal para o transplante e instalação dos experimentos foram obtidas 35 dias após a semeadura.

2.2 Identificação e multiplicação de *Meloidogyne incognita*

Para os experimentos utilizou inoculo proveniente da casa de vegetação do Laboratório de Pesquisa em Fitopatologia do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais. A partir de raízes de tomateiro infestadas com *Meloidogyne* spp. foi feita a confirmação da espécie por meio da técnica da configuração perineal (TAYLOR e SASSER, 1978). Para isto, fêmeas de aspecto branco leitosa foram retiradas ao acaso do sistema radicular e identificadas em microscópio óptico como *Meloidogyne incognita*. A seguir, a partir deste inoculo inicial foi feita a inoculação em mudas de tomateiro, mantidos em casa de vegetação em vasos plásticos com capacidade de 3 litros contendo areia e solo na proporção 2:1 (areia:solo), para multiplicação de *M. incognita* e obtenção do inóculo usado nos experimentos.

Durante o crescimento e desenvolvimento das plantas, foram realizadas irrigações diárias. As adubações de cobertura foram feitas quando necessário de acordo com o recomendado para a cultura. Tratamentos fitossanitários foram realizados de acordo com as necessidades da cultura evitando produtos com ação nematicida.

2.3 Obtenção de ovos e juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne incognita*

Raízes de plantas de tomateiros conforme descrito no item anterior cultivadas em casa de vegetação e infestadas com *M. incognita* foram lavadas, cuidadosamente, e cortadas em pedaços de aproximadamente 1 cm. A seguir, as raízes foram trituradas em liquidificador por 40s em solução de hipoclorito de sódio a 0,5%, seguindo-se a técnica de Hussey e Barker (1973), modificada por Boneti e Ferraz (1981). Em seguida, foi adicionado, aproximadamente, 3 g de caulim por tubo de centrifuga de 50 mL, para realização da limpeza dos ovos pela técnica de Coolen e D'Herde (1972). Os ovos retidos na peneira de 0,025 mm foram recolhidos em béquer de 500 mL. Para obtenção dos juvenis do segundo estágio (J2) de *M. incognita*, os ovos foram colocados em câmara de eclosão, formada com tela e papel de espessura fina sobre funil de Baermann, mantidas à temperatura ambiente. Foram utilizados nos experimentos apenas os J2 eclodidos no terceiro dia. Desta forma foram obtidos os ovos e os J2 de *Meloidogyne* spp. usados nos ensaios.

2.4 Instalação e avaliação dos experimentos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Pesquisa de Fitopatologia e na casa de vegetação da Universidade Federal de Minas Gerais, *campus* Montes Claros-MG. Nos experimentos utilizou-se o produto comercial Nem-Out™ da empresa *Alltech Crop Science*, o qual é classificado como aditivo de compostagem, a base de mistura de enzima (protease, celulase, xilanase) e agentes antagonistas de nematoides como *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformes* e *Trichoderma longibrachiatum* na concentração de $3,75 \times 10^8$ UFC/g.

Experimento de eclosão: suspensão de ovos obtidos conforme descrito no item 2.3, foi previamente calibrada em microscópio óptico para 5.985 ovos/mL. A seguir, em câmara de eclosão formada com tela e papel de espessura fina, mantida em placa de Petri foram adicionado 6 mL da suspensão de ovos de *M. incognita*. Após esse procedimento, foi colocado sobre a câmara de eclosão soluções de aditivo para compostagem, diluído em 40 mL de água, contendo as seguintes concentrações: 1,25; 2,5; 5; 10; 20 e 40 g L⁻¹ (p/v) do produto comercial Nem-Out™. As placas foram incubadas em sala a temperatura ambiente de aproximadamente $25 \pm 3^\circ\text{C}$ por 14 dias. Ovos incubados em câmara de eclosão contendo apenas água foram considerados testemunhas. Desta forma, os tratamentos consistiram de sete concentrações do produto (0; 1,25; 2,5; 5; 10; 20 e 40 g L⁻¹). O experimento foi instalado em delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), com 6 repetições.

A primeira leitura de eclosão foi realizada 48 horas após instalação do experimento e as demais leituras de 24 em 24 horas até 14 dias. Em cada período de leitura, os J2 foram recolhidos com auxílio de pisseta contendo água para frascos plásticos, identificados com relação a cada tratamento. Em seguida, o número de J2 eclodidos foram contados em microscópio de óptico, no aumento de 40X, em lâmina de Peters.

Experimento de motilidade e mortalidade: Os J2 foram expostos às mesmas concentrações do aditivo para compostagem mencionadas no experimento anterior. Para isto, foram pipetados 4 mL de suspensão de J2 previamente calibrada com 1.848 J2 de *M. incognita*, obtidos como descrito anteriormente, e transferidos para tubos de ensaio de vidro de 10 mL contendo as soluções do produto comercial Nem-Out™ a serem avaliadas quanto a ação nematocida. Os J2 mantidos em água foram considerados testemunha. Após esse procedimento o tubo foi vedado com filme de pvc transparente e incubado em sala a temperatura ambiente por 24 horas. O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, sendo 7 tratamentos, com seis repetições.

Após o tempo de incubação, os J2 foram vertidos para peneira formada de tela de 11 μM , enxaguados com água destilada, substituindo assim a solução, e recolhidos com jatos de água com pisseta para frascos. A seguir, foi realizada a leitura em microscópio óptico do número de J2 móveis e imóveis, 100 ao acaso, em cada parcela dos tratamentos. Após a leitura, os J2 foram transferidos novamente para os tubos de ensaio e armazenados em água por 12 horas nas mesmas condições. Após esse tempo de exposição, quantificou-se o número de J2 móveis e imóveis em microscópio, conforme mencionado anteriormente. Os J2 foram considerados inativos quando não se movimentaram ou quando apresentaram o corpo com aspecto retilíneo ou retorcido. Espécimens que permaneceram inativos após 12 horas em água foram classificados como mortos.

Experimento de Infectividade e reprodução: Para o estudo do efeito do produto biológico Nem-Out™ sobre a reprodução de *M. incognita*, foram realizados dois modos de aplicação das diferentes concentrações do produto comercial em solo infestado com ovos. Para isto, em vasos plásticos com capacidade de 1 litro contendo 800 cm³ de substrato na proporção 2:1 (areia:solo), aplicou na cova 40 mL de solução do produto comercial Nem-Out™, seguido pelo transplante de muda de tomateiro cv. Kada na cova, obtidas conforme descrito no item 2.1. A seguir, suspensão de ovos dispersos em 2 mL de água contendo 1.846 de *M. incognita* foram colocados em 2 furos de ± 3 cm de profundidade ao redor das mudas. Em outro tratamento, as mudas foram transplantadas no substrato dos vasos e irrigadas com mesmo volume de solução do produto comercial Nem-Out™ nas concentrações descritas anteriormente, e inoculados com ovos de *M. incognita*. Mudanças transplantadas para os vasos sem aplicação das soluções do produto biológico Nem-Out™ e inoculadas com ovos de *M. incognita* foram consideradas como testemunhas. Foi empregado o delineamento inteiramente casualizado, com sete repetições, no esquema fatorial 6x2+1, sendo seis concentrações do Nem-Out™ (1,25; 2,5; 5; 10; 20 e 40 g L⁻¹), duas formas de aplicação do produto (Superfície e Cova) e mais um tratamento adicional (Testemunha, sem o produto). Cada parcela foi constituída de um vaso com uma planta, totalizando 91 parcelas.

Os vasos foram mantidos em casa de vegetação, sendo as irrigações feitas quando necessárias e as adubações feitas conforme a recomendação da cultura.

Trinta dias após a inoculação, a parte aérea das plantas foram cortadas e retirado, cuidadosamente, o sistema radicular do solo em água parada num balde de 10 litros. A seguir, as massas de ovos dos nematoides nos sistemas radiculares foram coloridas de vermelho, em solução contendo corante artificial empregado na fabricação de sucos, conforme técnica de Rocha et al. (2005). Após a coloração, as raízes foram deixadas sobre papel toalha por 10 minutos, possibilitando, assim, a avaliação do peso da matéria fresca das raízes, seguida da contagem do número de massas de ovos e de galhas por sistema radicular. Para a quantificação do número de ovos por sistema radicular, as raízes foram cortadas em pedaços de, aproximadamente, 1 cm de comprimento e os ovos obtidos pela técnica de Hussey e Barker (1973). Em microscópio óptico foi feita a quantificação do número de ovos de *M. incognita* por sistema radicular. Em seguida, foi estimado o número de galhas, massas de ovos e de ovos/ g de raiz. O cálculo do fator de reprodução (FR) foi obtido pela divisão entre as densidades populacionais final e inicial para cada tratamento ($FR = P_f/P_i$), conforme proposto por Seinhorst (1967).

2.5 Análise estatística

Os dados de mortalidade, motilidade e eclosão foram inicialmente submetidos à análise de variância de regressão. Considerando que tais dados não apresentaram normalidade e nem variâncias homocedásticas, foi feita então a análise não paramétrica sendo os tratamentos comparados pelo teste Kruskal-Wallis ($p \leq 0,05$).

Os dados de infectividade e reprodução foram submetidos à análise de variância e de regressão. As médias do fator qualitativo (forma de aplicação) foram comparadas pelo teste F, adotando-se o nível de 5% de probabilidade. Para o fator quantitativo (concentrações) foram ajustadas equações, testando-se os coeficientes pelo teste “t”. Para a comparação das médias da Testemunha com cada média dos tratamentos (concentrações x forma de aplicação) foi aplicado o teste de Dunnett até 5% de significância.

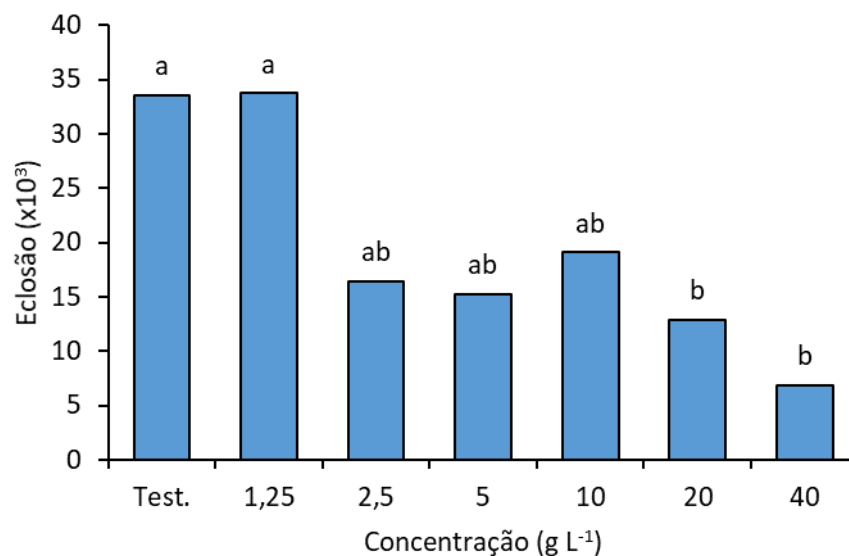
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Eclosão e mortalidade de juvenis

Para os dados de eclosão, motilidade e mortalidade de J2, devido à grande instabilidade das variáveis avaliadas, observou-se a falta de normalidade e homogeneidade das variâncias, o que não atende aos pressupostos básicos para a realização da análise de variância e ajustes de equações (Quadros 1 e 2 - Apêndice). Deste modo, conforme recomendado neste caso, foi feita análise estatística não paramétrica. Dentre os testes não paramétricos o Kruskal-Wallis é o recomendado para delineamento inteiramente casualizado (Pimentel-Gomes, 2009).

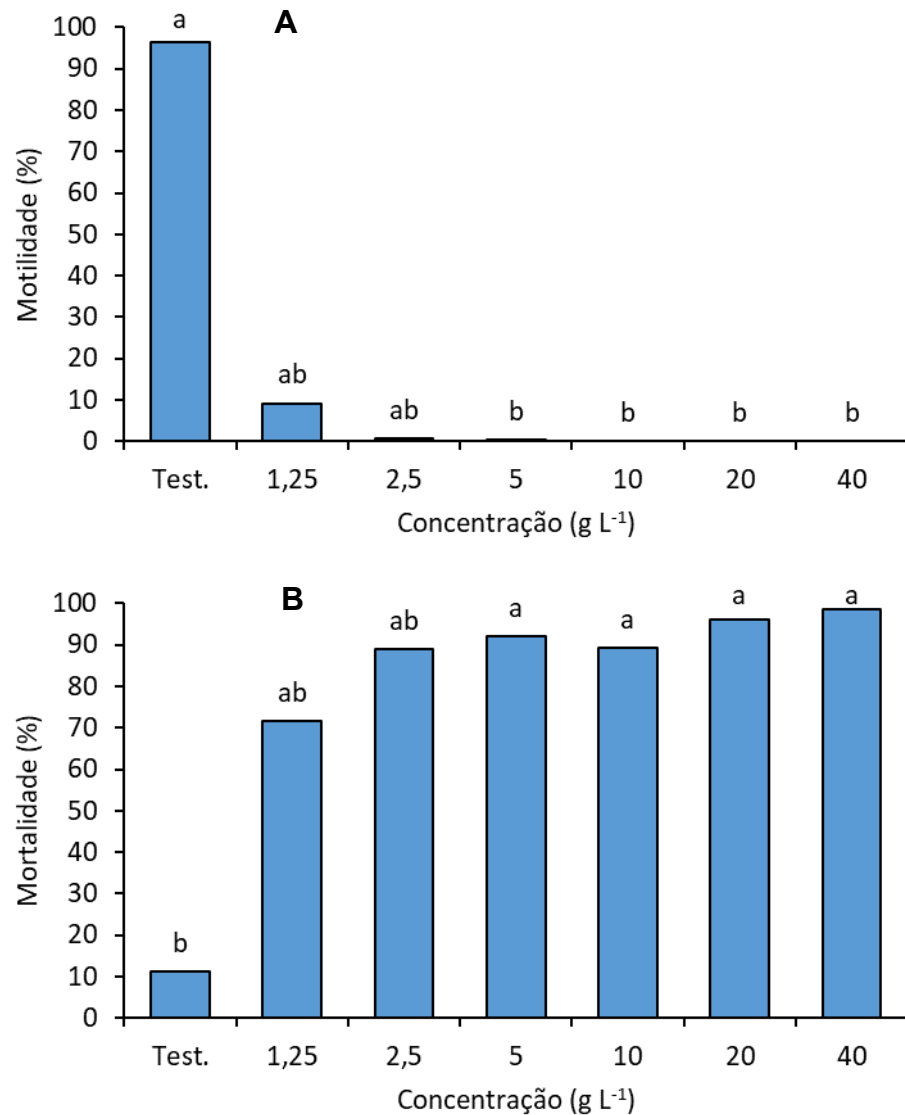
A exposição dos ovos de *M. incognita* às concentrações de 1,25 a 10 g L⁻¹ do produto Nem-Out™ não diferiram significativamente da testemunha quanto a eclosão dos J2 (Gráfico 1). No entanto, nas concentrações de 20 e 40 g L⁻¹ ocorreu redução significativa na eclosão dos J2. Quando os J2 de *M. incognita* foram expostos as diferentes concentrações ocorreu redução significativa na motilidade a partir da concentração 5,0 g L⁻¹ (Gráfico 2A). A partir desta concentração também ocorreu mortalidade dos J2 acima de 90% (Gráfico 2B).

Gráfico 1 – Porcentagem de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* eclodidos após exposição dos ovos a diferentes concentrações do produtor comercial Nem-Out™ por 14 dias. Barras seguidas da mesma letra não diferenciam entre si pelo teste Kruskal-Wallis.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

Gráfico 2 – Porcentagem de motilidade (A) e mortalidade (B) de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* após exposição a diferentes concentrações do produtor comercial Nem-Out™. Barras seguidas da mesma letra não diferenciam entre si pelo teste Kruskal-Wallis.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

Dentre as concentrações do produto Nem-Out™ avaliadas, observa-se que a partir da concentração 2,5 g L⁻¹ ocorre maior inibição na eclosão e mortalidade dos J2 (Gráficos 1 e 2B). No caso dos ovos armazenados nas concentrações entre 2,5 e 10 g L⁻¹ ocorreu redução similar entre os

tratamentos. Já nas duas maiores concentrações do produto comercial verificou maior inibição da eclosão, sendo na maior concentração (40 g L⁻¹) verificado redução de 79,5% na eclosão dos J2, em comparação com a testemunha. Quando observamos a ação dessas mesmas concentrações sobre a motilidade e mortalidade dos J2 podemos verificar que houve uma maior ação nematicida sobre o nematoide em baixas concentrações num período de 24 horas de exposição, em relação aos ovos que ficaram expostos por 14 dias. De fato, podemos verificar imobilidade dos J2 já nas primeiras 24 horas e mortalidade acima de 80% na concentração de 2,5 g L⁻¹ do produtor comercial Nem-Out™, enquanto que inibição na eclosão de 79,5% ocorreu apenas na maior concentração (Gráficos 1 e 2).

A casca do ovo dos fitonematoides é formada por uma camada vitelínica, quitinosa e lipídica (FERRAZ e BROWN, 2016), protegendo o nematoide contra a ação de substâncias nematicidas e de agentes antagonistas. Como neste trabalho utilizou suspensão com população de ovos, em diferentes fases de desenvolvimento embrionário, talvez isto explique, porque não ocorreu inibição na eclosão acima de 80%, ou seja, parte da população de ovos que estavam prontos para o processo de eclosão perfuraram a casca dos ovos e permitiu a entrada das substâncias provenientes do Nem-Out™, causando morte dos J2 ainda dentro do ovo, e conseqüentemente inibição do processo de eclosão. Por outro lado, a ação de enzimas, principalmente proteases, e substâncias e/ou dos agentes antagonistas presentes no produtor Nem-Out™ (*Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformes* e *Trichoderma longibrachiatum*) apresentou menor ação na outra parte da população de nematoide composta por ovos na fase embrionária ou juvenil do primeiro estágio.

Bactérias do gênero *Bacillus* podem produzir enzimas como quitinases e proteases com atividade nematicida aos diferentes estádios do ciclo de vida dos nematoides parasitas de plantas (NIU et al., 2007; MARGINO et al., 2012). As proteases são enzimas que quebram ligações peptídicas entre os aminoácidos das proteínas através da hidrólise das ligações peptídicas que ligam os aminoácidos da cadeia polipeptídica da proteína. Várias proteases capazes de degradar a cutícula de nematoides de vida livre e nematoides parasitas de plantas têm sido purificadas e caracterizadas de diferentes isolados dos gêneros *Bacillus*, *Brevibacillus* e *Stenotrophomonas* (HUANG et al., 2005; TIAN et al., 2006; NIU et al., 2006a e b; NIU et al., 2007; TIAN et al., 2007; HUANG et al., 2009). Niu et al. (2006a) demonstraram que a estirpe B16 de *Bacillus nematocida* produz uma serina protease alcalina que degrada a cutícula do juvenil e a casca de ovo de *Panagrellus redivivus*, causando 95% de morte após exposição de 48 horas do extrato bruto da enzima purificada. A produção das enzimas protease neutra Bae16 e a serina protease Bace16 extracelular com atividade degradante da cutícula contra *P. redivivus* e *Bursaphelenchus xylophilus* também tem sido relatada por *B. nematocida* (NIU et al., 2006b, NIU et al., 2007).

Em outro estudo, Huang et al. (2005) verificaram que a protease alcalina extracelular BLG4 da estirpe G4 de *Brevibacillus laterosporus* degrada 95% da epiderme de *P. redivivus* após uma exposição de 60 horas. A protease neutra NPE-4 também é produzida por *B. laterosporus* G4 e atua de forma sinérgica com BLG4 na degradação da cutícula e da epiderme dos nematoides (HUANG et al., 2005; TIAN et al., 2006; TIAN et al., 2007). Como no produto comercial Nem-Out™ existe a enzima protease ao que tudo indica esta enzima atua reduzindo a motilidade do J2, degradando a cutícula do J2 e a casca do ovo, levando o nematoide a morte. Pelos resultados podemos observar

que a motilidade foi reduzida drasticamente na primeira concentração e houve aumento crescentes na mortalidade dos J2, chegando a causar 99% de mortalidade na concentração de 40 g L⁻¹. De fato, em estudos prévios observamos mortalidade dos J2 em 24 horas após exposição ao produto comercial Nem-Out™ e processo de degeneração da cutícula do J2 de *M. incognita*, dados não publicados. Isto explica em parte uma das formas de atuação do Nem-Out™ sobre o processo de eclosão e a mortalidade dos J2 de *M. incognita*.

Jamal et al. (2017) avaliaram *in vitro* o sobrenadante de *B. amyloliquefaciens* Y1 na eclosão e mortalidade de J2 de *M. incognita* e verificaram que o sobrenadante bacteriano na concentração de 40% inibiu a eclosão em 60,6% em 5 dias de incubação e causou 80% de mortalidade dos J2 após 3 dias de exposição. Os mesmos autores, purificaram e identificaram o dipeptídeo ciclo (D-Pro-L-Leu) da cultura de *B. licheniformes* Y1 pela primeira vez, o qual é reconhecido pela atividade nematocida. O peptídeo ciclo (Pro-Leu) foi previamente purificado e identificado de cultura de *Achromobacter xylosoxidans*, *Pseudomonas putida*, *Lactobacillus plantarum* e *Streptomyces* sp. (DEGRASSI et al., 2002; RHEE, 2002; YAN et al., 2004; DAL et al., 2007). Kong et al. (2010) relataram a produção de peptídeos cíclicos produzidos pela estirpe N1 de *B. licheniformis*, o que sugere que *B. licheniformis* pode levar a morte *M. incognita* devido a presença desse aminoácido com atividade nematocida.

AL-Shammari et al. (2013) verificaram que *T. longibrachiatum* causou redução de 8,9% na taxa de eclosão de ovos de *Meloidogyne* e mortalidade de 64,5% dos J2 após 72 horas de exposição ao filtrado fúngico.

Baseando na composição do produto Nem-Out™ e nos resultados obtidos, observou-se que existem um conjunto de mecanismos que atuam de forma sinérgica no controle do nematoide, na fase de ovo e do J2, por meio de atividades diferentes mas complementares no processo de degradação da cutícula do nematoide e a casca do ovo, causando a morte do nematoide.

3.2 Infectividade e reprodução de *M. incognita* em tomateiro

A massa do sistema radicular foi influenciada significativamente apenas pela forma de aplicação do produto, não sendo constatados o efeito da interação concentrações x Formas de Aplicação e nem o efeito das concentrações do Nem-Out™ (Tabela 1 – APÊNDICE). Pelos dados da Tabela 1, observa-se que na aplicação do produto via superfície, independente da concentração, a massa do sistema radicular do tomateiro foi superior ao que foi aplicado via cova.

Ao se comparar os valores médios da massa radicular do tomateiro de cada concentração e de cada forma de aplicação do produto com a testemunha (18,35 g), observou-se que apenas na concentração de 10 g L⁻¹ aplicado na superfície é que houve diferença significativa pelo teste Dunnett, a 5% de probabilidade (Tabela1).

Quanto ao efeito das concentrações do produto na massa radicular, não se observou diferença significativa, não havendo, portanto, qualquer associação entre a elevação das concentrações e a variável observada (Gráfico 3). A massa radicular média encontrada foi de 19,23 g.

TABELA 1

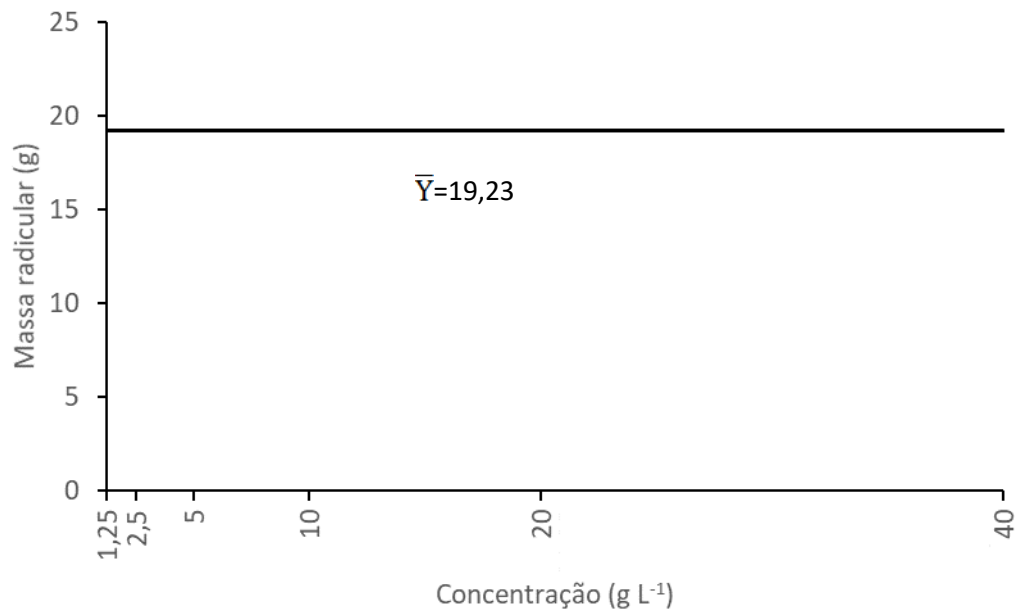
Valores médios da massa do sistema radicular de tomateiro em função de diferentes concentrações de Nem-Out™ e do tipo de aplicação.

CONCENTRAÇÕES	FORMAS DE APLICAÇÃO		Médias
	SUPERFÍCIE	COVA	
1,25	24,29	18,05	21,17
2,50	19,48	17,47	18,48
5,00	23,78	17,10	20,44
10,00	24,91*	14,62	19,76
20,00	19,80	15,33	17,56
40,00	22,20	13,76	17,98
Médias	22,41A	16,06B	
Testemunha	18,35		

As médias com letras maiúsculas iguais na linha, não diferenciam entre si pelo teste F a 5% de probabilidade. * diferente da Testemunha a 5% de probabilidade pelo teste Dunnett.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

Gráfico 3 – Massa do sistema radicular de tomateiro em função de diferentes concentrações de Nem-Out™



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

As características de infectividade e reprodução avaliadas como número de galhas, de massa de ovos e de ovos por grama de raiz e fator de reprodução, foram influenciadas significativamente pelo efeito da interação concentrações x forma de aplicação do produto (Tabela 2 – APÊNDICE).

Nas concentrações 2,5 a 10 g L⁻¹ do Nem-Out™, os valores médios do número de galhas por grama de raiz do tomateiro foram superiores quando aplicadas via cova (Tabela 2). Nas demais concentrações, não houve diferença significativa entre as formas de aplicação.

Comparativamente à testemunha (20,91), as concentrações de 1,25 a 10 g L⁻¹, aplicados na superfície resultaram em menor número de galhas. Quando o produto foi aplicado na cova na concentração de 1,25 g L⁻¹, o número de galhas também foi menor. Entretanto, nas concentrações de 5 e 40 g L⁻¹, o número de galhas foi maior do que na testemunha.

A elevação das concentrações do produto Nem-Out™ resultou em aumento linear crescente no número de galhas por grama de raiz (Gráfico 4), havendo um incremento do número de galhas de 160,53% e 183,79% quando o produto foi aplicado via superfície e via cova, respectivamente.

TABELA 2

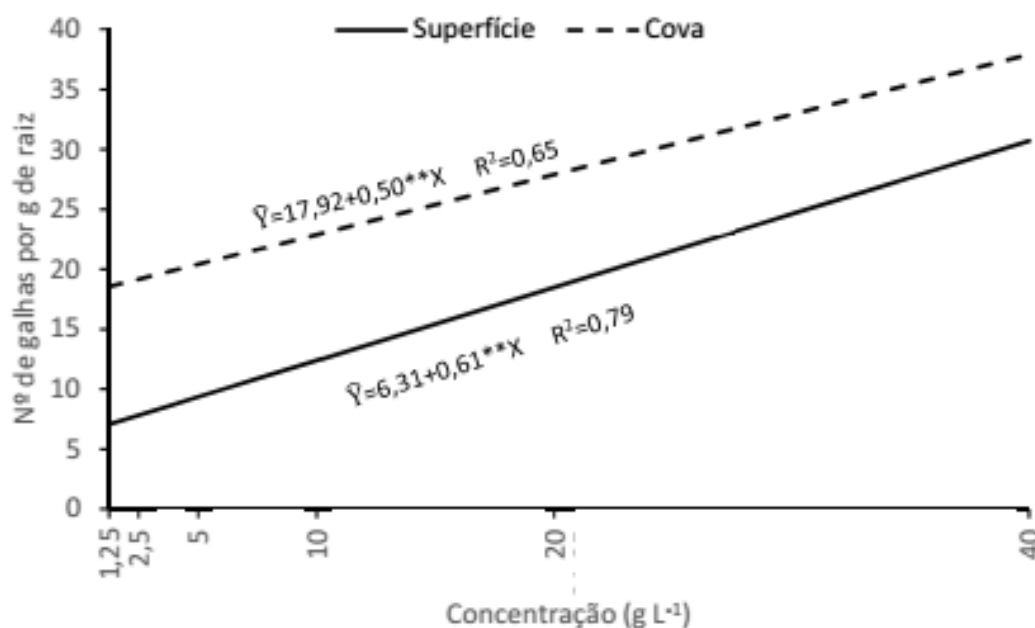
Valores médios do número de galhas de *Meloidogyne incognita* por grama de raiz de tomateiro em função de diferentes concentrações de Nem-Out™ e do tipo de aplicação.

CONCENTRAÇÕES	FORMAS DE APLICAÇÃO		Médias
	SUPERFÍCIE	COVA	
1,25	3,26A (11,02)**	3,64A (13,44)*	3,45 (12,23)
2,50	2,60B (6,97)**	4,00A (16,122)	3,30 (11,54)
5,00	2,30B (5,33)**	5,57A (31,11)*	3,93 (18,22)
10,00	2,78B (8,29)**	4,66A (22,00)	3,72 (15,14)
20,00	5,06A (25,97)	5,10A (26,48)	5,08 (26,22)
40,00	5,26A (28,71)	6,08A (38,14)**	5,67 (33,42)
Médias	3,54 (14,38)	4,84 (24,55)	
Testemunha	4,56 (20,91)		

As médias com letras maiúsculas iguais na linha, não diferenciam entre si pelo teste F a 5% de probabilidade. * e ** diferente da Testemunha a 5% e 1% de probabilidade pelo teste Dunnett, respectivamente. Dados transformados pela fórmula \sqrt{X} . () Dados originais.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

Gráfico 4 – Número de galhas de *Meloidogyne incognita* por grama de raiz de tomateiro em função de diferentes concentrações de Nem-Out™ e do tipo de aplicação. ** Significativo a 1% pelo teste t.



. **Fonte:** Elaborado pelo autor, 2018.

O número de massa de ovos de *M. incognita* na concentração de 1,25 g L⁻¹ do produto foi maior quando aplicado via superfície. Já na concentração de 40 g L⁻¹, observou-se maior valor médio quando aplicado via cova. Nas demais concentrações, não se observou diferença significativa entre as formas de aplicação (Tabela 3). Também não foi observada diferença significativa nas comparações da média de cada concentração e formas de aplicação com a media da testemunha (10,69). Quanto ao efeito das concentrações do Nem-Out™ no número de massa de ovos, observou-se efeito linear crescente apenas quando o produto foi aplicado via cova (Gráfico 5). Neste caso, observou-se um incremento de 104,05%. Na aplicação via superfície, não foi constatado efeito significativo das concentrações.

TABELA 3

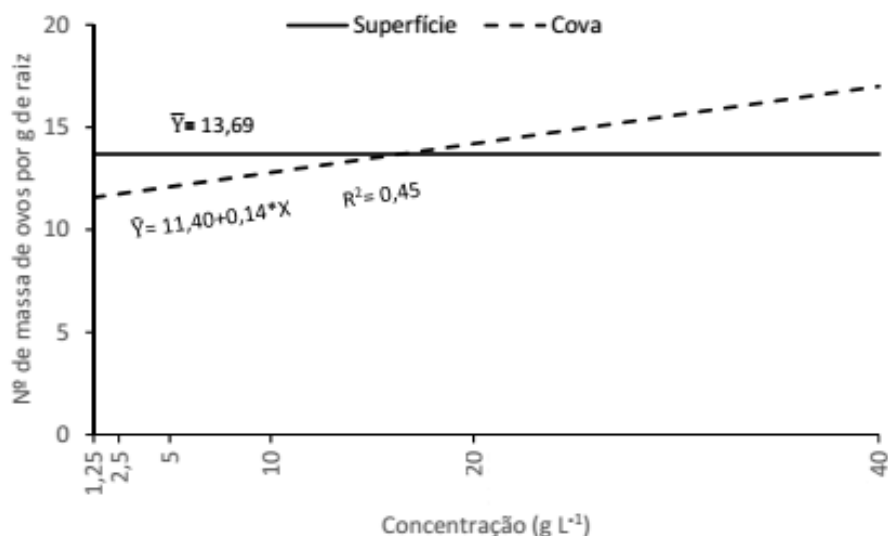
Valores médios do número de massa de ovos de *Meloidogyne incognita* por grama de raiz de tomateiro em função de diferentes concentrações de Nem-Out™ e do tipo de aplicação.

CONCENTRAÇÕES	FORMAS DE APLICAÇÃO		Médias
	SUPERFÍCIE	COVA	
1,25	3,70A (14,26)	2,88B (8,40)	3,29 (11,33)
2,50	3,78A (14,61)	3,68A (13,80)	3,73 (14,21)
5,00	3,29A (10,95)	3,85A (14,95)	3,57 (12,95)
10,00	3,88A (15,84)	3,30A (11,36)	3,59 (13,60)
20,00	3,79A (14,83)	3,62A (13,51)	3,71 (14,17)
40,00	3,28B (11,68)	4,07A (17,14)	3,68 (14,41)
Médias	3,62 (13,69)	3,57 (13,20)	
Testemunha	3,23 (10,69)		

As médias com letras maiúsculas iguais na linha, não diferenciam entre si pelo teste F a 5% de probabilidade. ** diferente da Testemunha a 1% de probabilidade pelo teste Dunnett. Dados transformados pela fórmula \sqrt{X} . () Dados originais.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

Gráfico 5 – Número de massa de ovos de *Meloidogyne incognita* por grama de raiz de tomateiro em função de diferentes concentrações de Nem-Out™ e do tipo de aplicação. ** Significativo a 1% pelo teste t.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

Na comparação do número de ovos de *M. incognita* nas formas de aplicação do produto, observou-se que nas concentrações de 2,50 e 40 g L⁻¹, na aplicação via superfície os valores foram superiores (Tabela 4). Todavia, nas concentrações de 5 e 10 g L⁻¹, os valores do número de ovos foram superiores na aplicação via cova. Nas demais concentrações não se constatou diferenças significativas.

Em relação à testemunha (740,44), na aplicação via superfície, as concentrações de 1,25 e 2,5 g L⁻¹ proporcionaram menores valores médios de número de ovos. Enquanto que as concentrações de 20 e 40 g L⁻¹ proporcionaram valores superiores ao da testemunha. Nas concentrações intermediárias não se observou diferença significativa. Na aplicação via cova, apenas na concentração de 2,5 g L⁻¹ não houve diferença significativa. Nas maiores concentrações (10, 20 e 40 g L⁻¹), as médias observadas foram superiores à testemunha.

O aumento das concentrações do produto resultou em crescimento linear do número de ovos por grama de raiz na aplicação via superfície, observando-se um incremento de 285,31% na maior concentração (Gráfico 6). Já na aplicação via cova, observou-se efeito quadrático com a elevação das concentrações do Nem-Out™. O aumento do número de ovos ocorreu até a dose calculada de 22,87 g L⁻¹ do produto, atingindo 5.607,85 ovos. A partir daí houve redução para 2.906,83 ovos na concentração de 40 g L⁻¹.

TABELA 4

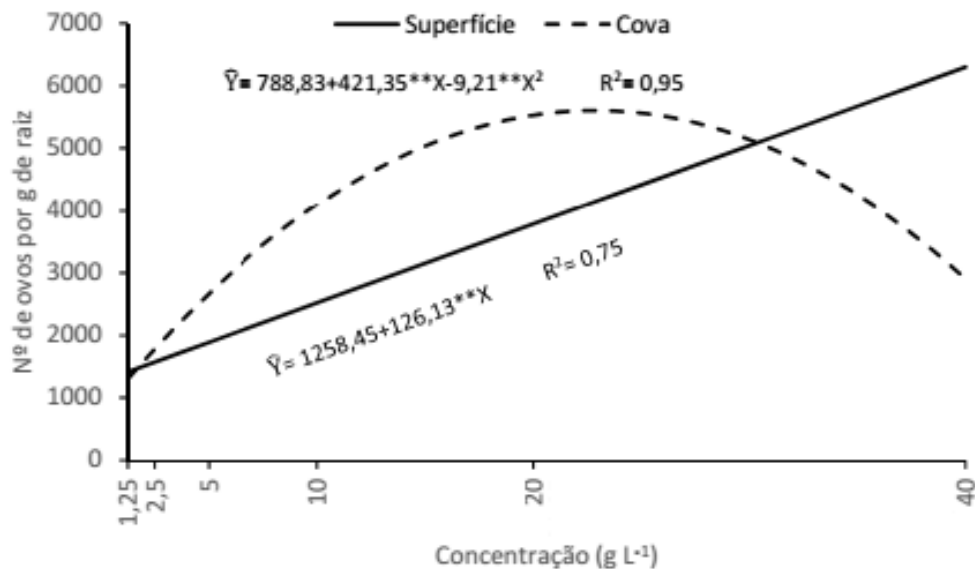
Valores médios do número de ovos de *Meloidogyne incognita* por grama de raiz de tomateiro em função de diferentes concentrações de Nem-Out™ e do tipo de aplicação.

CONCENTRAÇÕES	FORMAS DE APLICAÇÃO		Médias
	SUPERFÍCIE	COVA	
1,25	38,20A (1.536,77)*	42,60A (1.835,51)*	40,40 (1.686,14)
2,50	47,88A (2.339,38) **	36,89B (1.378,20)	42,39 (1.858,79)
5,00	34,38B (1.189,57)	47,29A (2.339,03)**	40,84 (1.764,30)
10,00	35,07B (1.238,29)	64,70A (4.247,63)**	49,89 (2.742,96)
20,00	72,21A (5.258,08)**	73,86A (5.581,39)**	73,04 (5.419,74)
40,00	76,47A (5.921,27) **	52,25B (2.893,42)**	64,36 (4.407,35)
Médias	50,70 (2.913,89)	52,93 (3.045,86)	
Testemunha	26,92 (740,44)		

As médias com letras maiúsculas iguais na linha, não diferenciam entre si pelo teste F a 5% de probabilidade. * e ** diferente da Testemunha a 5% e 1% de probabilidade pelo teste Dunnett, respectivamente. Dados transformados pela fórmula \sqrt{X} . () Dados originais.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

Gráfico 6 – Número de ovos de *Meloidogyne incognita* por grama de raiz de tomateiro em função de diferentes concentrações de Nem-Out™ e do tipo de aplicação. ** Significativo a 1% pelo teste t.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

Comparando-se o FR entre as formas de aplicação, observou-se que nas concentrações de 2,5, 2,50, 20 e 40 g L⁻¹ a aplicação na superfície as médias foram maiores (Tabela 5). Apenas na concentração de 10 g L⁻¹ observou-se maior média na aplicação via cova.

Comparativamente à testemunha (7,46), todas as médias (de cada concentração e em cada forma de aplicação) foram superiores, exceto na dose 2,5 g L⁻¹ na aplicação via cova.

Com o aumento das concentrações do Nem-Out™ resultou em crescimento linear do FR na aplicação via superfície, observando-se um incremento de 281,31% na maior concentração (Gráfico 7). Já na aplicação via cova, observou-se efeito quadrático com a elevação das concentrações do Nem-Out™. O aumento do FR ocorreu até a concentração calculada de 22,64 g L⁻¹ do produto, atingindo o valor de 44,94. A partir daí houve redução para 18,43 na concentração de 40 g L⁻¹.

TABELA 5

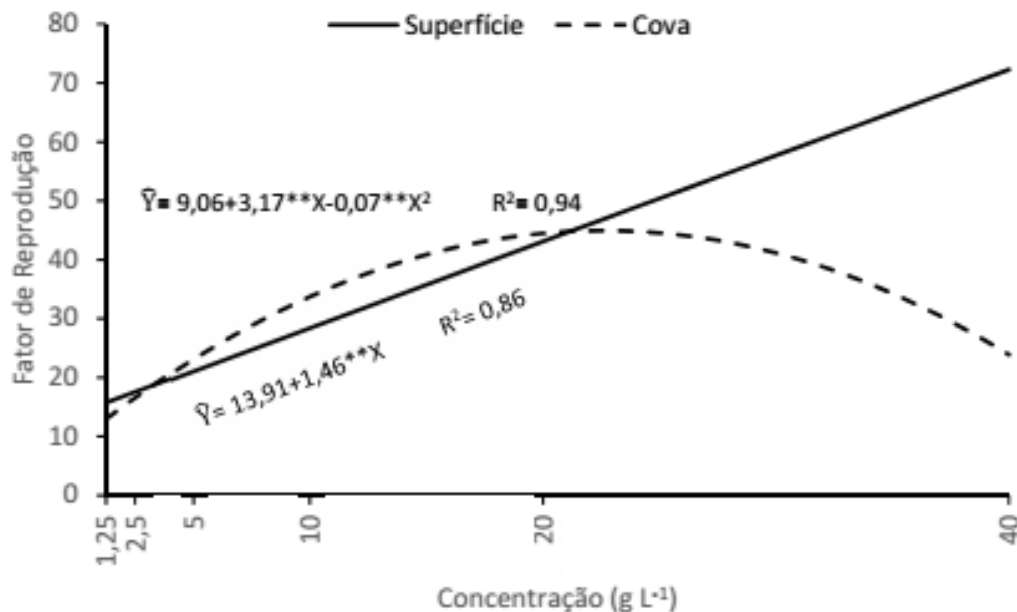
Valores médios do fator de reprodução de *Meloidogyne incognita* em tomateiro em função de diferentes concentrações de Nem-Out™ e do tipo de aplicação.

CONCENTRAÇÕES	FORMAS DE APLICAÇÃO		Médias
	SUPERFÍCIE	COVA	
1,25	4,24A (18,30)**	4,20A (17,78) **	4,22 (18,04)
2,50	4,86A (23,87) **	3,56B (12,85)	4,21 (18,36)
5,00	3,90A (15,25) **	3,50A (21,32) **	3,70 (18,28)
10,00	4,05B (16,51) **	5,68A (32,74) **	4,86 (24,62)
20,00	7,39A (54,78) **	6,68B (44,72) **	7,03 (49,75)
40,00	8,32A (69,78) **	4,26B (18,43) **	6,29 (44,10)
Médias	5,46 (33,08)	4,60 (21,19)	
Testemunha	2,68 (7,46)		

As médias com letras maiúsculas iguais na linha, não diferenciam entre si pelo teste F a 5% de probabilidade. * e ** diferente da Testemunha a 5% e 1% de probabilidade pelo teste Dunnett, respectivamente. Dados transformados pela fórmula \sqrt{X} . () Dados originais.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

Gráfico 7 – Fator de reprodução de *Meloidogyne incognita* em raiz de tomateiro em função de diferentes concentrações de Nem-Out™ e do tipo de aplicação. ** Significativo a 1% pelo teste t.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

Pelos resultados apresentados podemos observar que o nematoide e o tomateiro apresentam reações diferenciadas com relação as concentrações do produto Nem-Out™ e a forma de aplicação. Quando analisamos a infectividade e a reprodução de *M. incognita*, verificamos comportamento variável entre as concentrações do Nem-Out™ e a forma de aplicação. Embora tenha ocorrido redução das variáveis nematológicas entre as concentrações estudadas, observou-se um aumento

linear na densidade populacional do nematoide com o aumento da concentração do Nem-Out™, independentemente da forma de aplicação, expresso principalmente pelo número de galhas e ovos/ g de raiz e pelo FR. Já quando analisamos o efeito sobre o tomateiro, houve maior influencia da forma de aplicação do Nem-Out™ via superfície, independente da concentração, proporcionando maior massa do sistema radicular.

Os agentes antagonistas presentes na mistura do Nem-Out™ como *Bacillus*, *Trichoderma* e enzimas são relatados na literatura no biocontrole de nematoides (ARAÚJO e MARCHESI, 2009; RADWAN et al., 2012; FERNANDES et al., 2014). Espécies de *Bacillus* produzem enzimas, peptídeos e compostos orgânicos voláteis com atividade que interferem no processo de parasitismo e na reprodução dos nematoides (PÉREZ-GARCIA et al., 2011; SHARMA e GOMES, 1996). Além do mecanismo de produção de compostos com atividade nematicida vários isolados de *Bacillus* e de *Trichoderma* também podem atuar como promotores de crescimento de plantas (SIKORA, 1988; FORTES et al., 2007; HOWELL, 2003; FREITAS et al., 2012; SAHEBANI e HADAVI, 2008; ARAÚJO e MARCHESI, 2009). A ação desses agentes e de seus produtos com ação nematicida foi mais evidente nos estudos *in vitro*, principalmente sobre os J2 de *M. incognita*, mesmo em baixas concentrações, do que nos estudos *in vivo*. Esses resultados podem ser explicados pela ação direta dos produtos e do tempo de exposição ao produto e dos agentes antagonista nos estudos *in vitro*, enquanto nos estudos *in vivo* foi feito apenas uma aplicação do produto Nem-Out™ e com a irrigação ocorre a diluição e/ou lixiviação do produto no solo com o tempo de cultivo do tomateiro.

Silva (2015) avaliou também o produto comercial Nem-Out™ em diferentes dosagens e observou aos 45 dias após a inoculação redução crescentes na densidade populacional e no fator de reprodução de *M. incognita* em tomateiro a partir das dosagens de 6, 8 e 10 kg/ha, mas não houve promoção do crescimento do sistema radicular e da parte aérea. Um dos fatores que pode explicar nossos resultados seria o número de aplicações do produto e a concentração dos agentes antagonistas. No entanto, nos trabalhos de Silva (2015) podemos verificar que na testemunha o fator de reprodução foi de 157,54 e nas concentrações de 8 e 10 kg/ha foi de 10,11 e 7,48, respectivamente, aos 45 dias. Isto significa que apesar da redução populacional de *M. incognita* o fator de reprodução ainda permaceu acima de 1,0, sendo pelos critérios de Seinhorst (1967) as plantas classificadas como boas hospedeiras. As duas maiores concentrações que utilizamos foram de 20 e 40 g L⁻¹ que representa as concentrações de 6 e 12 kg/ha do produtor comercial Nem-Out™. Quando foi feita a aplicação das concentrações de 20 e 40 g L⁻¹ na superfície o fator de reprodução foi de 54,78 e 69,78, enquanto na testemunha foi de 7,46. Ao que tudo indica isto esta relacionado a maior massa do sistema do tomateiro. Por outro lado, como a massa do sistema radicular do tomateiro que recebeu a aplicação na cova foi menor houve redução do fator de reprodução, quando comparamos com aqueles tratamentos com aplicação na superfície.

A matéria orgânica do solo é limitante no estabelecimento dos agentes de biocontrole na colonização da rizosfera (CANNAYANE e RAJENDRAN, 2001; FREITAS et al., 2003). Partindo deste principio, a baixa quantidade de matéria orgânica presente na composição do substrato das mudas de tomateiro em nosso trabalho (área:solo na proporção 2:1), pode ter desfavorecido o processo de colonização pelos antagonistas. Silva (2015) estudou doses de Nem-Out™ no controle de *M.*

incognita em substrato composto de mistura de terra e areia na proporção de 1:1, e verificaram redução crescente na reprodução do nematoide. De fato, a proporção de areia em nosso trabalho significa menor teor de matéria orgânica o que pode ter desfavorecido o estabelecimento dos agentes antagonistas mesmo com aplicação na cova, embora tenha ocorrido menor fator de reprodução nos tratamentos com esse tipo de aplicação, mas com fator de reprodução considerado ainda alto.

Outro fator importante na eficiência do controle biológico esta relacionado a capacidade e o tempo de colonização das raízes pelos agentes de biocontrole (SPIEGEL e CHET, 1998; SILVEIRA e FREITAS, 2007). Assim, o momento da aplicação neste trabalho pode não ter sido ideal para o processo de colonização dos agentes de biocontrole e em sua eficácia. De fato, efeitos positivos de isolados de *Trichoderma* no controle de *M. arenaria* e *M. javanica* tem sido relatado com aplicação previa no solo (CARNEIRO e CAYROL, 1991; RDWAN et al., 2012). Como fizemos uma única aplicação do Nem-Out™ no momento da infestação do solo com o nematoide, esse procedimento não permitiu o estabelecimento prévio de *B. subtilis*, *B. licheniformes* e *Trichoderma longibrachiatum* na rizosfera do tomateiro. Este fator somado ao baixo teor de matéria orgânica e apenas uma única aplicação do produto Nem-Out™ pode explicar o baixo desempenho dos antagonistas no controle *in vivo* em relação ao controle *in vitro* que foi mais promissor.

Em resumo, demonstramos em nosso trabalho a ação da concentração do Nem-Out™ e da forma de aplicação do produto em estudos *in vitro* e *in vivo* e a reação de *M. incognita* e do tomateiro em resposta a essa interação. Assim, contribuimos com a pesquisa científica no processo de compreendermos melhor a ação da mistura de agentes antagonistas e seus metabólitos secundários sobre o ciclo de vida do nematode das galhas e a planta hospedeira.

4. CONCLUSÕES

Nas concentrações de 20 e 40 g L⁻¹ do produtor comercial Nem-Out™ houve redução significativa na eclosão dos J2 de *M. incognita*, chegando a inibir a eclosão em 79,5% na maior concentração.

A partir da concentração de 5 g L⁻¹ do produto Nem-Out™ ocorreu redução significativa e crescente na motilidade e na mortalidade dos J2.

A massa do sistema radicular do tomateiro foi influenciada significativamente apenas pela forma de aplicação do produto Nem-Out™, com maior massa radicular quando o produto foi aplicado via superfície.

A infectividade e a reprodução de *M. incognita* foram influenciadas significativamente pelo efeito da interação concentrações x forma de aplicação do produto.

Menor infectividade expressa por galhas/ g de raiz ocorreu na aplicação via superfície nas concentrações de 2,5 a 10 g L⁻¹, em comparação com a testemunha.

Já a infectividade expressa pelo número de massas de ovos/ g de raiz foi menor nas concentrações de 1,25 e 40 g L⁻¹, aplicadas via cova e superfície, respectivamente.

As concentrações de 1,25 e 2,5 g L⁻¹ aplicadas via superfície proporcionaram menor número de ovos/ g de raiz.

O aumento das concentrações do Nem-Out™ resultou em crescimento linear do FR na aplicação via superfície, enquanto na aplicação via cova houve efeito quadrático com o aumento das concentrações.

5. REFERÊNCIAS

- AALTEN, P.M.; VITOUR, D.; BLANVILLAIN, D.; GOWEN, S.R.; SUTRA, L. Effect of rhizosphere fluorescent *Pseudomonas* strains on plant parasitic nematodes *Radopholus similis* and *Meloidogyne* spp. **Letters in Applied Microbiology** v.27, p.357-361, 1998.
- AATIF, H.M., JAVED, N. KHAN, S.A.; Ahmed, S. Virulence of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* bacteria and their toxins against juvenile's immobilization of *Meloidogyne incognita*. **Pakistan Journal of Phytopathology** 24, 170-174, 2012.
- AGRIOS, G.N. Plant Pathology. California: Elsevier. 903.p. 2004.
- AGUIAR, A. R.; MACHADO, D. F. M.; PARANHOS, J. T.; SILVA, A. C. F. Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. na promoção de crescimento de mudas do feijoeiro cv. Carioca e controle de *Sclerotinia sclerotiorum*. **Ciência e Natura**, v.34, n.2, 2013.
- AL-SHAMMARI, T. A.; BAHKALI, A. H.; ELGORBAN, A.M.; ELKAHKY, M. T.; AL-SUM, A. The use of *Trichoderma longibrachiatum* and *Mortierella alpina* against root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* on tomato. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, 7:199-207, 2013.
- ALI, N.I.; SIDDIQUI, I.A.; SHAUKAT, S.S.; ZAKI, M.J. Nematicidal activity of some strains of *Pseudomonas* spp. **Soil Biology and Biochemistry** v.34, n.8, p.1051-1058, 2002.
- ARAÚJO, F. F.; MACHESI, G. V. P. Uso de *Bacillus subtilis* no controle da meloidoginose e na promoção do crescimento do tomateiro. **Ciência Rural**, 39 (5): 1558-1561, 2009.
- ASENSIO, D., OWEN, S.M. LLUSIA, J.; PENUELAS, J. The distribution of volatile isoprenoids in the soil horizons around *Pinus halepensis* trees. **Soil Biology and Biochemistry** 40, 2937-2947, 2008.
- ASSIS, S. M. P.; SILVEIRA, E.B.; MARIANO, R.L.R.; MENEZES, D. Bactérias endofíticas – método de isolamento e potencial antagônico no controle da podridão negra em repolho. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v.24, n.3/4, p.216-220, 1998.
- BALDWIN, I.T., HALITSCHKE, R., PASCHOLD, A., VON DAHL, C.C.; PRESTON, C.A. Volatile signaling in plant interactions: 'Talking-trees' in the genomics era. **Science** 311, 812-815, 2006.
- BCHIR, M.M. Compositions for biological control of nematodes – comprise *Monacrosporium salinum* strains Cp4 and Pi10. **Patente número FR2747016-A1**, 10 de outubro de 1997.
- BCHIR, M.M.; BICHIR, M.M. Live bacterial composition for biological control of nematodes – comprising *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus* strains, having synergistic activity. **Patente número JP2000511204-W**, 29 de agosto de 2000.
- BECKER, J.O.; ZAVALETA-MEIJIA, E.; COLBERT, S.F.; SCHROTH, M.N.; WEINHOLD, A.R.; HANCOCK, J.G.; GUNDY, S.D.V. "Effects of Rhizobacteria on Root-knot Nematodes and Gall Formation", **Phytopathology** v.78, n.11, p.1466-1469, 1988.
- BENÍTEZ, T.; RINCÓN, A. M.; LIMÓN, M. C. E ;CONDÓN, A. C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 249-260, 2004.
- BISSET, J. A revision of the genus *Trichoderma*: II infrageneric classification. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 69, n. 11, p. 2357-2372, 1991.
- BLACKBURN, K.; ALM, S.R.; YEH, T.S. Avermectin B1, izafox, and fenamiphos for control of *Hoplolaimus galeatus* and *Tylenchorhynchus dubius* infesting *Poa annua*. **Journal of Nematology**, v.48, p.687-694, 1996.

- BONETTI, J.I.S.; FERRAZ, S. Modificações do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* em raízes de cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.6, p.553, 1981.
- BRAVO, A., LIKITVIVATANAVONG, S., GILL, S.S.; SOBERON, M. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 41, 423– 431, 2011.
- BROOKS, D.S.; GONZALES, C.F.; APPPEL, D.N.; FILER, T.H. Evaluation of endophytic bacteria as potencial biological control agent for oak wilt. *Biological Control*, Madison, v.4, n.3, p.373-381, 1994.
- BROTMAN, Y.; GUPTA, K.J.; VITERBO, A. *Trichoderma*. *Current Biology*, v. 20, p. 390-391, 2010.
- CAMPOS, V.P. Doenças causadas por nematoides em tomate. In: ZAMBOLIM, L.; VALE, F.X.R. Controle de doenças de plantas – Hortaliças. Viçosa, 2000. P. 801- 842.
- CAMPOS, V.P.; SOUZA, J.T.; SOUZA, R.G. Controle de Fitonematóides por Meio de Bactérias. *Revisão Anual de Fitopatologia* v.6, p.285-327, 1998.
- CANNAYANE, I.; RAJENDRAN, G. Application of biocontrol agents and oil cakes for the management of *Meloidogyne incognita* in brinjal (*Solanum melongema* L.). *Current Nematology*, Ghaziabad, v. 12, n. 1, p. 51-55, 2001.
- CARNEIRO, R. M. D. G.; CAYROL, J. C. Relationship between inoculum density of the nematophagous fungus *Paecilomyces lilacinus* and the control of *Meloidogyne arenaria* on tomato. *Revue Nematology*, Montrouge Cedex, v. 14, n. 4, p. 629-634, 1991.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; ALMEIDA, M.R.; BRAGA, R.S.; ALMEIDA, C.A. de; GIORIA, R. Primeiro registro de *Meloidogyne mayaguensis* parasitando plantas de tomate e pimentão resistentes meloidoginose no estado de São Paulo. *Nematologia Brasileira*, v.30, p.81-86, 2006.
- CARVALHO, P.H. Controle biológico e alternativo de *Meloidogyne incognita* E *M. javanica* em tomateiro. UNB: Dissertação. 2017. 98p.
- CLELAND, R.E. "Auxin and Cell Elongation". Em: "**Plant Hormones and their Role in Plant Growth and Development**", P.I. Davies, Editor, Kluwer, Dordrecht, 1990, p. 132-148.
- COIMBRA, J.L. **Controle dos nematóides de galhas com actinomicetos**. Lavras: UFLA, 2003. 114p. (Tese de Doutorado em Fitopatologia).
- CONTRERAS-CORNEJO, H. A.; MACÍAS-RODRÍGUEZ, L.; CORTÉS-PENAGOS, C.; LÓPEZ-BUCIO, J. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in Arabidopsis. *Plant Physiology*, v. 149, n.3, p. 1579-1592. 2009.
- COOLEN, W. A.; D'HERDE, C. J. A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue. State Agricultural Research Centre, Ghent, 77p., 1972.
- CRAWFORD, D.L.; LYNCH, J.M.; WHIPPS, J.M.; OUSLEY, M.A. Isolation and characterization of actinomyceete antagonists of a fungal root pathogen. *Applied and Environmental Microbiology*, v.59, n.11, p.3899-3905, 1993.
- CRONIN, D., LOCCOZ, Y.M., DUNNE, C.; GARA, F.O. Inhibition of egg hatch of the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis* by chitinase-producing bacteria. *European Journal of Plant Pathology* 103, 433-440, 1999.
- CRONIN, D.; MOËNNE-LOCCOZ, Y.; FENTON, A.; DUNNE, C.; DOWLING, D.N.; O'GARA, F. Role of 2,4-diacetylphloroglucinol in the interactions of the biocontrol *Pseudomonad* strain F113 with the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Applied and Environmental Microbiology* v.63, n.4, p.1357-1361, 1997.

DAL BELLO, F.; CLARKE, C.; RYAN, L.; ULMER, H.; SCHOBBER, T.; STRÖM, K.; SJÖGREN, J.; VAN SINDEREN, D.; SCHNÜRER, J.; ARENDT, E. Improvement of the quality and shelf life of wheat bread by fermentation with the antifungal strain *Lactobacillus plantarum* FST1.7. **Jornal of Cereal Science**, v.45, p.309-318, 2007.

DEGRASSI, G.; AGUILAR, C.; BOSCO, M.; ZAHARIEV, S.; PONGOR, S.; VENTURI, V. Plant growth-promoting *Pseudomonas putida* WCS358 produces and secretes four cyclic dipeptides: Cross-talk with quorum sensing bacterial sensors. **Current Microbiology**, v.45, p.250-254, 2002.

DICKLOW, M.; MARBAN-MENDOZA, N.; ZUCKERMAN, B.M.; DICKLOW, M.B. New nematocidal strains of *Bacillus thuringiensis* – for controlling soil and plant nematodes, e.g. *Criconebella*, *Globodera*, etc. by application to soil, seeds or plants. **Patente número EP633725-A1**, 18 de janeiro de 1995.

DICKLOW, M.B.; ACOSTA, N.; ZUCKERMAN, B.M. A novel *Streptomyces* species for controlling plant-parasitic nematodes. **Journal of Chemical Ecology**, v.19, n.2, p.159-173, 1993.

DÜRSCHNER, U.U. Observation on a new nematophagous actinomycete. **Proc. Ist. Int. Nongr. Nematol.**, Guelph, Canada, August, 1984, 23p.

EFFMERT, U., KALDERAS, J., WARNKE, R.; PIECHULLA, B. Volatile mediated interactions between bacteria and fungi in the soil. **Journal of Chemical Ecology** 38, 665-703, 2012.

ELAWAD, S.A.; HAGUE, N.G.M. New biopesticide for controlling insect pests or plant parasitic nematodes. **Patente número WO9922598-A1**, 14 de maio de 1999.

ELLIS, D.; JARRETT, P.; MORGAN, J.A.W.; OUSLEY, M.A. Novel composition used to control parasitic nematodes, especially in plants such as maize, cotton, soya, and rice, comprises a bacterium which is a symbiont of entomopathogenic nematode. **Patente número EP1143800-A1**, 17 de outubro de 2001.

EMBRAPA. Sistemas de produção: doenças causadas por nematoides, 2003. Disponível em: Acesso em: 27 out. 2018.

ESNARD, J.; THOMAS, L.P.; ZUCKERMAN, B. *Streptomyces costaricanus* sp. nov., isolated from nematode-suppressive soil. **International Journal of Systematics Bacteriology**, v.45, n.4, p.775-779, 1995.

FARUK, M.I., RAHMAN, M.L., MUSTAFA, M.M.H.; COOSEMANS, I.J. Dimethyl disulfide- a potential biopesticide against root-knot nematode of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). **Bangladesh Journal of Agricultural Research** 36, 685-695, 2010.

FELDMAN, K.; PELEG, I.; HANDELMAN, J.H. New bacterial strains of species *Bacillus firmus* – have nematicidal activity, used for controlling plant pathogenic nematodes, particularly nematodes causing root-knot disease. **Patente número BR9608204-A**, 07 de dezembro de 1999.

FERNANDES, R. H.; VIEIRA, B. S.; FUGA, C. A. G.; LOPES, E. A. *Pochonia chlamydosporia* e *Bacillus subtilis* no controle de *Meloidogyne incognita* e *M. javanica* em mudas de tomateiro. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 30, n. 1, p. 194-200, 2014.

FERRAZ, L.C.C.B; BROWN, D.J.F. Nematologia de plantas: fundamentos e importância. L.C.C.B. FERRAZ e D.J.F. BROWN (Orgs.). Manaus: Norma Editora, 2016, 251p.

FILGUEIRA, F. A. R. Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2000. 402 p.

FILNOW, A.B.; LOCKWOOD, J.L. Evaluation of several actinomycetes and the fungus *Hypochoytrium catenoides* as biological control agents of *Phytophthora* root rot of soybean. **Plant Disease**, v.69,

p.1033-1036, 1985.

FONTES, P.C.R.; SILVA, D.J.H. Cultura do tomate. In: FONTES, P.C.R. (Ed.) Olericultura-Teoria e prática. Viçosa: 2005. 486p.

FORTES, F.O., SILVA, A.C.F., ALMANÇA, M.A.K.; TEDESCO, S.B. Promoção de enraizamento de microestacas de um clone de *Eucalyptus* sp. por *Trichoderma* spp. **Revista Árvore**, v.31, n.2, p.221-228. 2007.

FORTUNER, R.; JACQ, V.A. "In vitro Study of Toxicity of Soluble Sulphides to Three Nematodes Parasitic on Rice in Senegal", **Nematologica** v.22, n.3, p.343-351, 1976.

FREITAS, S. S.; MELO, A. M. T.; DONZELI, V. P. Promoção de crescimento de alface por rizobactérias. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 27, n. 1, p. 61-70, 2003.

GARABEDIAN, S.; VAN GUNDY, S.D. Use of avermectin for the control of *Meloidogyne incognita* on tomatoes. **Journal of Nematology**, v.15, p.503-510, 1983.

GARSIN, D.A., SIFRI, C.D., MYLONAKIS, E., QIN, X., SINGH, K.V.; MURRAY, B.E. A simple model host for identifying Gram-positive virulence factors. **Proceeding of the National Academic of Sciences of the United States of America** 98, 10892-10897, 2001.

GERMIDA, J.J.; HEINS, S.D.; JIMENEZ, D.R.; MANKER, D.C.; MARRONE, P.G. Isolated pure culture of a *Bacillus subtilis* strain – useful as an insecticidal agent against corn rootworm, nematodes, flies and beet armyworm. **Patente número WO9909819-A1**, 04 de março de 1999.

GERMIDA, J.J.; HEINS, S.D.; JIMENEZ, D.R.; MANKER, D.C.; MARRONE, P.G. New *Bacillus chitinosporus* strain, mutants, culture and isolated toxic metabolite – useful as a nematocide and insecticide. **Patente número JP2001505422-W**, 24 de abril de 2001.

GREWAL, P.S., LEWIS, E.E.; VENKATACHARI, E. Allelopathy: A possible mechanism of suppression of plant-parasitic nematodes by entomopathogenic nematodes. **Nematology** 1, 735-743, 1999.

GU, Y.Q., MO, M.H., ZHOU, J.P., ZOU, C.S.; ZHANG, K.Q. Evaluation and identification of potential organic nematocidal volatiles from soil bacteria. **Soil Biology and Biochemistry** 39, 2567-2575, 2007.

GUIMARÃES, L. M. P.; MOURA, R. M.; PEDROSA, E. M. R. Parasitismo de *Meloidogyne mayaguensis* em diferentes espécies botânicas. **Nematologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 27, n. 2, p. 139-145, 2003.

GUO, S., LIU, M., PENG, D., JI, S., WANG, P., YU, Z.; SUN, M. New Strategy for Isolating Novel Nematicidal Crystal Protein Genes from *Bacillus thuringiensis* Strain YBT-1518. **Applied and Environmental Microbiology** 74, 6997-7001, 2008.

GUTTMANN, D.M.; ELLAR, D.J. (2000) Phenotypic and genotypic comparisons of 23 strains from the *Bacillus cereus* complex for a selection of known and putative *B. thuringiensis* virulence factors. **FEMS Microbiology Letters** 188, 7–13.

HAGEN, G. "The Control of Gene Expression by Auxin". Em: **"Plant Hormones and their Role in Plant Growth and Development"**, P.I. Davies, Editor, Kluwer, Dordrecht, 1990, p. 149-163.

HALLMANN, J.; KLOEPPER, J.W.; RODRIGUES-KÁBANA, R.; SIJORA, R.A. Endophytic rhizobacteria as antagonists of *Meloidogyne incognita* in cucumber. **Phytopathology**, St. Paul, v.85, n.10, p.1136, Oct. 1995.

- HARMAN, G. E.; HOWELL, C. R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. Trichoderma species—opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology** 2(1): 43-56. 2004.
- HARMAN, G.E. Myths and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant disease**, v. 84, n. 4, p. 377-393, 2000.
- HAY, F.S.; SKIPP, R.A. Fungi and actinomycetes associated with cyst of the *Heterodera trifolii* Goffart (nematoda: Tylenchida) in pasture soils in new zealand. **Nematologica**, Leiden, v.39, p.376-384, 1993.
- HEIL, M.; TON, J. Long-distance signaling in plant defence. **Trends in Plant Science** 13, 264-272, 2008.
- HEINS, S.D.; JIMENEZ, D.R.; MANKER, D.C.; MARRONE, P.G. Isolated pure culture of *Bacillus pumilus* strain – useful as an insecticide against corn rootworm, nematodes and beet armyworm. **Patente número WO9910477-A1**, 04 de março de 1999.
- HEINS; DARLENE; MANKER; CAROL; JIMENEZ; RITO; MCCOY, JAY; MARRONE; GAIL; ORJALA, ENSIO. Composition and methods for controlling plant pests. **Patente número US 6,638,910**, 28 de outubro de 2003.
- HIGINBOTHAM, N. "Cell Electropotential and Ion Transport in Higher Plants". Em: "**Transport and Distribution of Matter in Cells of Higher Plants**", K. Mothes, Editor, Springer, Berlin, 1968, 215p.
- HOWELL, C. R. Field control of cotton seedling diseases with *Trichoderma virens* in combination with fungicide seed treatments. **Journal of Cotton Science**, Memphis, v. 1, n. 1, p. 15-20. 1997.
- HUANG, X.W., LIU, J. W., DING, J., HE, Q.H., XIONG, R.; ZHANG, K. The investigation of nematocidal activity in *Stenotrophomonas maltophilia* G2 and characterization of a novel virulence serine protease. **Canadian Journal of Microbiology** 55, 934-942, 2009.
- HUANG, X.W., TIAN, B.Y., NIU, Q.H., YANG, J.K., ZHANG, L.M.; ZHANG, K.Q. An extracellular protease from *Brevibacillus laterosporus* G4 without parasporal crystal can serve as a pathogenic factor in infection of nematodes. **Research in Microbiology** 156, 719-727, 2005.
- HUANG, Y., XU, C., MA, L., ZHANG, K., DUAN, C.; MO, M. Characterization of volatiles produced from *Bacillus megaterium* YFM 3.25 and their nematocidal activity against *Meloidogyne incognita*. **European Journal of Plant Pathology** 126, 417-422, 2010.
- HUSSEY, R.S.; BAKER, K.R. "A Comparison of Methods for Colecting Inocula of *Meloidogyne* spp Including a New Technique". **Plant Disease Reporter** v.57, n.12, p.1025-1028, 1973.
- IBGE-Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Rio de Janeiro v.30 n.12 p.1-82 dezembro.2017.
- INSAM, H.; SEEWALD, M.S.A. Volatile organic compounds (VOCs) in soils. **Biology and Fertility of soils** 46, 199-213, 2010.
- JAMAL, Q.; CHO, J.; MOON, J.; MUNIR, S.; ANEES, M.; KIM, K.Y. Identification for the first time of cyclo (D-Pro-L-Leu) produced by *Bacillus amyloliquefaciens* Y1 as a nematocide for control of *Meloidogyne incognita*. **Molecules**, v.22, p.1839-1855, 2017.
- JISHA, V.N., SMITH, R.B.; BENJAMIN, S. An overview on the crystal toxins from *Bacillus thuringiensis*. **Advances in Microbiology** 3, 462-472, 2013.

JOHNSTON, T.M. "Effect of Fatty Acids Mixtures on the Rice Stylet Nematode (*Tylenchorhynchus martini* Fielding 1956)", **Nature** v.183, n.3696, p.1392, 1959.

JONATHAN, E.L.; BARKER, K.R.; ABDEL-ALIM, F.F.; VRAIN, T.C.; DICKSON, D.W. Biological control of *Meloidogyne incognita* on tomato and banana with rhizobacteria actinomycetes, and *Pasteuria penetrans*. **Nematropica**, v.30, p.231-240, 2000.

KATHY, M. Root-parasitic nematode host range and damage levels on Oregon vegetable crops: a literature survey. *Nematode Testing Service*, Extension Plant Pathology, Oregon, 2000.
Disponível em:
<http://www.science.oregonstate.edu/bpp/Nematodes/vegetable_crops.pdf>. Acesso em:
20 nov. 2018.

KAVITHA, J.; JONATHAN, E. I.; UMAMAHESWARI, R. Field application of *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* and *Trichoderma viride* for the control of *Meloidogyne incognita* in sugarbeet. **Journal of Biological Control** 21 (2): 211-215, 2007.

KONG, H.G.; KIM, J.; CHOI, G. J.; LEE, K.Y.; KIM, H.J.; HWANG, E.C.; MONN, B.J.; LEE, S. Production of surfactin and iturin by *Bacillus licheniformis* N1 responsible for plant disease control activity. **Plant pathology Journal**, v.26, n.2, p.170-177, 2010.

KRECHEL, A.; FAUPEL, A.; HALLMANN, J.; ULRICH, A.; BERG, G. Potato-associated bacteria and their antagonistic potential towards plant-pathogenic fungi and the plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood, **Canadian Journal of Microbiology** v.48, p.772-786, 2002.

KURZ, C. L.; EWBANK, J. J. *Caenorhabditis elegans* for the study of host-pathogen interactions. **Trends Microbiol** 8, 142-144, 2000.

LEFF, J.W.; FIERER, N. Volatile organic compound (VOC) emissions from soil and litter samples. **Soil Biology and Biochemistry** 40, 1629-1636, 2008.

Li, X.Q., Wei, J.Z., Tan, A. and Aroian, R.V. Resistance to root-knot nematode in tomato roots expressing a nematocidal *Bacillus thuringiensis* crystal protein. **Plant Biotechnology Journal** 5, 455-464, 2007.

LIZUKA, H.; KOMAGATA, T.; KUNII, Y.; SHIBUYA, M. "Nematocidal Action of Microorganisms", **Agric. Biol. Chem.** v.26, p.199, 1962.

LUO, X., CHEN, L., HUANG, Q., ZHENG, J., ZHOU, W., PENG, D., RUAN, L.; SUN, M. *Bacillus thuringiensis* metalloproteinase Bmp1 functions as a nematocidal virulence factor. **Applied and Environmental Microbiology** 79, 460-468, 2013.

MACHADO, D. F. M.; PARZIANELLO, F. R.; SILVA, A. C. F. D.; ANTONIOLLI, Z. I. Trichoderma no Brasil: o fungo e o bioagente. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 35, n.1, p. 274-288, 2012.

MARGINO, S., BEHAR, C.; ASMARA, W. Isolation and purification of chitinase *Bacillus* sp. D2 isolated from potato rhizosphere. **Indonesian Journal of Biotechnology** 17, 69-78, 2012.

MCNEAL, K.S.; HERBERT, B.E. Volatile organic metabolites as indicators of soil microbial activity and community composition shifts. **Soil Science Society of America Journal** 73, 579-588, 2009.

MOREIRA, F. J. C.; FERREIRA, A. C. S. CONTROLE ALTERNATIVO DE NEMATOIDE DAS GALHAS (*Meloidogyne enterolobii*) COM CRAVO DE DEFUNTO (*Tagetes patula* L.), INCORPORADO AO SOLO. *Holos*, v.31. p. 99-110. 2015.

- MOTLAGH, M. R. S.; SAMIMI, Z.. Evaluation of *Trichoderma* spp., as biological agents in some of plant pathogens. **Annals of Biological Research**, v. 4, n. 3,p. 173-179, 2013.
- NASCIMENTO, A.S. **Bactérias endofíticas no controle de *Ralstonia solanacearum* e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* do tomateiro.** 1998. 91p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília, DF.
- NAVES, R.L. **Bactérias endofíticas do sistema radicular: isolamento e potencial para o controle biológico de fitonematóides.** 2000. 113p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- NIU, Q. H., HUANG, X.W., TIAN, B.Y., YANG, J.K., LIU, J., ZHANG, L.; ZHANG, K.Q. *Bacillus* sp. B16 kills nematodes with a serine protease identified as a pathogenic factor. *Applied Microbiology Biotechnology* 69, 722-730, 2006a.
- NIU, Q.H., HUANG, X. W., ZHANG, L., LI, Y.X., LI, J., YANG, J.K.; ZHANG, K.Q. A neutral protease from *Bacillus nematocida*, another potencial virulence factor in the infection against nematodes. *Archives of Microbiology* 185, 439-448, 2006b.
- NIU, Q.H., HUANG, X.W., ZHANG, L., LIAN, L.H., LI, Y.X., LI, J., YANG, J.K.; ZHANG, K.Q. Functional identification of the gene *bace16* from nematophagous bacterium *Bacillus nematocida*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 75, 141-148. 2007.
- NOGYO KENKYU, N. Composition for controlling enmatode infestation comprises *Pasteuria* sp and an amino acid. **Patente número JP2001010916-A**, 16 de janeiro de 2001.
- NOUR, S.M.; LAWRENCE, J.R.; ZHU, H.; SWERHONE, G.D.W.; WELSH, M.; WELACKY, T.W.; TOPP, E. Bacteria associated with cyst of the soybean nematode (*heterodera glycines*). **Applied and Environmental Microbiology** v.69, n.1, p.607-615, 2003.
- NOWAK, J.; ASIEDU, S.K.; LAZAROVITS, G.; PILAY, V.; STEWART, A.; SMITH, C.; LIU, Z. Enhancement of *in vitro* growth and transplant stress tolerance of potato and vegetables plantlets co-cultured with a plant growth promoting pseudomonad bacterium. In: CARRE, F.; CHAGVARDIEFF, P. (eds). **Ecophysiology and photosyntetic in vitro cultures.** France: Commissariat à l'énergie atomique, 1995. p.173-179.
- PELEG; ITZHAK; FELDMAN; KATHERINA. *Bacillus firmus* CNCM I-1582 or *Bacillus cereus* CnCM I-1582 for controlling nematodes. **Patente número US 6,406,690**, de 18 de junho de 2002.
- PERALTA, I.E.; KNAPP, S.; SPOONER, D.M. Nomenclature for wild and cultivated tomatoes. TGC Report, v.56, p.6-12, 2006. <http://tgc.ifas.ufl.edu/vol56/html/vol56featr.htm> (30 de outubro 2018).
- PEREIRA, J.C. **Ecologia da comunidade bacteriana em solos de cerrado.** 1995. 172p. Tese (Doutorado em Solos) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, RJ.
- PÉREZ-GARCÍA, A.; ROMERO, D.; VICENTE, A. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of *Bacillus* in agriculture. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 22, n. 2, p. 187–193, 2011.
- POMELLA, A.W.V.; RIBEIRO, R.T.S.da. Controle biológico com *Trichoderma* em grandes culturas – Uma visão empresarial. In: BETTIOL,W.; MORANDI, M.A.B. **Biocontrole de doenças de plantas – usos e perspectivas.** Jaguariuna: Embrapa Meio Ambiente, 2009, 341p.
- QIN, X., SINGH, K.V., WEINSTOCK, G.M.; MURRAY, B.E. Effects of *Enterococcus faecalis* *fsr*Genes on production of gelatinase and a serine protease and virulence. **Infection Immunity** 68, 2579-2586, 2000.

- RADWAN, M. A.; FARRAG, S. A. A.; ABU-ELAMAYEM, M. M.; AHMED, N. S. Biological control of the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* on tomato using bioproducts of microbial origin. **Applied soil ecology**, Amsterdam, v. 56, n. 1, p. 58-62, 2012.
- RAYMOND, B., JOHNSTON, P.R., NIELSEN-LEROUX, C., LERECLUS, D. AND CRICKMORE, N. *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen? **Trends in Microbiology** 18, 189-194. 2010.
- REDDI, G.S.; RAO, A.S. Antagonism of soil actinomycetes to some soil-borne plant pathogenic fungi. **Indian Phytopatology** v.24, p.649-657, 1971.
- RHEE, K.-H. Isolation and characterization of *Streptomyces* sp. KH-614 producing anti-VRE (vancomycin-resistant enterococci) antibiotics. **Journal of General and Applied Microbiology**, v.48, 321–327, 2002.
- ROCHA, F. S., M. F. S. MUNIZ; V. P. CAMPOS. Coloração de fitonematóides com corantes usados na indústria alimentícia brasileira. *Nematologia Brasileira* 29:293-297, 2005.
- RODRIGUEZ-KÁBANA, R.; JORDAN, J.W.; HOLLIS, J.P. "Nematodes: Biological Control in Rice Fields: Role of Hydrogen Sulfide", **Science** v.148, n.3669, p.524, 1965.
- ROMEIRO, R.S. - **Controle biológico de doenças de plantas – procedimentos**. Viçosa, Editora UFV, 2007, 172 p.
- ROSA, J. M. O.; WESTERICH, J. N.; WILCKEN, S. R. S. Reação de genótipos e híbridos de tomateiro à *Meloidogyne enterolobii*. **Ciência Rural**, 44(7):1166-1171, 2014.
- RYU, C.M., FARAG, M.A., HU, C.H., REDDY, M.S., WIE, H.X., PARE, P.W.; KLOEPPER, J.W. (2003) Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 4927-4932.
- SAHEBANI, N.; HADAVI, N. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. **Soil Biology Biochemistry**, Oxford, v. 40, n. 8, p. 2016- 2020, 2008.
- SAHEBANI, N.; HADAVI, N. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. **Soil Biology Biochemistry**, Oxford, v. 40, n. 8, p. 2016- 2020, 2008.
- SAHEBANI, N.; N. HADAVI. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. **Soil Biol. Biochem** 40:2016–2020, 2008.
- SAMAC, D.A.; KINKEL, L.L. Suppression of the root-lesion nematode (*Pratylenchus penetrans*) in alfafa (*Medicago sativa*) by *Streptomyces* spp. **Plant and Soil**, v.235, p.35-44, 2001.
- SAMUELS, G.J. *Trichoderma*: Systematics, the sexual state, and ecology. **Phytopathology**, v. 96, n. 2, p. 195-206, 2006.
- SASSER, J.N.; KIRKPATRICK, T.L.; DYBAS, R.A. Efficacy of avermectins for root-knot control in tobacco. **Plant Disease** v.66, p.691-693, 1982.
- SAYRE, R.M.; STARR, M.P. Bacterial diseases and antagonism of nematodes. In: POINAR, G.O.; JANSSON, H.B. **Diseases of nematodes**, CRC, press, Boca Raton, 1988. p.69-101.

- SCHÖLLER, E.G., GÜRTLER, H., PEDERSEN, R., MOLIN, S.; WILKINS, K. Volatile metabolites from actinomycetes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 50, 2615-2621, 2002.
- SEINHORST, J. W. The relationship between population increase and population density in plant parasitic nematodes. I. Definitions of the terms host, host status and resistance. 4. The influence of external conditions on the regulation of population density. **Nematologica**, Leiden, v. 13, p. 429-450, 1967.
- SHARMA, R. D.; GOMES, A. C. Effect of *Bacillus* spp. toxins on oviposition and juvenile hatching of *Heterodera glycines*. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v.20, n. 1, p.53- 62, 1996.
- SHARON, E., M. BAR-AR-EYAL, I. CHET, A. HERRERAESTRELLA, O. OKLEIFELD; Y. SPIEGEL, Y. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. **Phytopathology** 91:687-693, 2001.
- SHEN, P.; GU, Z.; CHEN, J. Recompounded Coated Nematocide Liquid for Plant Root. **Patente número CN1360829-A**, publicada em 31 de julho de 2002.
- SIDDIQUI, I.A., HAAS, D.; HEEB, S. Extracellular protease of *Pseudomonas fluorescens* CHA0, a biocontrol factor with activity against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Applied and Environmental Microbiology** 71, 5646-5649, 2005.
- SIDDIQUI, I.A.; SHAUKAT, S.S. Suppression of root-knot disease by *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in tomato: importance of bacterial secondary metabolite, 2,4-diacetylphloroglucinol. **Soil Biology and Biochemistry** 35, 1615-1623, 2003.
- SIFRI, C.D., MYLONAKIS, E., SINGH, K.V., QIN, X., GARSIN, D.A., MURRAY, B.E., AUSUBEL, F.M.; CALDERWOOD, S. B. Virulence effect of *Enterococcus faecalis* protease genes and the quorum-sensing locus *fsr* in *Caenorhabditis elegans* and mice. **Infection Immunity** 70: 5647–5650, 2002.
- SIKORA, R. A. Interrelationship between plant health-promoting rhizobacteria, plant parasitic nematodes and soil microorganisms. *Mededelingen Faculteit Landbouwkundige Rijksuniversiteit*, Gent, v. 53, n.1, p. 867-878, 1988.
- SILVA, J. O. *Meloidogyne incognita* na cultura do tomateiro: levantamento e manejo com produtos biológicos. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Goiás. 76p., 2015.
- SILVA, V. N.; GUZZO, S. D.; LUCON, C. M. M.; HARA KAVA, R. Promoção de crescimento e indução de resistência à antracnose por *Trichoderma* spp. em pepineiro. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v 46, n.12,p. 1609-1618, 2011.
- SILVEIRA, A. P. D.; FREITAS, S. S. *Microbiota do solo e qualidade ambiental*. Campinas: Instituto Agrônômico, 2007. 317 p.
- SIQUEIRA, J.; FRANCO, A.A. **Biotechnologia do solo: fundamentos e perspectivas**. Brasília: MEC, 1988. 235p. (Programa de ciências agrárias nos trópicos brasileiros).
- SPIEGEL, Y.; CHET, I. Evaluation of *Trichoderma* spp. as a biocontrol agent against soilborne fungi and plant-parasitic nematodes in Israel. **Integrated Pest Management**, Chicago, v. 3, n. 3, p. 169-175, 1998.
- SPIEGEL, Y.; I. CHET. 1998. Evaluation of *Trichoderma* spp. as biocontrol agent against soilborne fungi and plant-parasitic nematodes in Israel. *Integrated Pest Management Reviews*, Israel, 3:169-175.
- STEFANELLO L.; BONETT, P.L. *Avaliação do desenvolvimento de milho com Trichoderma spp.*, **Cultivando o Saber**. Cascavel, v.6, n.1, p.121-127, 2013.

- STIRLING, G.R. "**Biological Control of Plant Parasitic Nematodes**", CAB International, England, 1991, 282 p.
- STURZ, A.V. The role of endophytic bacteria during seed piece decay and potato tuberization. **Plant Soil** v.175, n.2, p.257-263, 1995.
- SUAREZ, B., M. REY, M.; P. CASTILLO, E. MONTE and A. LLOBELLO. Isolation and characterization of PRA1, a trypsinlike protease from the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* CECT 2413 displaying nematocidal activity. **Applied Microbiology and Biotechnology** 65:46-55, 2004.
- TAYLOR, A.; SASSER, J.N. Biology, identification and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species). United States: North Caroline State University Graphics, 111p., 1978.
- TIAN, B.Y., LI, N., LIAN, L.H., LIU, J.W., YANG, J.K.; ZHANG, K.Q. Cloning, expression and deletion of the cuticle-degrading protease BLG4 from nematophagous bacterium *Brevibacillus laterosporus* G4. **Archives of Microbiology** 186, 297-305, 2006.
- TIAN, B.Y., YANG, J.K., LIAN, L.H., WANG, C.Y., LI, N.; ZHANG, K.Q. Role of an extracellular neutral protease in infection against nematodes by *Brevibacillus laterosporus* strain G4. **Applied Microbiology and Biotechnology** 74, 372-380, 2007.
- TU, J.C. Hiperparasitism of *streptomyces albus* on a destructive mycoparasite *Nectria inventa*. **Journal of Phytopathology** v.117, p.71-76, 1986.
- WALTER, D.E.; KAPLAN, D.T. Antagonism of plant-parasitic nematodes in florida citrus. **Journal of Nematology** v.22, n.4, p.567-573, 1990.
- WARRIOR, P.; HEIMAN, D.F.; REBBERGER, L.A.; JOHNSON, R.E.; HANSEN, J.R.; MCVICKER, K.A. production of Nematocidal Composition Involves Fermenting Bacterium or Fungus, Suspending Fermentation Broth in Aqueous Solution, Adjusting the pH of the Broth, Heating and Cooling the Broth, and Removing the Composition. **Patente número WO200176612-A1**, publicada em 18 de outubro de 2001.
- WELLER, D.M.; COOK, R.J. "Suppression of Take-all of Wheat by Seed Treatments with Fluorescent *Pseudomonas*", **Phytopathology** v.73, n.3, p.463-469, 1983.
- YAN, P.-S.; SONG, Y.; SAKUNO, E.; NAKAJIMA, H.; NAKAGAWA, H.; YABE, K. Cyclo (L-leucyl-L-prolyl) produced by *Achromobacter xylosoxidans* inhibits aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, p.7466-7473, 2004.
- YANG, L., HUANG, Y., LIN, J., MA, L., MO, M., LI, W.; YANG, F. (2012) *Lysinibacillus mangiferahumi* sp. nov., a new bacterium producing nematocidal volatiles. *Antonie van Leeuwenhoek* 102, 53-59.

APÊNDICE

TABELA 1

Resumo da Análise de Variância das médias da massa radicular de tomateiro, N° de galhas, N° de massa de ovos, N° de ovos e fator de reprodução de *Meloidogyne incognita*, em função de concentrações de Nem-Out™ e do tipo de aplicação.

Fonte de Variação	GL	Quadrados Médios				
		Massa radicular	N° de galhas	N° massa ovos	N° de ovos	Fator de reprodução
Concentrações	5	29,16	12,93**	0,36	2664,21**	21,08**
Aplicação	1	847,47**	35,36**	0,06	104,23	8,87**
Dos x Apl	5	29,62	4,82**	1,37*	1220,83**	13,42**
Test x Fatorial	1	5,09	0,86	0,86	4005,72**	39,01**
Resíduo	78	15,55	0,45	0,48	68,64	0,39
CV(%)		20,57	15,90	19,46	16,60	12,62

** Significativo a 1% pelo teste F.

QUADRO 1

Saída do resultado da análise de variância da porcentagem de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* eclodidos após exposição dos ovos a diferentes concentrações do produtor comercial Nem-Out™ por 14 dias (Software R. Versão 3.5.1.).

ECLOSÃO

 Quadro da análise de variancia

	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	6	3791510797	631918466	25.746	1.7926e-11
Residuo	35	859061176	24544605		
Total	41	4650571973			

CV = 25.16 %

Teste de normalidade dos residuos

Valor-p: 3.274203e-05

ATENCAO: a 5% de significancia, os residuos nao podem ser considerados normais!

Teste de homogeneidade de variancia

valor-p: 2.106853e-08

ATENCAO: a 5% de significancia, as variancias nao podem ser consideradas homogeneas!

QUADRO 2

Saída do resultado da análise de variância da porcentagem de motilidade e mortalidade de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* em diferentes concentrações do produto comercial Nem-Out™ por 14 dias (Software R. Versão 3.5.1.).

MOTILIDADE

 Quadro da análise de variancia

GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	6 46496	7749.4	1074.9	3.6758e-38
Residuo	35 252	7.2		
Total	41 46748			

 CV = 17.68 %

Teste de normalidade dos residuos

Valor-p: 7.656499e-08

ATENCAO: a 5% de significancia, os residuos nao podem ser considerados normais!

Teste de homogeneidade de variancia

valor-p: 0

ATENCAO: a 5% de significancia, as variancias nao podem ser consideradas homogeneas!

MORTALIDADE

 Quadro da análise de variancia

GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	6 34231	5705.1	32.368	6.8844e-13
Residuo	35 6169	176.3		
Total	41 40400			

 CV = 16.97 %

Teste de normalidade dos residuos

Valor-p: 7.338591e-05

ATENCAO: a 5% de significancia, os residuos nao podem ser considerados normais!

Teste de homogeneidade de variancia

valor-p: 2.398714e-08

ATENCAO: a 5% de significancia, as variancias nao podem ser consideradas homogeneas!
