

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

**MICRO-ORGANISMOS, QUITINA E QUITOSANA NO MANEJO DE  
NEMATOIDES DAS GALHAS NO TOMATEIRO**

LARA CAROLINE BORGES MOREIRA MOTA

MESTRADO

2015

LARA CAROLINE BORGES MOREIRA MOTA

**MICRO-ORGANISMOS, QUITINA E QUITOSANA NO MANEJO DE  
NEMATOIDES DAS GALHÃS NO TOMATEIRO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia - Mestrado, área de concentração em Fitopatologia, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientadora: Prof. Dra. Maria Amelia dos Santos

UBERLÂNDIA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

M917m Mota, Lara Caroline Borges Moreira, 1989-  
2015 Micro-organismos, quitina e quitosana no manejo de nematoídeos das  
galhas no tomateiro / Lara Caroline Borges Moreira Mota. - 2015.  
128 f. : il.

Orientadora: Maria Amelia dos Santos.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,  
Programa de Pós-Graduação em Agronomia.  
Inclui bibliografia.

1. Agronomia - Teses. 2. Pragas - Controle biológico - Teses. 3.  
Nematóide de galha - Teses. 4. Tomate - Doenças e pragas - Teses. I.  
Santos, Maria Amelia dos, 1964-. II. Universidade Federal de  
Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. III. Título.

---

CDU: 631

LARA CAROLINE BORGES MOREIRA MOTA

MICRO-ORGANISMOS, QUITINA E QUITOSANA NO MANEJO DE  
NEMATOIDES DAS GALHAS NO TOMATEIRO

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia – Mestrado, área de concentração em Fitopatologia, para obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 12 de fevereiro de 2015.

Profa. Dra. Nilvanira Donizete Tebaldi

UFU

Prof. Dr. Bruno Sérgio Vieira

UFU

Profa. Dra. Clélia Aparecida Iunes Lapera

UEMG

Prof. Dra. Maria Amelia dos Santos  
ICIAG-UFU  
(Orientadora)

UBERLÂNDIA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2015

Ao meu marido **Célio**, pelo amor e  
compreensão;  
Aos meus pais **José** e **Nilza** pelas  
silenciosas orações e por  
acreditarem em minha capacidade;  
Aos meus irmãos **Rodrigo**, **Ana**  
**Cláudia** e cunhada **Fernanda** pelo  
carinho e amizade;  
Aos meus sogros **Osvaldo** e **Sônia**,  
pelo afeto e incentivo.

**Dedico**

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

Provérbios, 2:6

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, pela vida, sabedoria e perseverança para realização deste trabalho;

À professora Dra. Maria Amelia dos Santos, pela orientação oportuna, pelos ensinamentos e exemplo como pessoa e profissional;

À professora Dra. Nilvanira Donizete Tebaldi, pela amizade, paciência e apoio constante;

Ao professor Dr. Bruno Sérgio Vieira, pelos incentivos que me fizeram buscar essa conquista;

Aos meus amigos da Pós-Graduação, em especial Ernane, Letícia, Igor, Carlos e Roberta pelo companheirismo;

Aos meus amigos e colegas de trabalho do Instituto de Ciências Agrárias, em especial Sandra, Maria Auxiliadora, Roberto, Marli e Júlia, pela amizade, pelos incentivos e pela alegria;

Ao Aires, técnico do Laboratório de Nematologia Agrícola, pela boa vontade e presteza com as análises laboratoriais;

Ao professor Ednaldo Guimarães e ao Ernane pela ajuda com as análises estatísticas.

À Adriana Figueiró pela ajuda com as análises enzimáticas;

Ao Luan, Vinícius, Alessandra e Sr. Joaquim, pela ajuda na desmontagem dos experimentos e processamento de amostras;

Às empresas Agrinos e LMXBIO, por cederem os produtos utilizados nesse trabalho;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudo durante parte do mestrado.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	iv
RESUMO GERAL.....	vi
GENERAL ABSTRACT.....	vii
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	01
1.1. CULTURA DO TOMATE.....	02
1.2. NEMATOIDES PARASITOS DE PLANTAS DO TOMATEIRO.....	03
1.2.1. Gênero <i>Meloidogyne</i> .....	03
1.2.1.1. <i>Meloidogyne incognita</i> .....	05
1.2.1.2. <i>Meloidogyne javanica</i> .....	05
1.3. CONTROLE BIOLÓGICO.....	06
1.3.1. Rizobactérias.....	06
1.3.1.1. <i>Bacillus subtilis</i> .....	08
1.3.1.2. <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	09
1.3.1.3. <i>Rhizobium</i> sp.....	11
1.3.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	11
1.3.3. <i>Trichoderma</i> spp.....	12
1.3.4. Uso combinado de micro-organismos.....	13
1.3.5. Compatibilidade de micro-organismos com agroquímicos.....	14
1.4. INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA DE PLANTAS.....	15
1.4.1. Resistência sistêmica adquirida (SAR).....	17
1.4.2. Resistência sistêmica induzida (ISR).....	18
1.4.3. Proteínas relacionadas à patogênese.....	19
1.4.4. Quitina e quitosana.....	19
REFERÊNCIAS.....	23
<b>CAPÍTULO I: CONTROLE DE <i>Meloidogyne incognita</i> E <i>Meloidogyne javanica</i> COM <i>Bacillus subtilis</i>, <i>Bacillus thuringiensis</i>, <i>Rhizobium</i> sp., <i>Saccharomyces cerevisiae</i> E <i>Trichoderma</i> spp. NO TOMATEIRO</b>	
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	37
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	38
2.1. Montagem e condução do experimento.....	38
2.2. Avaliações.....	40
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
4. CONCLUSÕES.....	53
REFERÊNCIAS.....	54

**CAPÍTULO II: COMPATIBILIDADE DE *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, *Rhizobium* sp., *Saccharomyces cerevisiae* e *Trichoderma* spp. A AGROQUÍMICOS**  
RESUMO.....x

ABSTRACT.....xi

1. INTRODUÇÃO.....	61
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	61
2.1. <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus thuringiensis</i> , <i>Rhizobium</i> sp. e <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	62
2.2. <i>Trichoderma</i> spp.....	63
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	65
4. CONCLUSÕES.....	73
REFERÊNCIAS.....	74

**CAPÍTULO III: Quitina e quitosana no manejo de *Meloidogyne incognita* e *Meloidogyne javanica* e na ativação de proteínas relacionadas à patogênese em tomateiro**

RESUMO.....xii

ABSTRACT.....xiii

1. INTRODUÇÃO.....	77
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	78
2.1. Montagem e condução do experimento.....	78
2.2. Avaliações.....	80
2.2.1. Análises nematológicas e desempenho do tomateiro.....	80
2.2.2. Avaliação de micro-organismos quitinolíticos.....	81
2.2.3. Proteínas relacionadas à patogênese.....	82
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	83
4. CONCLUSÕES.....	100
REFERÊNCIAS.....	101
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	106
APÊNDICE.....	107

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 01.</b> Tratamentos utilizados para controle de nematoídeas das galhas ( <i>M. incognita</i> e <i>M. javanica</i> ) em tomateiro, cultivado na casa de vegetação. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2015.....	40
<b>TABELA 02.</b> Altura de parte aérea (cm) de plantas de tomate, tratadas com micro-organismos para controle de nematoídeas das galhas. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2015.....	42
<b>TABELA 03.</b> Comprimento de raiz (cm) de plantas de tomate, tratadas com micro-organismos para controle de nematoídeas das galhas. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2015.....	43
<b>TABELA 04.</b> Peso fresco de raiz (g) de plantas de tomate, tratadas com micro-organismos para controle de nematoídeas das galhas. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2015.....	45
<b>TABELA 05.</b> Peso fresco de parte aérea (g) de plantas de tomate, tratadas com micro-organismos para controle de nematoídeas das galhas. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2015.....	47
<b>TABELA 06.</b> Peso seco de raiz (g) de plantas de tomate, tratadas com micro-organismos para controle de nematoídeas das galhas. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2015.....	48
<b>TABELA 07.</b> Peso seco de parte aérea (g) de plantas de tomate, tratadas com micro-organismos para controle de nematoídeas das galhas. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2015.....	49
<b>TABELA 08.</b> Fator de reprodução de <i>M. incognita</i> e <i>M. javanica</i> em plantas de tomate, tratadas com micro-organismos. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2015.....	50
<b>TABELA 09.</b> Ovos e/ou juvenis de <i>M. incognita</i> e <i>M. javanica</i> por grama de raiz de plantas de tomate, tratadas com micro-organismos. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2015.....	52
<b>TABELA 10.</b> Halo de inibição ao crescimento (mm) de <i>Bacillus subtilis</i> com agroquímicos em diferentes diluições. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2015.....	65

<b>TABELA 11.</b> Halo de inibição ao crescimento (mm) de <i>Bacillus thuringiensis</i> com agroquímicos em diferentes diluições. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2015.....	66
<b>TABELA 12.</b> Halo de inibição ao crescimento (mm) de <i>Rhizobium</i> sp. com agroquímicos em diferentes diluições. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2015.....	68
<b>TABELA 13.</b> Halo de inibição ao crescimento (mm) de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> com agroquímicos em diferentes diluições. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2015.....	70
<b>TABELA 14.</b> Velocidade média de crescimento micelial ( $\text{mm.h}^{-1}$ ) de <i>Trichoderma</i> spp. em meio de cultura BDA com e sem agroquímicos. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2015.....	72
<b>TABELA 15.</b> Tratamentos com quitina e/ou quitosana para controle de <i>Meloidogyne javanica</i> e <i>M. incognita</i> , e no desenvolvimento do tomateiro. Universidade Federal de Uberlândia, 2015.....	79
<b>TABELA 16.</b> Altura de parte aérea (cm) de plantas de tomate, tratadas com quitina e/ou quitosana via solo e/ou foliar para controle de nematoídes das galhas. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2015.....	83
<b>TABELA 17.</b> Comprimento de raiz (cm) de plantas de tomate, tratadas com quitina e/ou quitosana via solo e/ou foliar para controle de nematoídes das galhas. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2015.....	84
<b>TABELA 18.</b> Peso fresco raiz (g) de plantas de tomate, tratadas com quitina e/ou quitosana via solo e/ou foliar para controle de nematoídes das galhas. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2015.....	85
<b>TABELA 19.</b> Peso fresco de parte aérea (g) de plantas de tomate, tratadas com quitina e/ou quitosana via solo e/ou foliar para controle de nematoíde das galhas. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2015.....	86
<b>TABELA 20.</b> Peso seco de raiz (g) de plantas de tomate, tratadas com quitina e/ou quitosana via solo e/ou foliar para controle de nematoídes das galhas. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2015.....	87
<b>TABELA 21.</b> Peso seco de parte aérea (g) de plantas de tomate, tratadas com quitina e/ou quitosana via solo e/ou foliar para controle de nematoíde das galhas. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2015.....	88

<b>TABELA 22.</b> Fator de reprodução de <i>M. incognita</i> e <i>M. javanica</i> em plantas de tomate, tratadas com quitina e/ou quitosana via solo e/ou foliar. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2015.....	89
<b>TABELA 23.</b> Ovos e/ou juvenis de <i>M. incognita</i> e <i>M. javanica</i> por grama de raiz de plantas de tomate tratadas com quitina e/ou quitosana via solo e/ou foliar. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2015.....	91
<b>TABELA 24.</b> Micro-organismos quitinolíticos no solo após tratamento com quitina e/ou quitosana via solo e/ou foliar para controle de nematoides das galhas. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2015.....	92

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 01.</b> (a) Estrutura química da quitina ( $\beta$ -1,4-N-acetilglucosamina) e (b) da quitosana (D-glucosamina).....	20
<b>FIGURA 02.</b> Esquema de montagem de antibiograma.....	63
<b>FIGURA 03.</b> Antibiogramas de compatibilidade de <i>Bacillus subtilis</i> a agroquímicos em diferentes concentrações. A- Benalaxil + Mancozeb; B- Casugamicina; C- Imidacloprido; D- Metribuzim .....	66
<b>FIGURA 04.</b> Antibiogramas de compatibilidade de <i>Bacillus thuringiensis</i> a agroquímicos em diferentes concentrações. A- Benalaxil + Mancozeb; B- Casugamicina; C- Imidacloprido; D- Metribuzim.....	67
<b>FIGURA 05.</b> Antibiogramas de compatibilidade de <i>Rhizobium</i> sp. a agroquímicos em diferentes concentrações. A- Benalaxil + Mancozeb; B- Casugamicina; C- Imidacloprido; D- Metribuzim.....	69
<b>FIGURA 06.</b> Antibiogramas de compatibilidade de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a agroquímicos em diferentes concentrações. A- Benalaxil + Mancozeb; B- Casugamicina; C- Imidacloprido; D- Metribuzim.....	71
<b>FIGURA 07.</b> Micro-organismos quitinolíticos com halo de degradação da quitosana como única fonte de carbono do meio de cultura.....	93
<b>FIGURA 08.</b> Atividade da enzima quitinase em unidade de absorbância.minuto <sup>-1</sup> .mg de proteína <sup>-1</sup> , de plantas de tomate, atacadas por <i>Meloidogyne javanica</i> e tratadas com e sem quitina via solo e/ou quitosana via solo e/ou foliar.....	95
<b>FIGURA 09.</b> Atividade da enzima quitinase em unidade de absorbância.minuto <sup>-1</sup> .mg de proteína <sup>-1</sup> , de plantas de tomate, atacadas por <i>Meloidogyne incognita</i> , e tratadas com e sem quitina via solo e/ou quitosana via solo e/ou foliar.....	97
<b>FIGURA 10.</b> Atividade da enzima quitinase em unidade de absorbância.minuto <sup>-1</sup> .mg de proteína <sup>-1</sup> , de plantas de tomate, tratadas com e sem quitina via solo e/ou quitosana via solo e/ou foliar.....	99
<b>FIGURA 11.</b> Crescimento de <i>Trichoderma</i> spp. em meio de cultura BDA com e sem agroquímico Imidacloprido em diferentes concentrações. A- após 48 horas de incubação. B- após 96 horas de incubação. T- Testemunha- sem adição de produto ao meio. ND- produto não diluído.....	107

**FIGURA 12.** Crescimento de *Trichoderma* spp. em meio de cultura BDA com e sem agroquímico Casugamicina em diferentes concentrações. A- após 48 horas de incubação. B- após 96 horas de incubação. T- Testemunha- sem adição de produto ao meio. ND- produto não diluído.....107

**FIGURA 13.** Crescimento de *Trichoderma* spp. em meio de cultura BDA com e sem agroquímico Benalaxil + Mancozeb em diferentes concentrações. A- após 48 horas de incubação. B- após 96 horas de incubação. T- Testemunha- sem adição de produto ao meio. ND- produto não diluído.....107

**FIGURA 14.** Crescimento de *Trichoderma* spp. em meio de cultura BDA com e sem agroquímico Metribuzim em diferentes concentrações. A- após 48 horas de incubação. B- após 96 horas de incubação. T- Testemunha- sem adição de produto ao meio. ND- produto não diluído.....108

## RESUMO GERAL

MOTA, LARA CAROLINE BORGES MOREIRA. **Micro-organismos, quitina e quitosana no manejo de nematoides das galhas no tomateiro.** 2015. 128p. Dissertação (Mestrado em Agronomia – área de concentração em Fitopatologia) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.<sup>1</sup>

Dentre as formas de manejo de fitonematoídes destaca-se o controle biológico com micro-organismos habitantes do solo e a indução de resistência. O objetivo geral desse trabalho foi avaliar a eficácia de micro-organismos, quitina e quitosana no manejo de nematoides das galhas na cultura do tomateiro. Para tanto, foram montados três experimentos. O primeiro avaliou a eficácia do produto comercial LMXBIO e cada micro-organismo de sua composição (*B. subtilis*, *B. thuringiensis*, *Rhizobium* sp., *S. cerevisiae* e *Trichoderma* spp.), de forma isolada, no controle de *M. incognita* e *M. javanica* e o efeito no desenvolvimento do tomateiro. O segundo experimento avaliou a sensibilidade dos micro-organismos supracitados aos agroquímicos imidacloprido, benalaxil + mancozeb, casugamicina e metribuzim. O terceiro experimento verificou a eficácia dos produtos HYT-C (quitina) e/ou HYT-D (quitosana), via solo e/ou foliar, no controle de *M. incognita* e *M. javanica* e o efeito no desenvolvimento do tomateiro. *Trichoderma* spp. foi eficiente na redução de *M. incognita* no tomateiro. *B. subtilis* e *Rhizobium* sp. foram eficazes na redução de *M. javanica* no tomateiro. Nas concentrações recomendadas para o tomateiro, o fungicida benalaxil + mancozeb inibiu o crescimento de *B. thuringiensis* e *Rhizobium* sp.; o herbicida metribuzim inibiu o crescimento de *B. thuringiensis* e reduziu a velocidade de crescimento micelial do *Trichoderma* sp.; e o bactericida casugamicina inibiu o crescimento da *B. thuringiensis*. Nenhum produto, nas concentrações recomendadas para o tomateiro, inibiu o crescimento de *B. subtilis* e *S. cerevisiae*. O inseticida imidacloprido não interferiu no desenvolvimento de nenhum dos micro-organismos avaliados. Quitina via solo aumentou comprimento e o peso fresco raiz em plantas inoculadas com *M. incognita*. Quando associada à quitosana via foliar, também, promoveu aumento do peso aéreo das plantas. A aplicação de quitina via solo e associada com quitosana foliar, reduziu o fator de reprodução e a população por grama de raiz de *M. javanica*. Para *M. incognita* não foram obtidos resultados expressivos. Quitina via solo aumentou a população de micro-organismos quitinolíticos do solo. A aplicação de quitina solo, quitosana foliar, e associação de ambas, aumentou a atividade da enzima quitinase nas folhas do tomateiro quatro dias após aplicação, independente do nematoide inoculado.

**Palavras-chaves:** compatibilidade a agroquímicos, controle biológico, indução de resistência, *Meloidogyne* sp.

---

<sup>1</sup>Orientadora: Maria Amélia dos Santos

## GENERAL ABSTRACT

MOTA, LARA CAROLINE BORGES MOREIRA. **Microorganisms, chitin and chitosan to manage root-knot nematodes on tomato.** 2015. 128p. Dissertation (Masters degree in Plant Pathology) - Federal University of Uberlândia, Uberlândia.<sup>1</sup>

Among the forms of plant-parasitic nematode management, biological control with soil microorganisms and the induction of resistance stand out. This study evaluated the effectiveness of microorganisms, chitin and chitosan in the management of root-knot nematodes on tomato. Three experiments were done to confirm such effectiveness. The first experiment evaluated the effectiveness of the commercial product LMXBIO and each microorganism of its composition (*B. subtilis*, *B. thuringiensis*, *Rhizobium* sp., *S. cerevisiae* and *Trichoderma* spp.) alone, to control *M. incognita* and *M. javanica* and their effects on tomato plant growth. The second experiment evaluated the sensitivity of the above microorganisms to agrochemicals imidacloprid, benalaxyl + mancozeb, kasugamycin and metribuzim. The third experiment evaluated the effectiveness of HYT-C products (chitin) and/or HYT-D (chitosan), via soil and/or leaf, to control *M. incognita* and *M. javanica* and their effect on tomato plant growth. *Trichoderma* spp. was effective in reducing *M. incognita* in tomato, while *B. subtilis* and *Rhizobium* sp. were effective in reducing *M. javanica* in tomato. At the recommended concentrations for tomato, the fungicide benalaxyl + mancozeb inhibited growth of *B. thuringiensis* and *Rhizobium* sp.; the herbicide metribuzin inhibited growth of *B. thuringiensis* and reduced the rate of mycelial growth *Trichoderma* sp.; the bactericide kasugamycin inhibited growth of *B. thuringiensis*. At the recommended concentrations for tomato crop, no products inhibited growth of *B. subtilis* or *S. cerevisiae*. The insecticide imidacloprid did not affect the development of any of the studied microorganisms. Chitin in the soil increased root length and t fresh weight in plants inoculated with *M. incognita*. When combined with foliar chitosan, it also promoted increased plant shoot mass. The application of chitin to soil associated with chitosan to leaves, reduced the reproduction factor and population per gram of the root-knot nematode *M. javanica*. No significant results were obtained for *M. incognita*. Chitin applied to the soil increased the population of chitinolytic microorganisms. The application of soil chitin, foliar chitosan and the combination of both, increased the activity of the enzyme chitinase in the leaves four days after application, regardless of the nematode inoculated.

**Keywords:** agrochemicals compatibility, biological control, resistance induction, *Meloidogyne* sp.

---

<sup>1</sup>Adviser: Maria Amelia dos Santos

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

O tomateiro sofre danos significativos causados por fitonematoídes, principalmente em áreas com ocorrência simultânea de *Meloidogyne incognita* (Koford & White) Chitwood e *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood (CHARCHAR, 1995). Plantas atacadas caracterizam-se pelo pouco desenvolvimento da parte aérea com sintomas reflexos (EMBRAPA, 2006), decorrentes da dificuldade de absorção de água e nutrientes, resultando em queda de produtividade, com perdas na produção de 28,7 a 85,0% (CHARCHAR *et al.*, 1998).

Quando os nematoídes se disseminam em uma área, o controle torna-se difícil e sua erradicação praticamente impossível (FERRAZ *et al.*, 2010). No controle de nematoídes várias estratégias combinadas como uso de plantas antagonistas, controle químico, cultivares resistentes, rotação de culturas, alqueive e controle biológico devem ser usadas (BARKER; KOENNING, 1998).

O controle biológico pode ser um método viável para manejo dos nematoídes das galhas. Micro-organismos habitantes do solo, como *Bacillus subtilis* Cohn, *B. thuringiensis* Berliner, *Rhizobium* sp. (Frank), *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E.C. Hansen e *Trichoderma* spp. (Persoon), têm sido estudados no controle de nematoídes das galhas (ARAÚJO; MARCHESI, 2009; CAPRONI *et al.*, 2012; CHEN *et al.*, 2000; FABRY *et al.*, 2007; ZANARDO, 2009).

Outra medida que tem sido demonstrada em muitas espécies de plantas contra o ataque de fungos, bactérias, vírus e nematoídes é a indução de resistência. Dentre os indutores destacam-se a quitina, o segundo polissacarídeo mais abundante do planeta, encontrado principalmente em crustáceos e constituído por uma sequência linear de N-acetylglucosamina e a quitosana, forma desacetilada da quitina com poli D-glucosamina (DI PIERO; GARDA, 2008). A indução de resistência está relacionada com o aumento da atividade de enzimas como quitinases e peroxidases na planta. Além da indução de resistência, segundo Castro *et al.* (2011), quando a quitina é aplicada ao solo, há um aumento na atividade de micro-organismos quitinolíticos capazes de degradar a quitina presente na casca dos ovos dos fitonematoídes, sendo esse outro importante mecanismo de biocontrole.

Nesse contexto, produtos para serem utilizados no manejo de fitonematoïdes vêm surgindo no mercado. O produto LMXBIO trata-se de um probiótico e bioativador de plantas, composto pelos micro-organismos *B. subtilis*, *B. thuringiensis*, *Rhizobium* sp., *S. cerevisiae* e *Trichoderma* spp., que segundo informações da empresa detentora, possui propriedades nematicidas devido ao amplo espectro de ação de seus componentes contra nematoïdes (LMXBIO, 2014). O produto HYT-C é um produto a base de quitina micronizada, extraída de uma fonte natural a partir de resíduos de camarão, e o HYT-D sua forma desacetylada, a quitosana. Ambos os produtos estimulam uma maior formação de raízes e estimulam a capacidade natural da planta para resistir aos patógenos de solo, como fitonematoïdes (AGRINOS, 2014).

## 1.1 CULTURA DO TOMATE

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) pertence à ordem Solanales, família Solanaceae e ao gênero *Solanum* (FILGUEIRA, 2000). É nativo da região andina que abrange parte do Chile, Colômbia, Equador, Bolívia e Peru, mas sua ampla domesticação ocorreu no México, seu centro de origem secundário (SANTOS, 2009).

O tomate é a segunda olerícola mais cultivada no mundo, sendo superada apenas pela batata, e junto com a cebola e o alho são os alimentos mais industrializados (FILGUEIRA, 2000). É uma das culturas mais importantes, não apenas em produção, mas também em valor socioeconômico (KROSS *et al.*, 2001).

A safra mundial de tomate, em 2012, totalizou 161,8 milhões de toneladas, em uma área cultivada de 4,8 milhões de hectares com rendimento médio de 33,6 t.ha<sup>-1</sup>. O maior produtor mundial de tomate é a China (30,9%), seguida pelos EUA (8,15%) Índia (10,81%) e Turquia (7,01%). O Brasil é o oitavo maior produtor mundial representando 2,39% da produção mundial, com 1,25% da área cultivada e com rendimento médio de 60,66 t.ha<sup>-1</sup>, valor 80% maior que a média mundial. Na safra 2012, a área cultivada no país foi de 63,859 mil hectares, alcançando o volume de 3,87 milhões de toneladas (FAOSTAT, 2013).

No Brasil, o tomateiro é cultivado praticamente em todo território nacional, mas sua produção destaca-se nas regiões Sudeste e Centro-Oeste. Os Estados com maior participação na produção nacional são Goiás (32,1%), São Paulo (17,6%) e Minas Gerais (13,5%) (IBGE, 2013). Desta produção, 70% são destinados ao consumo *in*

*natura* e o restante são matéria prima para indústria na produção de diversos produtos como molho, pastas, sucos e outros derivados (MAKISHIMA; MELO, 2005).

## 1.2 NEMATOIDES PARASITOS DE PLANTAS DO TOMATEIRO

O tomateiro tem como um dos principais problemas fitossanitários, o parasitismo por nematoídes do gênero *Meloidogyne*, que são formadores de galhas na raiz (ARAÚJO; MARCHESI, 2009). Plantas infectadas apresentam dificuldades na absorção de água e nutrientes do solo, resultando em deficiência mineral e perda de produtividade da ordem de 25 a 85% (LOPES; SANTOS, 1994).

### 1.2.1 Gênero *Meloidogyne*

Em 1855, Berkeley classificou o nematoide das galhas como *Heterodora radicicola*. Goeldi, em 1877, considerou o nematoide das galhas como *Meloidogyne exigua*, sendo esta a primeira vez que o nematoide das galhas foi apontado pertencente ao gênero *Meloidogyne*. Porém inicialmente não foi bem aceito na comunidade científica. Em 1949, quando Chitwood fez uma revisão completa classificando as quatro principais espécies de *Meloidogyne* spp. (*M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria*, *M. hapla*), separando-as pelas marcas cuticulares na região perineal, que os nematoides das galhas foram conhecidos mundialmente como gênero *Meloidogyne* (GUIMARÃES, 2012).

Os nematoides das galhas são parasitos obrigatórios de raízes de milhares de espécies vegetais, incluindo dicotiledôneas, herbáceas e lenhosas. O gênero inclui cerca de 90 espécies descritas, com algumas espécies apresentando raças (GUIMARÃES, 2012).

A reprodução das espécies tropicais mais importantes do gênero *Meloidogyne* é por partenogênese mitótica, porém machos são encontrados em condições naturais. Todos os nematoides passam por um estádio embrionário, quatro estágios juvenis (J1–J4) e uma fase adulta. Seu ciclo de vida se inicia quando a fêmea, em forma de cabaça, parcialmente encaixada na raiz da planta hospedeira deposita seus ovos numa matriz gelatinosa. Mais de 1.000 ovos podem ser encontrados em uma massa de ovos. O desenvolvimento dos ovos ocorre em poucas horas após a deposição, resultando em 2, 4, 8 e mais células até a formação do juvenil, a primeira fase juvenil (J1) dentro do seu

interior. A primeira ecdise ocorre dentro do ovo formando os juvenis de 2º estádio (J2) que então eclodem. Após a eclosão, o J2 que constitui a fase infectiva do nematoide, tem um curto período de vida, livre no solo. Eles não se alimentam durante essa fase, mas usam lipídios armazenados no seu intestino para se manterem até encontrar uma planta hospedeira. O J2 é guiado para planta hospedeira com mais eficiência por exsudações das raízes do hospedeiro (AGRIOS, 2005; GUIMARÃES, 2012; TIHOHOD, 2000; EISENBACK; TRIANTAPHYLLOU, 1991).

Este nematoide inicia seu processo de penetração na zona de alongamento da raiz e migra intercelularmente para a ponta da raiz. Uma vez que atinge o meristema da raiz, ele migra para zona de diferenciação do cilindro vascular. Ao chegar à zona de desenvolvimento do protoxilema, este seleciona e posteriormente modifica as células vegetais, que são diferenciadas em sítios de alimentação. O primeiro sinal da gênese das células gigantes é o aparecimento de várias células binucleadas. Células gigantes podem ser até 100 vezes maiores que as células do parênquima vascular da raiz normal e podem conter até 100 núcleos. Outras modificações que ocorrem para formação das células de alimentação incluem invaginações na membrana plasmática (ABAD *et al.*, 2003).

O juvenil de segundo estádio sofre uma série de transformações que culminam nas ecdises, dando origem aos estádios juvenis J3, J4 e finalmente aos adultos machos e fêmeas. O período sedentário é caracterizado por um processo de alimentação em que secreções das células da glândula esofágica do nematoide são injetadas via estilete dentro das células de alimentação e induz o fornecimento de todas as necessidades nutricionais do nematoide. As fêmeas permanecem na planta e tem formato de uma cabaça, já os machos vermiformes abandonam a raiz. A duração do ciclo de vida varia de 3 a 4 semanas, sendo o ciclo mais curto na faixa de 25-27°C. Em hospedeiros menos favoráveis, a duração pode se estender por período mais longo (ABAD *et al.*, 2003; TIHOHOD, 2000).

Geralmente, as plantas sofrem mais danos causados pelo nematoide do gênero *Meloidogyne* em solos arenosos do que em solos de textura mais argilosa. Em condições favoráveis podem levar à morte de planta por colapso do sistema radicular (GOMES; COFCEWICZ, 2005).

Os sintomas diretos mais evidentes que costumam ocorrer são: galhas radiculares de formatos variáveis, no geral bem visíveis, e escassez de raízes

secundárias. Essa combinação resulta em sistemas radiculares rasos, pobres e deformados. Na parte aérea, as plantas parasitadas mostram subdesenvolvimento, clorose e/ou murcha foliar e queda de produtividade, caracterizando as reboleiras. Em algumas culturas, podem interagir com outros patógenos, com graves consequências ao desenvolvimento das plantas (GUIMARÃES, 2012).

### **1.2.1.1 *Meloidogyne incognita***

*Meloidogyne incognita* foi relatado inicialmente em 1920, no Texas (EUA). É uma espécie cosmopolita de ocorrência generalizada em toda a região tropical e subtropical. No Brasil foi assinalada, desde 1950, parasitando grande número de plantas daninhas (SBN, 2012).

É uma espécie altamente polífaga, atacando ampla lista de monocotiledôneas e dicotiledôneas. No Brasil, podem ser citados algodão, pêssego, repolho, feijões em geral, cenoura, banana, soja e milho (SBN, 2012).

*M. incognita* apresenta quatro raças, sendo que todas ocorrem no Brasil (SBN, 2012). São identificadas com base no teste de seis hospedeiros diferenciais com cultivares norte-americanas. A avaliação é qualitativa, ou seja, com base apenas na presença ou ausência de galhas no sistema radicular das plantas inoculadas. A raça 1 não infecta o algodão e o fumo; a raça 2 infecta somente o fumo. A raça 3 só o algodão e a raça 4, ambos os hospedeiros. As demais hospedeiras (pimenta, melancia e tomate) apresentam padrões de resistência ou suscetibilidade semelhantes nas raças de *M. incognita* (EISENBACK *et al.*, 1981).

### **1.2.1.2 *Meloidogyne javanica***

A primeira ocorrência de *Meloidogyne javanica* foi relatada no fim do século XIX em cana-de-açúcar, em Java na Indonésia. No Brasil, foi assinalada desde 1950, parasitando grande número de plantas daninhas. É uma espécie cosmopolita presente nas regiões tropical e subtropical, superada apenas pela dispersão de *M. incognita* (SBN, 2012).

É uma espécie muito polífaga parasitando plantas de uma longa lista de monocotiledôneas e dicotiledôneas. No Brasil, pode-se citar milho, batata, tomate e

hortaliças em geral, arroz, soja, banana, cana-de-açúcar, entre muitos outros (SBN, 2012).

Já foram detectadas quatro raças de *M. javanica*, que são identificadas pelo teste em hospedeiros diferenciadores. A raça 1 parasita fumo, melancia e tomate, enquanto a raça 2 parasita essas plantas mais o pimentão, raça 3 que parasita as mesmas plantas que a raça 1, acrescenta-se mais o amendoim. A raça 4 parasita as mesmas plantas da raça 2 mais o amendoim (CARNEIRO *et al.*, 2003; HARTMAN; SASSER, 1985; RAMMAH; HIRSCHMANN, 1990).

### 1.3 CONTROLE BIOLÓGICO

O controle biológico tem-se apresentado como medida mais viável para o manejo de fitonematoídes, por minimizar o dano ambiental comparado aos métodos químicos convencionais (COIMBRA; CAMPOS, 2005). Segundo Maciel e Ferraz (1996), o método biológico para controle de nematoides pode acontecer pela paralisação do ciclo de vida ou, pelo menos, pela redução da capacidade reprodutiva do parasita. Além disso, a transformação dos exsudatos radiculares em subprodutos pela ação dos micro-organismos pode fazer com que o nematoide não reconheça o estímulo quimiotrópico e continue movimentando-se no solo até morrer (FREITAS, 2001). Micro-organismos biocontroladores também são capazes de induzir resistência nas plantas contra o ataque de nematoides (FU; DONG, 2013).

Os principais agentes de controle biológico de nematoides são os fungos e bactérias, como as colonizadoras da rizosfera, denominadas rizobactérias, que têm proporcionado defesa contra o ataque de patógenos de solo e promovido o crescimento de plantas (VAZ *et al.*, 2011).

#### 1.3.1 Rizobactérias

Diversos micro-organismos de solo são conhecidos como parasitas ou predadores de fitonematoídes (SHARMA; VIVALDI, 1999), e entre eles, as rizobactérias. As rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP), ou Plant Growth Promoting Rhizobacteria, constituem um grupo heterogêneo de bactérias que podem ser encontradas na rizosfera, na superfície ou em associação com as raízes, e

podem favorecer a extensão ou qualidade do crescimento da planta de maneira direta ou indireta (AHMAD *et al.*, 2008).

Segundo Kloepper *et al.* (1999), as rizobactérias colonizam as raízes das plantas em resposta às secreções ricas em carboidratos e aminoácidos por elas produzidas. A promoção de crescimento de plantas é consequência da produção de fitohormônios, produção de sideróforos e enzimas líticas que induzem a solubilização do fosfato do solo, inibição da síntese de etileno, aumento da fixação de nitrogênio, solubilização e absorção de nutrientes e melhoria das condições do solo (ARAÚJO, 2008; LIMA, 2010).

As rizobactérias oferecem benefícios indiretos ao crescimento de plantas pela supressão do solo contra micro-organismos maléficos (KLOEPPER *et al.*, 1999). Lugtenberg e Kamilova (2009) relatam vários mecanismos de biocontrole das rizobactérias. Dentre eles, antagonismo devido à produção de antibióticos capazes de matar agentes patogênicos; interferência de sinal com base na degradação da N-acil lactonas homoserina (AHL ou N-AHL) que são moléculas não bacterianas sinalizadoras envolvidas no fenômeno que dá a percepção do *quorum sensing*; indução de resistência sistêmica (ISR) resultando em plantas resistentes a alguns patógenos; produção de sideróforos, um quelante de ion-Fe<sup>3+</sup>, que pode inibir o crescimento de fungos patogênicos; competição por nutrientes e nichos com o patógeno; e interferência com a atividade, sobrevivência, germinação, e esporulação do patógeno.

Muitas destas bactérias têm potencial para reduzir danos causados por fitonematoides (KLOEPPER *et al.*, 1999). Elas fornecem a primeira linha de defesa para raízes devido a sua capacidade de multiplicação no ambiente da rizosfera, potencial de colonização no sítio de infecção da raiz e por agir em contato direto com os parasitas (HASKY-GUNTER *et al.*, 1998).

O impacto das bactérias sobre os nematoides pode ser decorrente do parasitismo, da produção de antibióticos, toxinas e enzimas, da interferência no processo de reconhecimento planta-hospedeiro, da indução de resistência e/ou proporcionando o desenvolvimento saudável da planta (TIAN *et al.* 2007).

### **1.3.1.1 *Bacillus subtilis***

A bactéria *Bacillus subtilis* pertence ao gênero *Bacillus*, com célula bacteriana na forma de bastonete, gram positiva, móvel e com formação de endósporos (estruturas de resistência) altamente resistentes ao calor. Bioquimicamente caracterizam-se por apresentar catalase (+), crescimento anaeróbico em ágar (-), redução de NO<sub>3</sub> a NO<sub>2</sub> (+), hidrólise do amido (+), produção de ácido a partir de glicose, arabinose e manose (+), crescimento em NaCl a 7% (+), crescimento a 45°C (+), hidrólise de caseína (+) e produção de esporo (+) (LIMA, 2010).

O habitat de *B. subtilis* é o solo, mais especificamente a rizosfera. Em condições desfavoráveis como variações de temperatura, osmolaridade e disponibilidade de fontes de carbono, a célula bacteriana entra em estádio de letargia e apresenta respostas adaptativas como desenvolvimento de motilidade, transformação genética por DNA exógeno e produção de antibióticos ou enzimas degradativas extracelulares. Em caso de escassez de nutrientes, as células se dispõem de informações sensoriais que as direcionam para a formação de endósporo, uma estrutura de resistência extremamente resistente a agressões exógenas, o que ocasiona a paralisação do ciclo de crescimento e divisão celular (LANA FILHO *et al.*, 2010).

*B. subtilis* tem sido usado comercialmente para o biocontrole de doenças de plantas (YAO *et al.*, 2006). De acordo com Lana Filho, Ferro e Pinho (2010), seu biocontrole pode ser de natureza direta ou indireta. O antagonismo direto envolve mecanismos de antibiose, como a síntese de substâncias antimicrobianas, a competição por espaço e nutrientes e a síntese de compostos voláteis. O mecanismo indireto é exercido pelo fenômeno de resistência sistêmica induzida (ISR).

A bactéria pode atuar diretamente sobre os nematoides por meio de antibióticos e endotoxinas ou pode modificar os exsudatos radiculares, fazendo com que os mesmos não sejam reconhecidos pelos nematoides, inibindo a eclosão e motilidade dos juvenis, e consequentemente, reduzindo a invasão nas raízes das plantas (ARAÚJO *et al.*, 2002).

Os metabólitos produzidos pela rizobactéria desencadeiam reações de hipersensibilidade nas células vegetais e interferem na oviposição (SHARMA; GOMES, 1996) impedindo que as fêmeas dos nematoides consigam energia suficiente para produzir ovos (FREITAS, 2001). Além disso, são capazes de produzir proteases

(LIAN *et al.*, 2007) e induzirem a produção de enzimas de defesa na planta hospedeira (KAVITHA *et al.*, 2007) contra os fitonematoïdes.

O tratamento de sementes de soja com *B. subtilis* afetou a orientação de *Heterodera glycines* Ichinohe, reduzindo a migração em direção à raiz, devido à degradação bacteriana dos componentes dos exsudatos que estimulam a migração dos juvenis recém-eclodidos (ARAÚJO *et al.*, 2002). O tratamento de sementes de feijão com *B. subtilis*, também, resultou na supressão de formação de galhas e reprodução de *M. incognita* (KHAN *et al.*, 2007). Na cultura da beterraba, Kavitha *et al.* (2007) observaram que *B. subtilis* aumentou a atividade de enzimas de defesa das plantas tratadas com a bactéria, contribuindo para o controle de *M. incognita*. O controle biológico de *B. subtilis* no tomateiro foi relatado por Araújo e Marchesi (2009) pela redução no número de ovos de *Meloidogyne* spp.

### **1.3.1.2 *Bacillus thuringiensis***

A rizobactéria *Bacillus thuringiensis* tem a forma de bastonete, gram-positiva, pertencente à família *Bacillaceae*. Sua célula vegetativa tem de 1,0 a 1,2 µm de largura e de 3,0 a 5,0 µm de comprimento, geralmente móvel, com capacidade de formação de esporo. É uma espécie aeróbia não estrita com faixa de temperatura de crescimento entre 10 e 45 °C. Apresenta um amplo complexo enzimático, o que lhe permite utilizar uma variedade de substratos, principalmente no solo (ÂNGELO *et al.*, 2010).

Foi descrita inicialmente por Berliner em 1915 na Alemanha, isolada a partir da traça da farinha (*Anagasta kuehniella* Zeller). Mas antes disso, em 1902, o pesquisador japonês Ishiwata já havia isolado uma bactéria a partir do bicho da seda (*Bombyx mori* L.), que posteriormente foi descoberta como subespécie de *B. thuringiensis* (SANTOS, 2010).

*B. thuringiensis* pertence ao grupo *B. cereus*, um subgrupo do gênero *Bacillus*, contendo as espécies *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. weihenstephanensis*, *B. mycoides* e *B. pseudomycoides*. As três primeiras espécies são oportunistas ou patogênicas a insetos ou mamíferos, sendo que, as três últimas são geralmente consideradas como não patogênicas (XU *et al.*, 2012). Apesar do sequenciamento de estirpes do grupo *B. cereus*, mostrar claramente que o grupo exibe uma população de estrutura complexa e muito semelhante, *B. thuringiensis* tem sido vista como uma

espécie separada dos outros membros do grupo, com base principalmente nas suas propriedades entomopatogênicas e presença do gene da toxina inseticida cristalina (Cry) (OKSTAD; KOLSTO, 2012).

A principal característica que distingue a espécie das outras do mesmo gênero é a presença intracelular de um cristal proteico produzido durante a esporulação. Os cristais são formados principalmente por proteínas denominadas Cristal (Cry), anteriormente conhecidas como δ-endotoxinas, que ao final da esporulação representa cerca de 20% a 30% do peso seco da célula, sendo liberado no momento da lise celular (ÂNGELO *et al.*, 2010; BRAVO *et al.*, 2007).

Estes cristais apresentam atividade entomopatogênica para várias espécies de insetos, destacando-se as Ordens dos lepidópteros, dípteros e coleópteros. Há subespécies de *B. thuringiensis* que apresentam cristais tóxicos contra as Ordens Hymenoptera, Hemiptera, Orthoptera, Phthraphera e, também para alguns nematoïdes, protozoários e ácaros. A ação das toxinas resulta na paralisia do aparelho digestório, ocasionando morte por inanição, paralisia geral dos músculos e septicemia (SANTOS, 2010). As proteínas Cry atuam por inserção das membranas nas microvilosidades do intestino médio de insetos suscetíveis, levando à ruptura do equilíbrio osmótico, à lise de células epiteliais e, eventualmente, a morte (KAUAR, 2012).

De acordo com Jouzani *et al.* (2008), os genes Cry 5, 6, 12, 13, 14 e 21 já foram caracterizados por apresentarem propriedades nematicidas. Li *et al.* (2008), utilizaram plantas de tomate com o gene Cry 5B e observaram controle de *M. incognita* com redução no número de galhas nas raízes após 45 dias da infestação no solo. Utilizando proteínas de dez isolados de *B. thuringiensis*, Mohammed *et al.* (2008) observaram, *in vitro*, mortalidade de 89 a 100% de juvenis de *M. incognita*, e quando aplicados via solo na cultura do tomate houve redução de até 78% nas massas de ovos. Em um estudo similar nas culturas do quiabo e feijão, também, foi verificado controle de 70 a 100% do mesmo nematoide (KHAN *et al.*, 2010).

No controle de *M. hapla* na cultura da alface, Chen *et al.*, (2000) verificaram que a adição de *B. thuringiensis* no solo reduziu a produção de ovos em 25,4% e incrementou o peso da parte aérea da planta. Dawar *et al.*, (2008) observaram, *in vitro*, 50% de mortalidade de juvenis de *M. javanica* com aplicação de *B. thuringiensis*. Em casa de vegetação, utilizando suspensão bacteriana no encharcamento do solo, os

mesmos autores verificaram redução de 1,5 a 3 vezes na multiplicação do nematoide no feijoeiro.

### 1.3.1.3 *Rhizobium* sp.

As bactérias do gênero *Rhizobium* são classificadas no Domínio *Bacteria*; Filo *Proteobacteria*; Classe *Alfaproteobacteria*; Ordem *Rhiobiales*; e Família *Rhizobiaceae* (GARRITY; HOLT, 2001). São rizobactérias capazes de nodular e fixar nitrogênio em relações simbióticas com plantas da família *Leguminosae* (ANTUNES, 2010).

Estudos já foram feitos demonstrando o potencial desse gênero no controle biológico de fitonematoïdes. As primeiras investigações foram feitas com a utilização de cepas da espécie *Rhizobium etli*, previamente denominada *Agrobacterium radiobacter*, por Racke e Sikora em 1992. Os autores isolaram a bactéria da rizosfera de plantas de batata identificando-a como isolado G12. Tratando tubérculos de batata com suspensão bacteriana, verificou-se a redução de 39% na penetração de *Globodera pallida* Stone na cultura da batata. Com o mesmo isolado, utilizando o método de sistema radicular bipartido Hasky-Gunter *et al.*, (1998), também, constataram a atividade antagonística no controle de nematoide do cisto da batata atribuindo à indução de resistência sistêmica como mecanismo de controle.

Estudando esse mesmo isolado, Fabry *et al.* (2007), observaram eficiência na redução do número de ovos e de galhas de *M. javanica* em plantas de tomateiro na ordem de 38,81 e 35,34%. Reitz *et al.* (2000) verificaram que a aplicação do lipolissacarídeo (LPS) extraído de *R. etli* G12 reduziu a infecção causada pelo nematoide *G. pallida* em plantas de batata, mesmo em baixas concentrações, confirmando a indução de resistência por LPS.

### 1.3.2 *Saccharomyces cerevisiae*

*Saccharomyces cerevisiae* é uma levedura pertencente ao Reino Fungi, eucariota unicelular, cuja parede é constituída por duas camadas compostas por três macromoléculas principais: **manana-proteína**, um complexo no qual o polissacarídeo manana está covalentemente ligado à proteína; **glucana**, um polissacarídeo de  $\beta$ -1,3 e  $\beta$ -1,6 glicose; e **quitina**, um polímero de  $\beta$ -1,4 N-acetilglicosamina (CABIB *et al.*, 1982).

A levedura tem muita importância biotecnológica por ser utilizada na indústria de panificação, cervejaria, suplementos alimentares e produção de etanol. Além disso, vem se destacando no controle de fitopatógenos de diversas plantas devido à produção de compostos orgânicos voláteis (VOCS) antimicrobianos (ZANARDO, 2009). Uma fração de *S. cerevisiae* contendo carboidratos induziu o aumento de compostos de defesa como ácidos fenólicos em raízes de *Salvia miltiorrhiza* Bunge (CHEN *et al.*, 2001). Labanca (2002) verificou que um carboidrato, possivelmente manana e glucosamina, obtido da parede celular de *S. cerevisiae* induziu resistência local contra *Colletotrichum lagenarium* (Pass.) Penz & Sacc em plantas de pepino.

Apesar de dados referentes ao controle de diversos patógenos, o efeito dos VOCs produzidos pela levedura *S. cerevisiae* em fitonematoides ainda é pouco estudado (FIALHO *et al.*, 2012). Fialho *et al.* (2012) verificaram o efeito *in vitro* de uma mistura artificial de compostos orgânicos voláteis de *S. cerevisiae* sobre a sobrevivência de juvenis de *M. javanica*, com 100% de mortalidade dos fitonematoides. O efeito nematicida da levedura contra *M. javanica* na cultura da berinjela foi constatado por Mokbel e Alharbi (2014). A aplicação *S. cerevisiae* ( $1 \times 10^8$  ufc.kg<sup>-1</sup> de solo) causou redução de 69,5% no número de galhas e incrementou o peso seco de raiz em 60,9%.

Aplicado via solo, *S. cerevisiae* reduziu a população de *M. javanica*, aumentou o crescimento de plantas de pepino, aumentando a produção de frutos, além de aumentar os teores de fenóis totais nas raízes. Visto isso foi sugerida a capacidade da levedura em induzir resistência na planta (KARAJEH, 2013).

### **1.3.3 *Trichoderma* spp.**

Entre os agentes do controle biológico de nematoides, os fungos têm se destacado como os mais promissores, despertando o interesse na comunidade científica em vários países (KRZYZANOWSKI, 2006). Estudos recentes têm mostrado que espécies do fungo *Trichoderma* são capazes de infectar ovos de nematoides e juvenis (FREITAS *et al.*, 2012; SAHEBANI; HADAVI, 2008).

*Trichoderma* sp. são fungos, que se reproduzem assexuadamente, presentes com mais frequência em solos de regiões de clima temperado e tropical. Algumas linhagens de *Trichoderma* sp. são utilizadas no controle de fitopatógenos e na promoção de crescimento vegetal. Essa característica permitiu para que fosse um dos fungos mais

pesquisados no Brasil em condições de laboratório e em casa de vegetação (MACHADO *et al.*, 2012).

O controle biológico de nematoídeos por *Trichoderma* sp. ocorre pela atuação direta do fungo sobre o patógeno parasitando ovos e juvenis, pela promoção de crescimento de plantas, e indução dos mecanismos de defesa do hospedeiro com aumento de enzimas extracelulares, tais como quitinases e proteases (FREITAS *et al.*, 2012; SAHEBANI; HADAVI, 2008). O crescimento de plantas é devido ao controle de micro-organismos maléficos da rizosfera, produção de hormônios de crescimento, maior eficiência no uso de alguns nutrientes, e aumento da disponibilidade e absorção de nutrientes pela planta (FERREIRA *et al.*, 2008).

Utilizando um formulado a base de *Trichoderma* spp. aplicado via solo, no momento da semeadura do feijoeiro, Matsumura *et al.* (2009) verificaram redução no número de galhas de *Meloidogyne* spp., de aproximadamente 35,8%. Em estudo semelhante com a mesma cultura, o fungo proporcionou redução de 41% do fator de reprodução de *M. incognita* com aplicação de suspensão via solo na concentração  $1 \times 10^4$  esporos.mL<sup>-1</sup> (BORGES *et al.*, 2013).

*Trichoderma harzianum* apresentou potencial antagonístico no controle de *M. javanica*. Diferentes concentrações de esporos do fungo ( $10^3$  a  $10^9$  esporos.mL<sup>-1</sup>) diminuíram o número de galhas e ovos do nematoide em raízes de tomateiro (SAHEBANI; HADAVI, 2008). *In vitro*, os mesmos autores, observaram a capacidade do fungo em reduzir a produção de ovos e causar mortalidade, diminuindo o nível de eclosão em 20%. Atividades das enzimas peroxidase (POX), polifenol oxidase (PPO), fenilalanina amônia liase (PAL) e quitinase aumentaram com aplicação em *T. harzianum*, sugerindo como um de seus mecanismos de supressão contra nematoídeos, a indução de resistência sistêmica na planta.

#### **1.3.4 Uso combinado de micro-organismos**

Para aumentar a eficiência do controle biológico de doenças, uma das estratégias utilizadas, atualmente, é a combinação de micro-organismos (SOUZA JUNIOR *et al.*, 2010). Ao combinar micro-organismos, mais de um mecanismo de controle biológico vai ser funcional nas condições enfrentadas pelos agentes do biocontrole, resultando em um nível mais elevado de proteção (BOER *et al.*, 2003).

Vários trabalhos (ANASTASIADIS *et al.*, 2008; MAKETON *et al.*, 2008; TALAVERA *et al.*, 2002) relatam níveis de controle superiores com a combinação de micro-organismos no controle de várias doenças devido à combinação de diferentes modos de ação.

Maketon e colaboradores (2008) verificaram na cultura do fumo que a combinação entre *B. subtilis* e *T. harzianum* aumentou o nível de controle da murcha bacteriana (*Ralstonia solanacearum* Smith), do tombamento de plântulas (*Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp.) e da cercosporiose (*Cercospora nicotianae* Ellis & Everhart).

Talavera *et al.*, (2002), observaram que a combinação do fungo micorrízico *Glomus sp.* Tul & C. Tul e da bactéria *Pasteuria penetrans* (Thorne) Sayre & Starr reduziu a população de juvenis de *M. incognita* na cultura do tomate e conferiu maiores benefícios com incrementos no crescimento das plantas e na produção de frutos. Resultados semelhantes foram encontrados por Anastasiadis *et al.* (2008), observando que o uso combinado de *Bacillus firmus* Werner e *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samson proporcionou a maior redução no número de ovos nas raízes de tomateiro infestadas com *Meloidogyne* spp.

### 1.3.5 Compatibilidade de micro-organismos com agroquímicos

Os produtos de controle biológico contêm micro-organismos vivos, que apresentam sensibilidade não apenas a condições ambientais desfavoráveis como também a produtos químicos (MEDEIROS, 2011). Várias são as substâncias químicas usadas no controle de insetos, doenças e que podem reduzir o potencial de biocontrole (ALVES *et al.*, 1998).

Muitos agentes de controle biológico são fungos e, portanto, podem ser sensíveis a fungicidas (MEDEIROS, 2011). Esses produtos podem influenciar no crescimento vegetativo, na viabilidade e na esporulação, ou até mesmo a composição genética pode ser modificada (ALVES *et al.*, 1998). Alterações no pH da calda ou solo, também, podem interferir na eficiência de produtos biológicos. Muitas bactérias tem crescimento inibido quando o pH é menor que 5,5. Sendo assim, empresas que produzem os produtos biológicos devem fornecer informações de compatibilidade de seus produtos com a maioria dos defensivos agrícolas usados (MEDEIROS, 2011).

Sendo assim, o uso combinado de agentes de controle biológico com pesticidas químicos, para obter efeitos sinergísticos ou aditivos contra o organismo alvo, é uma linha de estudo que tem despertado atenção (MELO *et al.*, 2008). Durante a seleção de micro-organismos antagônicos a fitopatógenos, os ensaios *in vitro* e *in vivo* são fundamentais, visto que a ação antagonística depende de diversos fatores bióticos e abióticos (BETTIOL, 1991). Sob esse aspecto, considera-se importante encontrar aditivos que não causem efeitos tóxicos ao agente de biocontrole e que promovam melhorias em uma ou mais características essenciais, para o estabelecimento da interação antagonista (FRAVEL *et al.*, 1998).

Medeiros *et al.* (2010) ao controlarem a vassoura de bruxa causada por *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime & Phillips-Mora na cultura do cacau, com utilização de *Trichoderma stromaticum* Trichovab e hidróxido de cobre, demonstraram que mesmo quando o produto não é compatível com o micro-organismo biocontrolador, a separação temporal entre a aplicação do produto biológico e o produto químico pode viabilizar a ação sinergística de ambos os produtos.

#### **1.4 INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA DE PLANTAS**

As plantas são potenciais hospedeiros para diversos grupos de agentes patogênicos, incluindo fungos, vírus, bactérias e nematoides. As plantas são capazes de formar uma defesa contra a infecção não só local, mas também, sistemicamente. De fato, a infecção é a exceção e não a regra. As células vegetais são geralmente protegidas por várias camadas de barreiras físicas, incluindo a cutícula cerosa na superfície da folha, a parede celular, e membrana plasmática, que negam o acesso à maioria dos micro-organismos. As plantas, também, podem produzir uma grande variedade de produtos químicos para formar uma barreira química contra micro-organismos e parasitas (FU; DONG, 2013), a chamada indução de resistência.

Indução de resistência é definida como o aumento da capacidade da defesa das plantas contra patógenos, adquirida após a ativação de mecanismos de resistência por diversos agentes, como ativadores químicos (KUNZ *et al.*, 1997) ou micro-organismos vivos (FABRY, 2006).

O processo de sinalização desenvolvido pelas células vegetais para perceber e responder aos estímulos é dividida em três etapas básicas: a percepção do sinal, ou

reconhecimento; a transdução do sinal e a tradução do sinal, que consiste na conversão do sinal em respostas celulares específicas, como por exemplo, a ativação de genes que induzem a síntese de proteínas relacionadas à patogênese (proteínas-PR) e de certas enzimas regulatórias do processo de produção de fitoalexinas, resultando na indução de resistência na planta (RESENDE *et al.*, 2006).

A percepção do sinal, no caso específico da interação gene-a-gene, é realizada por receptores celulares específicos ou inespecíficos (produtos de genes R da planta), que reconhecem um determinado sinal (produtos de genes Avr do patógeno). Já no caso da resistência não específica a raças do patógeno, receptores com alta afinidade para ligação, localizados na membrana plasmática da célula vegetal, são responsáveis pela percepção de sinais externos. A transdução do sinal consiste na transmissão do mesmo para seu sítio de ação dentro da célula, podendo ser feita de forma direta ou indireta (via mensageiros secundários, alterações na fosforilação de proteínas e através de proteínas-G) (RESENDE *et al.*, 2006).

Bioquimicamente, o processo de indução de resistência pode ser resumido após o reconhecimento dos eliciadores (substâncias que induzem reações de defesa nas plantas) pelos receptores da planta: abertura de canais de íons → acidificação do citoplasma → ativação de quinases no citoplasma → ativação do complexo NADPH-oxidase → produção de espécies ativas de oxigênio → ativação de outros mensageiros secundários (ácido salicílico, ácido jasmônico e etileno) → ativação de fatores de transcrição → transcrição de genes de defesa (proteínas-PR, enzimas de fitoalexinas, lignificação de tecidos, calose e outros reforços da parede celular) → resistência local (reação de hipersensibilidade) e, subsequentemente, ‘imunidade’ sistêmica (resistência sistêmica adquirida ou resistência sistêmica induzida) (GRANT; LAMB, 2006; RESENDE *et al.*, 2006).

Duas siglas têm sido usadas frequentemente como sinônimos para designar o fenômeno de indução de resistência a doenças de plantas: ISR (Induce Systemic Resistance) e SAR (Systemic Acquired Resistance). As rotas metabólicas que levam a resistência sistêmica adquirida (SAR) e a resistência sistêmica induzida (ISR) são distintas (FABRY *et al.*, 2007), porém, fenotipicamente parecidas, pois as plantas após o contato com o indutor têm seus mecanismos de defesa ativados tanto no sítio de indução, como em locais distantes dele, ocorrendo de forma mais ou menos generalizada (STICHER *et al.*, 1997). Tais fenômenos são diferenciados através do

acúmulo de proteínas relacionadas à patogênese (proteínas RP), das rotas de sinalização, de alterações visuais na planta, eliciadores e a amplitude da indução que os leva a expressão das defesas (INÁCIO, 2011).

#### **1.4.1 Resistência Sistêmica Adquirida (SAR)**

De acordo com Tiryaki e Tunaz (2004), a Resistência Sistêmica Adquirida (SAR) ocorre após a infecção por um agente patogênico na célula hospedeira que dispara um sinal a ser emitido em toda a planta. Este sinal desencadeia a ativação dos genes de defesa em tecidos não infectados, e resulta na maior resistência da planta à infecção subsequente por uma gama de agentes patogênicos.

Para que ocorra a SAR, a infecção inicial precisa resultar na formação de lesões necróticas, decorrentes da reação de hipersensibilidade (acúmulo de peróxido de hidrogênio) ou como sintoma da doença. A resistência é inicialmente localizada na região de infecção, na tentativa de impedir e/ou retardar a penetração do patógeno. Posteriormente, esta resistência passa a ocorrer em locais da planta distantes do local da infecção pelo patógeno, ou do local de aplicação dos agentes eliciadores abióticos, mas amplitude da indução é parcial (INÁCIO, 2011).

O mecanismo da SAR envolve o acúmulo de proteínas relacionadas à patogênese (PRP), como, por exemplo, quitinases, glucanases, lisozimas, peroxidases e as osmotinas (BOAVA *et al.*, 2010). Sua rota de sinalização caracteriza-se pelo acúmulo de ácido salicílico (AS), além da formação de barreiras estruturais, como a lignina. A participação de compostos, como o óxido nítrico, etileno, ácido jasmônico (JA), também, tem sido sugerida como sinalizadores da SAR (FERNANDES *et al.*, 2009).

O início da SAR está associado com enorme reprogramação transcrecional, que é dependente da transcrição do gene NPR1 (nonexpresser do PR genes 1) e seus fatores de transcrição associados. Acredita-se que é conferida por um aumento de proteínas (PR) antimicrobianas, cuja secreção requer importante reforço do retículo endoplasmático. Apesar de intensa pesquisa, há muitas lacunas no conhecimento da sinalização da via SAR. Não é completamente conhecido como um patógeno avirulento induz a biossíntese do sinal imunológico essencial, tanto a nível local e sistemicamente (FU; DONG, 2013).

A natureza do sinal celular da SAR, também, pode ser induzida por aplicação exógena de ácido salicílico, ou seus análogos sintéticos: Ácido 2,6-dicloroisonicotínico (INA) e benzotiadiazole Éster S-metilo (HL). A SAR confere "memória" imunológica, que podem durar semanas, e até mesmo em toda a fase de crescimento da planta (FU; DONG, 2013).

#### **1.4.2 Resistência Sistêmica Induzida (ISR)**

A Resistência Sistêmica Induzida (ISR) é definida como aquela que acontece quando plantas após a exposição a um indutor como os agentes bióticos (micro-organismos não patogênicos) ou abióticos (fatores químicos), são induzidas à defesa contra o patógeno (ARAUJU; MENEZES, 2009).

A ISR foi primeiramente relatada por Van-Peer e Schippers (1992). Os autores verificaram redução da fusariose causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* Schlecht em plantas de cravo com pulverização preventiva de células mortas pelo calor ou lipopolissacarídeos (LPS) purificados da bactéria *Pseudomonas* sp. isolado WCS417r. Houve acumulação de fitoalexinas nos segmentos do caule, constatando que os componentes da superfície das células presentes nos LPS da bactéria foram indutores de resistência.

Em contraste com muitos mecanismos de biocontrole, a extensa colonização da rizosfera não é necessária para ISR, pois um colonizador pobre não age através de antibióticos (LUGTENBERG; KAMILOVA, 2009). Muitos componentes bacterianos individuais induzem ISR, tais como lipopolissacarídeos, flagelos, ácido salicílico e sideróforos (VAN-LOON, 2007). Foi verificado por Gilbert; Handelsman e Parker (1994), que cepas de *B. cereus*, que são pobres colonizadores da rizosfera, são bons agentes de biocontrole. A observação de que certos metabólitos antifúngicos pode induzir ISR também confirma o fenômeno (LUGTENBERG; KAMILOVA, 2009).

A ISR envolve o acúmulo dos reguladores de crescimento, ácido jasmônico (AJ) e etileno (VAN-LOON *et al.*, 1998); a planta não exibe alterações visuais; eliciadores não são patógenos e a amplitude da indução é generalizada (ROMEIRO, 2002).

A semelhança entre ISR e SAR por patógenos é que em ambos os casos os tipos de resistência são efetivas contra amplo espectro de patógenos de plantas (VAN-LOON *et al.*, 1998).

#### **1.4.3 Proteínas relacionadas à patogênese**

Os mecanismos de defesa das plantas contra fitopatógenos envolvem alterações nos metabolismos primário e secundário da planta. Proteínas relacionadas à patogênese (PRP) também estão associadas com a indução de resistência. As PRPs são macromoléculas que se acumulam nas plantas como resposta a infecção por patógenos e como resposta a resistência induzida. Entre as PRPs, as mais estudadas são as quitinases,  $\beta$ -1,3-glucanase e osmotina (VAN- LOON *et al.*, 1994).

A quitina, um polímero de 3-1,4- N-acetyl-glucosamina, é componente estrutural em vários organismos, incluindo fungos, insetos, crustáceos e nematoides. Forma um complexo com várias outras substâncias, tais como polissacarídeos e proteínas. As quitinases têm sido relatadas em várias espécies de plantas e ocorrem em diferentes tecidos, incluindo embriões, sementes, cotilédones, folhas, caules, raízes, flores, zonas de queda das folhas, e protoplastos (PUNJA; ZHANG, 1993).

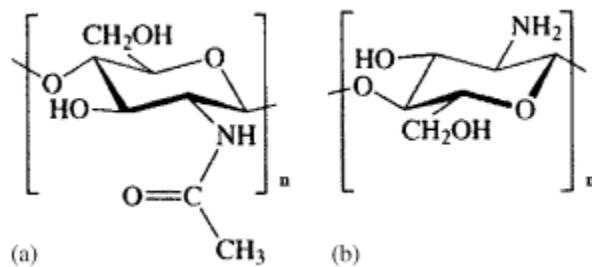
Plantas produzem endoquitinases, constitutivamente ou após a indução, e as possíveis funções destas enzimas dentro da planta têm gerado muito interesse e especulação. Uma das funções atribuídas é um mecanismo de defesa contra o ataque de patógenos, especialmente fungos, porque a expressão de quitinase é significativamente reforçada após a infecção. Em geral, as quitinases são induzidas por numerosos fatores como estresses bióticos e abióticos, e é apenas um componente da resposta da planta aos vários patógenos e estresse. Após a indução, as quitinases podem acumular localmente ou sistemicamente em outros tecidos. Além disso, quitinases podem ser extracelular ou vacuolar (PUNJA; ZHANG, 1993).

#### **1.4.4 Quitina e quitosana**

Os eliciadores no processo de sinalização podem ser classificados, quanto à origem, em bióticos e abióticos, mas, na verdade, essas categorias se sobrepõem à medida que as substâncias de origem biológica vão sendo sintetizadas em laboratório. Os eliciadores abióticos incluem luz UV, íons metálicos e um crescente número de moléculas orgânicas sintetizadas em laboratório (PASCHOLATI; LEITE, 1994), a exemplo da quitosana.

A quitina é um biopolímero linear, natural, insolúvel formado por unidades monoméricas repetidas de  $\beta$ -1,4-N-acetilglucosamina (FIGURA 01) e, com exceção da celulose, é o polissacarídeo mais abundante na natureza, presente como elemento estrutural em animais invertebrados, artrópodes e na parede celular de alguns fungos. A quitosana é um polímero de D-glucosamina, derivada da desacetilação da quitina. O biopolímero passa a ser chamado quitosana quando a porcentagem de grupo acetil ou grau de acetilação é menor que 50%. É encontrada na parede celular de fungos, que podem apresentar até 50% deste na sua estrutura, sendo um polissacarídeo solúvel (BERGER *et al.*, 2011; FRANCO *et al.*, 2005; MORAES *et al.*, 2011).

**FIGURA 01.** (a) Estrutura química da quitina ( $\beta$ -1,4-N-acetilglucosamina) e (b) da quitosana (D-glucosamina). Fonte: RINAUDO, 2006.



As fontes de quitina e quitosana mais exploradas a nível comercial têm sido a carapaça de caranguejos e cascas de camarão, oriundas de resíduos da indústria pesqueira (RINAUDO, 2006). Entretanto, sua obtenção a partir da biomassa micelial de fungos da ordem *Mucorales*, pode ser uma alternativa, uma vez que é um processo fácil e economicamente viável (BERGER *et al.*, 2011).

Quitina e a quitosana apresentam ampla aplicabilidade em diversas áreas devido a sua fácil obtenção e propriedades como biocompatibilidade e biodegradabilidade (AZEVEDO *et al.*, 2007). A quitina, tanto na sua forma pura, de seus derivados, ou como parte da composição de substâncias orgânicas, como a casca de caranguejo, ou ainda como componente de compostos orgânicos, tem sido testada na agricultura para diversos fins (BENCHIMOL *et al.*, 2006).

Segundo Berger *et al.* (2011), a quitosana tem sido aplicada para favorecer o crescimento vegetal e para proteger a planta contra o ataque de patógenos por ativar a defesa no tecido vegetal ocasionando: lignificação, indução de síntese de calose, elicição da produção de fitoalexinas e de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), acúmulo de

quitinase, síntese de inibidores de proteinase e induzir a atividade da fenil-alanina amônia liase (FAL). Além disso, podem induzir mudanças morfológicas, alterações estruturais e desorganização molecular em fungos (BERGER *et al.*, 2011). A adição de quitina ao solo leva ao aumento da população de micro-organismos quitinolíticos e à supressão de fungos e fitonematoïdes presentes no solo (CASTRO *et al.*, 2011).

Castro *et al.* (2011) estudaram vermicomposto de esterco bovino enriquecimento com quitina em solo infestado com *M. incognita*, e verificaram redução significativa no fator de reprodução do nematoide na cultura do tomate quando comparado com a testemunha sem aplicação, além de aumentar a população de fungos, bactérias e actinomicetos do solo. Quinze dias antes do plantio de mudas de tomateiro e da infestação com *M. incognita*, Ladner *et al.* (2008) adicionaram quitina no solo e observaram o aumento da massa seca das plantas. Com 100 e 200g de quitina em 150 cm<sup>3</sup> de solo, o número de galhas e ovos do nematoide foi significativamente reduzido. Os autores inferiram que o efeito nematicida de quitina pode ser parcialmente devido à toxicidade do nematoide e, em parte devido ao estímulo de fungos com propriedades quitinolíticas que manipulam as populações da microflora e reduzem as populações de nematoides no solo.

Avaliando o efeito de quitosana na expressão da resistência do tomateiro a *M. incognita*, aplicados 5, 10 e 15 dias antes da inoculação do patógeno através da pulverização foliar, Melo e colaboradores (2012) observaram redução no número de ovos e fator de reprodução do patógeno em todas as épocas de aplicação. Os autores atribuíram que o modo de ação da quitosana enquanto um indutor de resistência envolve o estímulo para a biossíntese de lignina e lignificação da parede celular, produção de quitinases e glucanases, além da síntese de moléculas envolvidas nos caminhos de sinalização intracelular que conduzem à ativação de outras respostas de defesa.

Dentro desse contexto, o objetivo geral desse trabalho foi avaliar a eficácia de micro-organismos, quitina e quitosana no manejo de nematoides das galhas na cultura do tomateiro. Para tanto, objetivos específicos foram estabelecidos:

- a) Avaliar a eficácia do produto comercial LMXBIO à base de *B. subtilis*, *B. thuringiensis*, *Rhizobium* sp., *S. cerevisiae* e *Trichoderma* spp. e de cada micro-organismo de forma isolada no controle dos nematoides das galhas *M. incognita* e *M. javanica* e no desenvolvimento do tomateiro;

- b) Avaliar a sensibilidade dos micro-organismos *B. subtilis*, *B. thuringiensis*, *Rhizobium* sp., *S. cerevisiae* e *Trichoderma* sp. a agroquímicos;
- c) Avaliar a eficácia dos produtos comerciais HYT-C (quitina) e HYT-D (quitosana) no controle dos nematoides das galhas *M. incognita* e *M. javanica* e no desenvolvimento do tomateiro;
- d) Avaliar o efeito dos produtos comerciais HYT-C (quitina) e HYT-D (quitosana) na população de micro-organismos quitinolíticos do solo;
- e) Avaliar o efeito dos produtos comerciais HYT-C (quitina) e HYT-D (quitosana) na atividade da enzima quitinase das folhas do tomateiro.

## REFERÊNCIAS

ABAD, P.; FAVERY, B.; ROSSO, M.N.; CASTAGNONE-SERENO, P. Root-knot nematode parasitism and host response: molecular basis of a sophisticated interaction.

**Molecular Plant Pathology**, Londres, v. 4, p. 217–224, 2003. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20569382>>. Acesso em: 05 dez. 2014.

**AGRINOS:** innovadores por natureza. HYT-C: Bio quitina. Disponível em:  
<<http://www.agrinos.com.mx/reporteco/upload/procesos/HYTc%20BioQuitina.pdf>>. Acesso em: 29 out. 2014.

AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. Ed. Burlington, MA – USA: Elsevier Acad. 5 ed., 2005, 922 p.

AHMAD, F.; AHMAD, I.; KHAN, M.S. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. **Microbiological Research**, Jena, v. 163, n. 2, p. 173-181, 2008. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16735107>>. Acesso em: 02 nov. 2014.

ALVES, S.B.; MOINO JUNIOR, A.; ALMEIDA, J.E.M. Produtos fitossanitários e entomopatógenos. In: ALVES, S.B. (Coord.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2. ed., 1998, cap. 8, p.217-238.

ANASTASIADIS, I.A.; GIANNAKOU, I.O.; PROPHETOU-ATHANASIADOU, D.A.; GOWEN, S.R. The combined effect of the application of a biocontrol agent *Paecilomyces lilacinus*, with various practices for the control of root-knot nematodes. **Crop Protection**, Kidlington, v. 27, n. 3-5, p. 352-361, 2008. Disponível em:  
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0261219407001676>>. Acesso em: 10 nov. 2014.

ÂNGELO, E.A.; VILAS-BOAS, G.T.; CASTRO-DOMEZ, R.J.H. *Bacillus thuringiensis*: características gerais e fermentação. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 4, p. 945-958, 2010. Disponível em:  
<<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/viewFile/7599/6690>>. Acesso em: 18 nov. 2014.

ANTUNES, J.E.L. **Diversidade genética e eficiência simbiótica de isolados de rizobios nativos em feijão-fava (*Phaseolus lanutus* L.)**. 2010. 108 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia)- Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2010. Disponível em: <<http://www.ufpi.br/subsiteFiles/ppga/arquivos/files/dissertacao%20jadson.pdf>>. Acesso em: 29 out. 2014.

ARAÚJO, F. F. Inoculação de sementes com *Bacillus subtilis*, formulado com farinha de ostra e desenvolvimento de milho, soja e algodão. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 2, p. 456-462, 2008. Disponível em:  
<[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1413-70542008000200017&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1413-70542008000200017&script=sci_arttext)>. Acesso em: 27 out. 2014.

ARAÚJO, F.F., MARCHESI, G.V.P. Uso de *Bacillus subtilis* no controle da meloidoginose e na promoção do crescimento do tomateiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.5, p.1558-1561, 2009. Disponível em:  
<[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-84782009000500039&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-84782009000500039&script=sci_arttext)>. Acesso em: 27 out. 2014.

ARAÚJO, F.F.; MENEZES, D. Indução de resistência a doenças foliares em tomateiro por indutores biótico (*Bacillus subtilis*) e abiótico (Acibenzolar-S-Metil). **Summa phytopathologica**, Botucatu, v. 35, n. 3, p. 169-172, 2009. Disponível em:  
<<http://www.scielo.br/pdf/sp/v35n3/a01v35n3.pdf>>. Acesso em: 03 nov. 2014.

ARAÚJO, F.F.; SILVA, J.F.V.; ARAÚJO, A.S.F. Influência de *Bacillus subtilis* na eclosão, orientação e infecção de *Heterodera glycines* em soja. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, n.2, p.197-202, 2002. Disponível em:  
<[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84782002000200003](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782002000200003)>. Acesso em: 27 out. 2014.

AZEVEDO, V. V. C.; CHAVES, S. A.; BEZERRA D. C.; LIA FOOK, M. V.; COSTA, A. C. F. Quitina e quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, Campina Grande, v. 2, n. 3, p. 27-34, 2007. Disponível em:  
<<http://cct.ufcg.edu.br/revista/index.php/REMAP/article/view/46/81>>. Acesso em: 06 nov. 2014.

BARKER, K.R.; KOENNING, S.R. Developing sustainable systems for nematode management. **Annual Review of Phytopathology**, Gainesville, v. 36, p. 165-205, 1998. Disponível em:  
<<http://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.phyto.36.1.165>>. Acesso em: 10 nov. 2014.

BENCHIMOL, R.L.; SUTTON, J. C.; DIAS FILHO, M. B. Potencialidade da casca de caranguejo na redução da incidência de fusariose e na promoção do crescimento de mudas de pimenteira-do-reino. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 2 p. 180-184, 2006. Disponível em  
<[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-41582006000200009](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-41582006000200009)>. Acesso em: 03 nov. 2014.

BERGER, L.R.R.; STAMFORD, T.C.H.M., STAMFORD, N.P. Perspectivas para o uso da quitosana na agricultura. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, País Vasco, v. 12, n. 4, 2011. Disponível em: <<http://www.ehu.es/reviberpol/pdf/AGO11/ramos.pdf>>. Acesso em: 06 nov. 2014.

BETTIOL, W. Seleção de microrganismos antagônicos a fitopatógenos. In: BETTIOL, W. (Coord.). **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: Embrapa-CNPDA, 1991, p. 35-56.

BOAVA, L.P.; KUHN, O.J.; PASCHOLATI, S.F.; DI PIERO, R.M.; FURTADO, E.L. Efeito de indutores bióticos e abióticos na atividade de quitinase e peroxidase e no controle da ferrugem causada por *Puccinia psidii* em eucalipto. **Summa phytopathologica**, Botucatu, v. 36, n. 2, 2010. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-54052010000200012&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-54052010000200012&script=sci_arttext)>. Acesso em: 16 dez. 2014.

BOER, M.; BOM, P.; KINDT, F.; KEURENTJES, J.J.B.; SLUIS, I.; LOON, L.C.; BAKKER, P.A.H.M. Control of *Fusarium* wilt of radish by combining *Pseudomonas putida* strains that have different disease-suppressive mechanisms. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 93, n. 5, p. 626-632, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18942986>>. Acesso em: 31 out. 2014.

BORGES, F.G.; BATTISTUS, A.G.; MULLER, M.A.; MORANZA, T.M.; KUHN, O.J. Manejo alternativo de nematoides de galha (*Meloidogyne incognita*) em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*). **Scientia Agraria Paranaensis**, Marechal Cândido Rondon, v. 12, p. 425-433, 2013, suplemento. Disponível em: <<http://e-revista.unioeste.br/index.php/scientiaagraria/article/view/9573>>. Acesso em: 09 dez. 2014.

BRAVO, A.; GILLB, S. S.; SOBERON, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, Cuernavaca, v. 49, n. 4, p. 423-435, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17198720>>. Acesso em: 28 out. 2014.

CABIB, E.; ROBERTS, R.; BOWERS, B. Synthesis of the yeast cell wall and its regulation. **Annual Review Biochemistry**, Palo Alto, v. 51, n. 763-793, 1982. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.bi.51.070182.003555>>. Acesso em: 14 nov. 2014.

CAPRONI, C.M.; FERREIRA, S.; GONÇALVES, E.D.; SOUZA, A.G. Resposta às aplicações de *Trichoderma*, óleo de Nim e Vertimec no controle de nematoide na cultura do morango. **Revista Agrogeoambiental**, Pouso Alegre, v. 4, n. 3, p. 1-9, 2012. Disponível em: <<http://agrogeoambiental.ifsuldeminas.edu.br/index.php/Agrogeoambiental/article/viewFile/473/443>>. Acesso em: 24 mai. 2014.

CARNEIRO, R.M.D.G.; CARNEIRO, R.G.; NEVES, D.I.; ALMEIDA, M.R.A. Nova raça de *Meloidogyne javanica* detectada em *Arachis pintoi* no estado do Paraná. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 27, n. 2, p. 219-221, 2003. Disponível em: <<http://docentes.esalq.usp.br/sbn/nbonline/ol%20272/219-221%20pb.pdf>>. Acesso em: 27 out. 2014.

CASTRO, L.; FLORES, L. URIBE, L. Efecto del vermicompost y quitina sobre el control de *Meloidogyne incognita* en tomate a nível de invernadero. **Agronomía Costarricense**, San Pedro de Montes de Oca, v. 35, n. 2, p. 21-32, 2011. Disponível em: <[http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S0377-94242011000200002&script=sci\\_arttext&tlang=pt](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S0377-94242011000200002&script=sci_arttext&tlang=pt)>. Acesso em: 27 out. 2014.

CHARCHAR, J.M. *Meloidogyne* em hortaliças. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE NEMATOLOGIA TROPICAL; CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEMATOLOGIA, 19., 1995; ENCONTRO ANUAL DA ORGANIZAÇÃO DOS NEMATOLOGISTAS DA AMÉRICA TROPICAL, 27., 1995, Rio Quente - GO. Anais... Rio Quente: SBN/ONTA, 1995, p.149-153.

CHARCHAR, J.M.; GIORDIANO, L.B.; GONZAGA, V.; REIS, N.V.B. **Perda de produtividade de tomateiro por infecção de população mista de *Meloidogyne incognita* raça 1 e *M. javanica*.** Brasília: Embrapa-CNPH, 1998. (Embrapa-CNPH. Circular técnica, 12). Disponível em: <<http://www.cnph.embrapa.br/pa/pa12.html>>. Acesso em: 27 out. 2014.

CHEN, J.; ABAWI, G.S.; ZUCKERMAN, B.M. Efficacy of *Bacillus thuringiensis*, *Paecilomyces marquandii*, and *Streptomyces costaricanus* with and without organic amendments against *Meloidogyne hapla* infecting lettuce. **Journal of Nematology**, Lakeland, v. 32, n. 1, p. 70–77, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2620431/>>. Acesso em: 17 abr. 2014.

CHEN, H.; CHENA, F.; CHIU, F.C.; LO, C.M. The effect of yeast elicitor on the growth and secondary metabolism of hairy root cultures of *Salvia miltiorrhiza*. **Enzima and Microbial Technology**, New York, v. 28, n. 1, p. 100-105, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11118603>>. Acesso em: 12 out. 2014.

COIMBRA, J.L.; CAMPOS, V.P. Efeito de exsudatos de colônias e de filtrados de culturas de actinomicetos na eclosão, motilidade e mortalidade de juvenis do segundo estádio de *Meloidogyne javanica*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n.3, p.232-238, 2005. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-41582005000300003&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-41582005000300003&script=sci_arttext)>. Acesso em: 20 out. 2014.

DAWAR, S.; TARIQ, M.; ZAKI, M.J. Application of *Bacillus* species in control of *Meloidogyne javanica* (Treub) chitwood on cowpea and mash bean. **Pakistan Journal of Botany**, Karachi, v. 40, n.1, p. 439-444, 2008. Disponível em: <[http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/40\(1\)/PJB40\(1\)439.pdf](http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/40(1)/PJB40(1)439.pdf)>. Acesso em: 28 out. 2014.

DI PIERO, R.M.; GARDA, M.V. Quitosana reduz a severidade da antracnose e aumenta a atividade de glucanase em feijoeiro-comum. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 9, p. 1121-1128, 2008. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-204X2008000900004&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-204X2008000900004&script=sci_arttext)>. Acesso em: 27 out. 2014.

EISENBACK, J.D.; HIRSCHMANN, H.; SASSER, J.N.; TRIANTAPHYLLOU, A.C. **A guide to the four most common species of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.), with a pictorial key.** Departments of Plant Pathology and Genetics North Carolina State University and The United States Agency for International Development Raleigh, North Carolina, 1981, 48p. Disponível em: <[http://pdf.usaid.gov/pdf\\_docs/pnaaq221.pdf](http://pdf.usaid.gov/pdf_docs/pnaaq221.pdf)>. Acesso em: 11 nov. 2014.

EISENBACK, J.D.; TRIANTAPHYLLOU, H.H. Root-knot Nematodes: *Meloidogyne* species and races. In: NICKLE, W. R. (Coord.). **Manual of Agricultural Nematology**, Marcel Dekker, New York, p. 281 – 286, 1991.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA- EMBRAPA. **Cultivo de tomate para industrialização**. Sistema de produção, Embrapa Hortaliças, 1-2 ed., 2006. Disponível em: <[http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Tomate/TomateIndustrial\\_2ed/](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Tomate/TomateIndustrial_2ed/)>. Acesso em: 27 out. 2014.

FABRY, C.F.S. **Indução de resistência ao nematoide das galhas (*Meloidogyne* spp.) em tomateiro por rizobactérias**. 2006. 63 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2006. Disponível em: <[http://www.tede.ufv.br/tedesimplificado/tde\\_arquivos/15/TDE-2007-10-10T123730Z-809/Publico/texto%20completo.pdf](http://www.tede.ufv.br/tedesimplificado/tde_arquivos/15/TDE-2007-10-10T123730Z-809/Publico/texto%20completo.pdf)>. Acesso em: 18 abr. 2014.

FABRY, C.F.S.; FREITAS, L.G.; GODINHO, M.T.; NEVES, W.S.; FERRAZ, S. Resistência sistêmica a *Meloidogyne javanica* induzida por *Rhizobium etli*. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 31, n. 2, p. 5-9, 2007. Disponível em: <<http://docentes.esalq.usp.br/sbn/nbonline/ol%20312/88-92%20pb.pdf>>. Acesso em: 18 abr. 2014.

FERNANDES, C.F.; VIEIRA JUNIOR, J.R.; SILVA, D.S.G.; REIS, N.D.; ANTUNES JUNIOR, H. **Mecanismos de defesa de plantas contra o ataque de agentes fitopatogênicos**. Embrapa Rondônia, Porto Velho, 2009. 14 p. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CPAF-RO-2010/14553/1/133-fitopatogenos.pdf>>. Acesso em: 15 nov. 2014.

FERRAZ, S., FREITAS, L. G., LOPES, E.A., DIAS-ARIEIRA, C.R. **Manejo sustentável de fitonematoídes**. Viçosa - MG, Ed. UFV, 2010, 306 p.

FERREIRA, P.A.; FERRAZ, S.; LOPES, E.A.; FREITAS, L.G. Parasitismo de ovos de *Meloidogyne exigua* por fungos nematófagos e estudo da compatibilidade entre os isolados fúngicos. **Revista Trópica**, Chapadinha, v. 2, n. 3, p. 15-21, 2008. Disponível em: <[http://www.ccaa.ufma.br/revistatropica/artigos\\_vol2\\_nr3/para\\_ovos\\_agro\\_art.pdf](http://www.ccaa.ufma.br/revistatropica/artigos_vol2_nr3/para_ovos_agro_art.pdf)>. Acesso em: 30 out. 2014.

FIALHO, M.B.; BESSI, R.; INOMOTO, M.M.; PASCHOLATI, S.F. Nematicidal effect of volatile organic compounds (VOCs) on the plant-parasitic nematode *Meloidogyne javanica*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 38, n. 2, p. 152-154, 2012. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-54052012000200008](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-54052012000200008)>. Acesso em: 29 out. 2014.

FILGUEIRA, F.A.R. **Novo Manual de Olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. Viçosa- MG: Ed. UFV, 2000, 402 p.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS- FAOSTAT. **Statistic of agricultural production**. 2013. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/>>. Acesso em: 14 set. 2014.

FRANCO, L.O.; STAMFORD, T.C.M.; STAMFORD, N.P.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. *Cunninghamella elegans* (IFM 46109) como fonte de quitina e quitosana. **Revista Analytica**, São Paulo, n. 14, p. 40-44, 2005. Disponível em: <[http://www.researchgate.net/publication/237484283\\_Cunningamella\\_elegans\\_%28IF\\_M\\_46109%29\\_COMO\\_FONTE\\_DE\\_QUITINA\\_E\\_QUITOSANA](http://www.researchgate.net/publication/237484283_Cunningamella_elegans_%28IF_M_46109%29_COMO_FONTE_DE_QUITINA_E_QUITOSANA)>. Acesso em: 06 nov. 2014.

FRAVEL, D.R.; CONNICK, W.J.; LEWIS, J.A. Formulation of microorganism to control plant diseases. In: BURGES, H.D. (Coord.). **Formulation of microbial biopesticides: beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, Boston, 1998, p.187-202.

FREITAS, L.G. Rizobacterias *versus* nematoides. In: REUNIÃO DE CONTROLE BIOLÓGICO DE FITOPATÓGENOS, 7., 2001. **Anais...** Bento Gonçalves: EMBRAPA Uva e Vinho, p. 25-35. 2001.

FREITAS, M.A.; PEDROSA, E.M.R.; MARIANO, R.L.R. MARANHÃO, S.R.V.L. Seleção de *Trichoderma* spp. como potenciais agentes de biocontrole de *Meloidogyne incognita* em cana-de-açúcar. **Nematropica**, Flórida, v. 42, n. 1, p. 115-122, 2012. Disponível em: <<http://journals.fcla.edu/nematropica/article/view/79590>>. Acesso em: 24 mai. 2014.

FU, Z.Q.; DONG, X. Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. **Annual Review of Plant Biology**, Los Angeles, v. 64, p. 839-863, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23373699>>. Acesso em: 15 nov. 2014.

GARRITY, G.M.; HOLT, J.G. The road map to the manual. In: GARRITY, G.M.; BOONE, D.R.; CASTENHOLZ, R.W. (Coords.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. New York: Springer-Verlag, 9 ed., v.1, 2001, p.119-154.

GILBERT, G.S.; HANDELSMAN, J.; PARKER, J.L. Root camouflage and disease control. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 84, n. 3, p. 222-225, 1994. Disponível em: <<http://handelsmanlab.sites.yale.edu/sites/default/files/RootCamouflageandDiseaseControl1994.pdf>>. Acesso em: 09 dez. 2014.

GOMES, C.B.; COFCEWICZ, E.T. **Nematoides fitoparasitas do morango**. Embrapa Clima Temperado: Sistema de produção do morango. Circular Técnica, 5. 2005. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Morango/SistemaProducaoMorango/cap08.htm>>. Acesso em: 29 out. 2014.

GRANT, M.; LAMB, C. Systemic immunity. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 9, n. 4, p. 414-20, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369526606000872>>. Acesso em 16 dez. 2014.

GUIMARÃES, T. M. **Multiplicação do nematoide *Meloidogyne javanica* em plantas invasoras e seu efeito sobre o desenvolvimento do manjericão**. 2012. 78 f.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade de Brasília, Brasília. 2012.  
Disponível em:  
<[http://repositorio.unb.br/bitstream/10482/12831/1/2012\\_ThassyamenezesGuimaraes.pdf](http://repositorio.unb.br/bitstream/10482/12831/1/2012_ThassyamenezesGuimaraes.pdf)>. Acesso em: 27 out. 2014.

HARTMAN, K.M.; SASSER, J.N. Identification of *Meloidogyne* species on the differential host test and perineal pattern morphology. In: CARTER, C.C; SASSER, J.N. (Coords.). **An advanced treatise on Meloidogyne**. Methodology Raleigh: North Carolina State University Graphics, v. 1, p. 69-77, 1985.

HASKY-GUNTHER, K.; HOFMANN-HERGARTEN, S.; SIKORA, R.A. Resistance against the potato cyst nematode *Globodera pallida* systematically induced by the rhizobacteria *Agrobacterium radiobacter* (G12) and *Bacillus sphaericus* (B43). **Fundamental and Applied Nematology**, Montrouge, v. 21, n. 5, p. 511-517, 1998.  
Disponível em: <[http://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins\\_textes/fan/010017634.pdf](http://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/fan/010017634.pdf)>. Acesso em: 29 out. 2014.

INÁCIO, S.V. **Respostas da cultura do tomateiro a diferentes frequências de aplicação de Acibenzolar-S-Metil e quitosana**. 2011. 49f. Monografia (Graduação em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.  
Disponível em:<<https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/121401/294736.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 16 dez. 2014.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA ESTATÍSTICA – IBGE.  
**Levantamento sistemático da produção agrícola**. Rio de Janeiro, v. 26, n.8, 2013, 84 p. Disponível em:  
<[ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao\\_Agricola/Levantamento\\_Sistematico\\_da\\_Producao\\_Agricola\\_\[mensal\]/Fasciculo/2013/lspa\\_201308.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_[mensal]/Fasciculo/2013/lspa_201308.pdf)>. Acesso em: 15 abr. 2014.

JOUZANI, G.S.; SEIFINEJAD, A.; SAEEDIZADEH, A.; NAZARIAN, A.; YOUSEFLOO, M.; SOHEILIVAND, S.; MOUSIVAND, M.; JAHANGIRI, R.; YAZDANI, M.; AMIRI, R.M.; AKBARI, S. Molecular detection of nematicidal crystalliferous *Bacillus thuringiensis* strains of Iran and evaluation of their toxicity on free-living and plant-parasitic nematodes. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 54, n. 10, p. 812-822, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1139/W08-074>>. Acesso em: 28 out. 2014.

KARAJEH, M.R. Efficacy of *Saccharomyces cerevisiae* on controlling the root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*) infection and promoting cucumber growth and yield under laboratory and field conditions. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, Berlin, v. 46, n. 20, p. 2492-2500, 2013. Disponível em:  
<[http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/03235408.2013.799819#.VFDqyLF\\_4Y](http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/03235408.2013.799819#.VFDqyLF_4Y)>. Acesso em: 29 out. 2014.

KAUAR, S. Risk Assessment of Bt transgenic crops. In: SANSINENA, E. (Coord.). *Bacillus thuringiensis* Biotechnology. Springer Science London, New York, cap. 3, 2012, p. 41-85. Disponível em: <[http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-007-3021-2\\_3](http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-007-3021-2_3)>. Acesso em 15 dez. 2014.

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**, Bangalore, v. 21, n. 2, p. 211-215, 2007. Disponível em: <<http://journalofbiologicalcontrol.com/index.php/jbc/article/view/40205>>. Acesso em: 29 out. 2014.

KHAN, M.Q.; WASSEM, M.A.; ZAKI, M.J.; KHAN, S.A. Evaluation of *Bacillus thuringiensis* isolates against root-knot nematodes following seed application in okra and mungbean. **Pakistan Journal of Botany**, Karachi, v. 42, n. 4, p. 2903-2910, 2010. Disponível em: <[http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/42\(4\)/PJB42\(4\)2903.pdf](http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/42(4)/PJB42(4)2903.pdf)>. Acesso em: 28 out. 2014.

KHAN, M.R.; KHAN, S.M.; MOHIDDIN, F.A.; ASKARY, T.H. Effect of certain phosphate-solubilizing bacteria on root-knot nematode disease of mungbean. **Development in Plant and Soil Sciences**, Dordrecht, v. 102, p. 341-346, 2007. Disponível em: <[http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-1-4020-5765-6\\_54](http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-1-4020-5765-6_54)>. Acesso em: 03 nov. 2014.

KLOEPER, J.W.; RODRIGUEZ-UBANA, R.; ZEHNDER, G.W.; MURPHY, J.F.; SIKORA, E.; FERNÁNDEZ, C. Plant root-bacterial interactions in biological control of soilborne diseases and potential extension to systemic and foliar diseases. **Australasian Plant Pathology**, Orange v. 28, n. 1, p. 21-26, 1999. Disponível em: <<http://www.bashanfoundation.org/kloepper/kloepersoilborne.pdf>>. Acesso em: 27 out. 2014.

KROSS, R.K.; CAVALCANTI-MATA, M.E.R.M.; BRAGA, E.M. Influência da epiderme do tomate (*Licopersicon esculentum* L.) na transferência de massa durante o tratamento osmótico. **SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS (SLACA)**, 4., 2001. Campinas, **Anais...** Campinas: UNICAMP, 2001.

KRZYNANOWSKI, A.A. **Controle biológico de nematoides de galhas do cafeeiro com fungos nematófagos**. 2006. 60 f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, Câmpus de Jaboticabal. 2006. Disponível em: <<file:///F:/ARTIGOS/KRZYANOWSKI,%202006.pdf>>. 2006. Acesso em: 12 nov. 2014.

KUNZ, W.; SCHURTER, R.; MAETZKE, T. The chemistry of benzothiadiazole plant activators. **Pesticide Science**, Chichester, v. 50, n. 4, p. 275-282, 1997. Disponível em: <[http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1096-9063\(199708\)50:4%3C275::AID-PS593%3E3.0.CO;2-7/pdf](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1096-9063(199708)50:4%3C275::AID-PS593%3E3.0.CO;2-7/pdf)>. Acesso em: 03 nov. 2014.

LABANCA, E.R.G. **Purificação parcial de elicitores presentes em *Saccharomyces cerevisiae*: atividade como indutores de resistência em pepineiro (*Cucumis sativus*) contra *Colletotrichum lagenarium* e da síntese de gliceolinas em soja (*Glycine max*)**. 2002. 118 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002. Disponível em

<[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_nlinks&ref=000080&pid=S0100-204X200900110001800008&lng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000080&pid=S0100-204X200900110001800008&lng=pt)>. Acesso em: 14 nov. 2014.

LADNER, D.C.; TCHOUNWOU, P.B.; LAWRENCE, G.W. Evaluation of the effect of ecologic on root knot nematode, *Meloidogyne incognita*, and tomato plant, *Lycopersicon esculenum*. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, Basel, v 5, n. 2, p. 104-110, 2008. Disponível m:  
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18678924>>. Acesso em: 14 nov. 2014.

LANA FILHO, R.; FERRO, H.M.; PINHO, R.S.C. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Trópica**, Chapadinha, v. 4, n. 2, p. 12, 2010. Disponível em: <<http://www.periodicoseletronicos.ufma.br/index.php/ccatropica/article/view/145>>. Acesso em: 17 abr. 2014.

LI, X.Q.; TAN, A.; VOEGTLIN, M.; BEKELE, S.; CHEN, C.S.; AROIAN, R.V. Expression of Cry5B protein from *Bacillus thuringiensis* in plant roots confers resistance to root-knot nematode. **Biological Control**, Orlando, v. 47, n. 1, p. 97-102, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.06.007>>. Acesso em: 28 out. 2014.

LIAN, L.H.; TIAN, B.Y.; XIONG, M.Z.; ZHU, M.Z.; XU, J.; ZHANG, K.Q. Proteases from *Bacillus*: A new insight into the mechanism of action for rhizobacterial suppression of nematode populations. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 45, n. 3, p. 262-269, 2007. Disponível em:  
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17718837>>. Acesso em: 29 out. 2014.

LIMA, F.F. ***Bacillus subtilis* e níveis de nitrogênio sobre o desenvolvimento e a produtividade do milho**. 2010. 54 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Federal do Piauí. Teresina, 2010. Disponível em:  
<<http://www.ufpi.br/subsiteFiles/ppga/arquivos/files/dissertacao%20ferreira.pdf>>. Acesso em: 17 abr. 2014.

**LMXBIO:** Probiótico e Bioativador. 2014. Disponível em:  
<<http://www.lmxbio.com.br/>>. Acesso em: 04 dez. 2014.

LOPES, C.A.; SANTOS, J.R.M. **Doenças do tomateiro**. Brasília: Embrapa-SPI, 1994. 67p.

LUGTENBERG, B.; KAMILOVA, F. Plant-growth-promoting rhizobacteria. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 63, p. 541–556, 2009. Disponível em:  
<<http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.micro.62.081307.162918>>. Acesso em: 09 dez. 2014.

MACHADO, D.F.M., PARZIANELLO, F.R.; SILVA, A.C.F.; ANTONIOLLI, Z.I. *Trichoderma* no Brasil: o fungo e o bioagente. **Revista de Ciências Agrárias**, Lisboa, v. 35, n. 1, 2012. Disponível em:  
<[http://www.scielo.oces.mctes.pt/scielo.php?pid=S0871-018X2012000100026&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.oces.mctes.pt/scielo.php?pid=S0871-018X2012000100026&script=sci_arttext)>. Acesso em: 27 out. 2014.

MACIEL, S.L.; FERRAZ, L.C.C.B. Reprodução de *Meloidogyne incognita* raça 2 e de *Meloidogyne javanica* em oito espécies de plantas medicinais. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 53, n. 2-3, p. 956-960, 1996. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-90161996000200007](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-90161996000200007)>. Acesso em: 14 nov. 2014.

MAKETON, M.; APISITSANTIKUL, J.; SIRIRAWEEKUL, C. Greenhouse evaluation of *Bacillus subtilis* AP-01 and *Trichoderma harzianum* AP-001 in controlling tobacco diseases. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 39, n. 2, p. 296-300, 2008. Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3768408](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3768408/)>. Acesso em: 31 out. 2014.

MAKISHIMA, N.; MELO, W. F. de. **O rei das hortaliças. Como cultivar** - Embrapa Hortalícias (Circular técnica), v. 5, n. 29, p. 28-32, 2005. Disponível em: <[http://www.grupocultivar.com.br/arquivos/hf29\\_rei.pdf](http://www.grupocultivar.com.br/arquivos/hf29_rei.pdf)>. Acesso em: 14 nov. 2014.

MATSUMURA, A.T.S.; SANTIN, R.C.M.; PAZ, I.C.P.; RIBAS, P.P.; GUIMARÃES, A.M.; SILVA, M.E.; LAUAR, A.N. Bioformulados a base de *Trichoderma* spp. e *Paecilomyces lilacinus* no controle de nematoides galhadores na cultura do feijão em condições de campo. XI SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO. 2009. **Anais...** Bento Gonçalves-RS, 2009. Disponível em: <<http://www.seb.org.br/eventos/siconbiol/XISICONBIOL/04-MICROORGANISMOS-FITOPATOGENICOS-E-ENDOFITICOS.pdf>>. Acesso em: 12 nov. 2014.

MEDEIROS, F.H.V. **Biosolving**: Controle biológico de doenças de plantas. 2011. Disponível em: <<http://www.biosolving.com/home/biosolving-helping-you-better-understand-your-plant-systems>>. Acesso em: 02 nov. 2014.

MEDEIROS, F.H.V.; POMELLA, A.W.V.; SOUZA, J.T.; NIELLA, G.R.; VALLE, R.; BATEMAN, R.P.; FRAVEL, D.; VINYARD, B.; HEBBAR, P.K. A novel, integrated method for management of witches' broom disease in cacao in Bahia, Brazil. **Crop Protection**, Kidlington, v. 29, p. 704-711, 2010. Disponível em: <[http://www.marscacao.com.br/web/wp-content/uploads/2011/06/WB\\_Pomella.pdf](http://www.marscacao.com.br/web/wp-content/uploads/2011/06/WB_Pomella.pdf)>. Acesso em: 02 nov. 2014.

MELO, D.F.; MELLO, S.C.M.; MATTOS, C.R.R.; CARDOSO, S.E.A. Compatibilidade de *Dicyma pulvinata* com defensivos agrícolas e eficiência do biocontrole do mal-das-folhasda seringueira em campo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 2, p. 179-185, 2008. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/pab/v43n2/a04v43n2.pdf>>. Acesso em: 02 nov. 2014.

MELO, P.C.T. **Melhoramento genético do tomateiro**. Asgrow: Campinas, 1989. 55p.

MELO, T.A.; SERRA, I.M.R.S.; SILVA, G.S.S.; SOUSA, R.M.S. Produtos naturais aplicados para manejo de *Meloidogyne incognita* em tomateiros. **Summa phytopathologica**, Botucatu, n. 3, p. 223-227, 2012. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-54052012000300007&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-54052012000300007&script=sci_arttext)>. Acesso em: 14 nov. 2014.

MOHAMMED, S.H.; ANWER, M.; SAEDY, E.; MOHAMED, R.; ENAN, N.; IBRAHIM, E.; GHAREEB, A.; SALAH, A.M. Biocontrol efficiency of *Bacillus thuringiensis* toxins against root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. **Journal of Cell and Molecular Biology**, Halic, v.7, n. 1, p. 57-66, 2008. Disponível em: <[http://jcmb.halic.edu.tr/pdf/7-1/bolum\\_5.pdf](http://jcmb.halic.edu.tr/pdf/7-1/bolum_5.pdf)>. Acesso em: 28 out. 2014.

MOKBEL, A.A.; ALHARBI, A.A. Suppressive effect of some microbial agents on root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* infected eggplant. **Australian Journal of Crop Science**, Sydney, v. 8, n. 10, p. 1428-1434, 2014. Disponível em: <[http://www.cropj.com/mokbel\\_8\\_10\\_2014\\_1428\\_1434.pdf](http://www.cropj.com/mokbel_8_10_2014_1428_1434.pdf)>. Acesso em: 29 out. 2014.

MORAIS, S.B.P.; SILVA, K.C.C.; CUNHA, R.A.; FRANCAL, E.F. Efeito do grau de acetilação na conformação e solubilidade de filamentos finitos de quitina e quitosana. REUNIÃO ANUAL SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA., 34, 2011. **Anais...** Florianópolis, 2011. Disponível em: <<http://sec.sbj.org.br/cdrom/34ra/resumos/T2053-1.pdf>>. Acesso em: 06 nov. 2014.

OKSTAD, O.A.; KOLSTO, A.B. Evolution of the *Bacillus cereus* Group. In: SANSINENEA, E. (Coord.). *Bacillus thuringiensis* Biotechnology. Springer Science London, New York, cap. 06, 2012, p. 117-129. Disponível em: <[http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-007-3021-2\\_6](http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-007-3021-2_6)>. Acesso em 15 dez. 2014.

PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Mecanismos bioquímicos de resistência às doenças. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 2, p. 1-51, 1994.

PUNJA, Z.K.; ZHANG, Y. Plant chitinases and their roles in resistance to fungal diseases. **Journal of Nematology**, Orlando, v. 25, n. 4, p. 526-540, 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2619419/>>. Acesso em: 29 out. 2014.

RACKE, J.; SIKORA, R.A. Isolation, formulation and activity of rhizobacteria toward the potato cyst nematode *Globodera pallida*. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 24, n. 6, p. 521-526, 1992. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0038071792900759>>. Acesso em: 29 out. 2014.

RAMMAH, A.; HIRSCHMANN, H. Morphological comparison of tree host races of *Meloidogyne javanica*. **Journal of Nematology**, Lakeland, v. 22, n. 1, p. 56-68, 1990. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2619011/>>. Acesso em: 27 out. 2014.

REITZ, M.; RUDOLPH, K.; SCHRODER, I.; HOFFMANN-HERGARTEN, S.; HALLMANN, J.; SIKORA, R.A. Lipopolysaccharides of *Rhizobium etli* strain G12 act in potato roots as an inducing agent of systemic resistance to infection by the cyst nematode *Globodera pallida*. **Applied and Environment Microbiology**, Washington, v. 66, n.8, p. 3515-3518, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC92179/>>. Acesso em: 29 out. 2014.

RESENDE, M.L.V.; BARRETTI, P.B.; MEDEIROS, F.C.L.; SILVA, D.D.; PEREIRA, R.B.; LINS, S.R.P.; PEREIRA, L.M.; CAMPOS, M.A. Percepção e transdução de sinais para a ativação de respostas de defesa em plantas contra patógenos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 14, 2006, p. 129-198. Disponível em: <file:///F:/DISSERTA%C3%87%C3%83O%20MESTRADO/ARTIGOS/RESENDE%20et%20al.,%202007.pdf>. Acesso em: 16 dez. 2014.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. **Progress in Polymer Science**, Elmsford, v. 31, p. 603–632, 2006. Disponível em: <<http://farmacia.udea.edu.co/~marinos/chitin.pdf>>. Acesso em: 06 nov. 2014.

ROMEIRO, R. S. ISR – SAR: Pesquisa com procariotas para indução de resistência em plantas a patógenos na Universidade Federal de Viçosa. In: SIMPÓSIO DE BIOLOGIA MOLECULAR DA RESISTÊNCIA DE PLANTAS PATÓGENOS: APLICAÇÕES NO MANEJO INTEGRADO DE FITODOENÇAS 1., 2002. **Anais...** Lavras: UFLA, 2002. p. 86-119.

SAHEBANI, N.; HADAVI, N. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 40, n. 8, p. 2016–2020, 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0038071708001193>>. Acesso em: 30 out. 2014.

SANTOS, F. F. B. **Obtenção e seleção de híbridos de tomate visando à resistência ao Tomato yellow vein streak virus (ToYVSV)**. 2009. 75 f. Dissertação (Mestrado em Genética) - Instituto Agronômico de Campinas, Campinas, 2009. Disponível em: <<http://www.iac.sp.gov.br/areadoinstituto/posgraduacao/dissertacoes/Fabricio%20Santos.pdf>>. Acesso em: 27 out. 2014.

SANTOS, F.P. **Caracterização de isolados de *Bacillus thuringiensis* com potencial para controle de *Aedes aegypti***. 2010. 44 f. Tese (Doutorado em Agronomia)- Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010. Disponível em: <<http://www.bibliotecadigital.uel.br/document/?code=vtls000159035>>. Acesso em: 27 out. 2014.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEMATOLOGIA- SBN. **Fichas nematoides: Meloidogyne spp.** 2012. Disponível em: <<http://nematologia.com.br/2012/05/fichas-nematoides-nematode-profiles-meloidogyne-spp/>>. Acesso em: 09 out. 2014.

SHARMA, R.D.; GOMES, A.C. Effect of *Bacillus* spp. toxins on oviposition and juvenile hatching of *Heterodera glycines*. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 20, n. 1, p. 53-62, 1996. Disponível em: <<http://docentes.esalq.usp.br/sbn/nbonline/ol%20201/53-62%20pb.pdf>>. Acesso em: 27 out. 2014.

SHARMA, R.D.; VIVALDI, L.J. Controle de *Meloidogyne javanica* com *Pasteuria penetrans*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 11, 1999. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-204X1999001100013&lng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-204X1999001100013&lng=en)>. Acesso em: 27 out. 2014.

SOUZA JUNIOR, I.T.; MOURA, A.B.; SCHAFER, J.T.; CORRÊA, B.O.; GOMES, C.B. Biocontrole da queima-das-bainhas e do nematoide-das-galhas e promoção de crescimento de plantas de arroz por rizobactérias. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 11, p. 1259-1267, 2010. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/pab/v45n11/05.pdf>>. Acesso em: 31 out. 2014.

STICHER, L.; MAUCH MANI, B.; METRAUX, J.P. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Gainesville, v. 35, p. 235-270, 1997. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_nlinks&ref=000090&pid=S0101-3122200700010001600027&lng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000090&pid=S0101-3122200700010001600027&lng=en)>. Acesso em 16 dez. 2014.

TALAVERA, M.; ITOU, K.; MIZUKUBO, T. Combined application of *Glomus* sp. and *Pasteuria penetrans* for reducing *Meloidogyne incognita* (Tylenchida: Meloidogynidae) populations and improving tomato growth. **Applied Entomology and Zoology**, Tokyo, v. 37, n. 1, p. 61-67, 2002. Disponível em: <[http://www.academia.edu/172292/Combined\\_application\\_of\\_Glomus\\_sp.\\_and\\_Pasteuria\\_penetrans\\_for\\_reducing\\_Meloidogyne\\_incognita\\_Tylenchida\\_Meloidogynidae\\_populations\\_and\\_improving\\_tomato\\_growth](http://www.academia.edu/172292/Combined_application_of_Glomus_sp._and_Pasteuria_penetrans_for_reducing_Meloidogyne_incognita_Tylenchida_Meloidogynidae_populations_and_improving_tomato_growth)>. Acesso em: 31 out. 2014.

TIAN, B.Y.; YANG, J.K.; LIAN, L.H.; WANG, C.Y.; ZHANG, K.Q. Role of neutral protease from *Brevibacillus laterosporus* in pathogenesis of nematode. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 74, n. 2, p. 372-380, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17109172>>. Acesso em: 27 out. 2014.

TIHOHOD, D. **Nematologia agrícola aplicada**. Jaboticabal Funep, 2. ed. rev. amp., 473 p., 2000.

TIRYAKI, I.; TUNAZ, H. Systemic acquired resistance: characterization of genes associated with plant defense response. **Journal of Cell and Molecular Biology**, Halic, v. 3, p. 9-14, 2004. Disponível em: <<http://jcmb.halic.edu.tr/pdf/3-1/Systemic.pdf>>. Acesso em: 03 nov. 2014.

VAN-LOON, L.C. Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. **European Journal Plant Pathology**, Dordrecht, v. 119, p. 243-254, 2007. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10658-007-9165-1#page-1>>. Acesso em: 03 nov. 2014.

VAN-LOON, L.C.; BAKKER, P.A.H.; PIETERSE, C.M.J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Reviews Phytopathology**, Gainesville, v. 36, p. 453-483, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15012509>>. Acesso em: 09 dez. 2014.

VAN-LOON, L.C.; PIERPOINT, W.S.; BOLLER, T.H.; CONEJERO, V. Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. **Plant Molecular Biology Reporter**, Tucson, v. 12, n. 3, p. 245-264, 1994. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2FBF02668748#page-1>>. Acesso em: 03 nov. 2014.

VAN-PEER, R.; SCHIPPERS, B. Lipopolysaccharides of plant-growth promoting *Pseudomonas* sp. strain WCS417r induce resistance in carnation to *Fusarium* wilt. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v. 98, n. 2, p. 129-139, 1992. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2FBF01996325>>. Acesso em: 09 dez. 2014.

VAZ, M.V.; CANEDO, E.J.; MACHADO, J.C.; VIEIRA, B.S.; LOPES, E.A. Controle biológico de *Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne incognita* com *Bacillus subtilis*. **Perquirere**, Patos de Minas, n. 8, v. 1, p. 203-2012, 2011. Disponível em: <[http://perquirere.unipam.edu.br/documents/23456/50270/controle\\_biologico.pdf](http://perquirere.unipam.edu.br/documents/23456/50270/controle_biologico.pdf)>. Acesso em: 11 nov. 2014.

XU, C.; WANG, Y.; YU, C.; LI, L.; LI, M.; ELE, J.; SUN, M.; YU, Z. Construction and application in plasmid vectors of *Bacillus cereus* group. In: SANSINENEA, E. (Coord.). *Bacillus thuringiensis* Biotechnology. **Springer Science London**, New York, cap. 10, 2012, p. 185-199. Disponível em: <[http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-007-3021-2\\_10](http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-007-3021-2_10)>. Acesso em 15 dez. 2014.

YAO, A.; BOCHOW, H.; KARIMOV, S.; BOTUROV, U.; SANGINBOY, S.; SHARIPOV, A. Effect of FZB24® *Bacillus subtilis* as a biofertilizer on cotton yields in field tests. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, Berlin, v. 39, n. 4, p. 323-328, 2006. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/03235400600655347#.VE7koCLF90M>>. Acesso em: 29 out. 2014.

ZANARDO, N. M. T. **Purificação parcial de frações de *Saccharomyces cerevisiae* indutoras de resistência contra antracnose e avaliação de agentes bióticos (*S. cereviciae* e Agro-Mos) e abiótico (Bion) na indução de resistência contra inseto (*Tuta absoluta* x tomateiro), nematoide (*Meloidogyne incognita* x pepineiro) e organismo não alvo (*Bradyrhizobium elkanii* x soja)**. 2009. 98 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agronomia “Luiz de Queiroz”, Piracicaba. 2009. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11138/tde-10092009-091437/pt-br.php>>. Acesso em: 24 mai. 2014.

## **CAPÍTULO I: Controle de *Meloidogyne incognita* e *Meloidogyne javanica* com *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, *Rhizobium* sp., *Saccharomyces cerevisiae* e *Trichoderma* spp. no tomateiro**

### **RESUMO**

Dentre as formas de manejo de fitonematoides destaca-se o controle biológico com micro-organismos habitantes solo. Nesse contexto, é cada vez mais comum o surgimento de produtos biológicos comerciais para o manejo de nematoides das galhas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia do produto comercial LMXBIO e cada micro-organismo de sua composição (*B. subtilis*, *B. thuringiensis*, *Rhizobium* sp., *S. cerevisiae* e *Trichoderma* spp.), de forma isolada, no controle de *M. incognita* e *M. javanica* e no desenvolvimento do tomateiro. O experimento consistiu na aplicação do produto biológico e dos isolados no solo durante e após 15 dias do transplantio de mudas de tomateiro cultivar Santa Clara Kada. Após dez dias da primeira aplicação, o solo foi infestado ou não com 5.000 ovos de *M. incognita* ou *M. javanica*, de acordo com o tratamento. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), em arranjo fatorial 7 x 3 (micro-organismos x nematoides), com dez repetições, sendo a parcela experimental constituída por um vaso contendo uma planta de tomateiro. Após 60 dias foi avaliado o fator de reprodução, número de ovos e juvenis por grama de raiz fresca, altura de parte aérea (cm), comprimento de sistema radicular (cm), massa fresca e seca de raiz (g) e massa fresca e seca de parte aérea (g). *Trichoderma* spp. foi eficiente na redução de *M. incognita* no tomateiro. *B. subtilis* e *Rhizobium* sp. foram eficazes na redução de *M. javanica* no tomateiro.

**Palavras-chaves:** manejo alternativo, micro-organismos, nematoide das galhas, rizobactérias.

## **CHAPTER I: Biological control of *Meloidogyne incognita* and *M. javanica* with *Bacillus subtilis*, *B. thuringiensis*, *Rhizobium* sp., *Saccharomyces cerevisiae* and *Trichoderma* spp. in tomato**

### **ABSTRACT**

Among the techniques to manage plant-parasitic nematodes, biological control with soil inhabiting microorganisms stands out. In this context, new commercial biological products for the management of root-knot nematodes are increasingly released. This study evaluated the effectiveness of the commercial product LMXBIO and each microorganism of its composition (*B. subtilis*, *B. thuringiensis*, *Rhizobium* sp., *S. cerevisiae* and *Trichoderma* spp.) alone, to control *M. incognita* and *M. javanica* and on tomato plants development. The experiment consisted of the application of the biological product or each microorganism alone to the soil at transplanting, and 15 days later, of tomato seedlings cultivar Santa Clara Kada. Ten days after the first application, the soil was infested, or not, with 5,000 eggs of *M. incognita* or *M. javanica*. The experimental design was completely randomized (CRD) in a factorial 7 x 3 (microorganisms x root-knot nematodes), with ten replications, and the experimental unit consisted of one pot containing one tomato plant. Reproduction rate, number of eggs and juveniles per gram of fresh root, shoot height (cm), root length (cm), fresh and dry root (g) and fresh and dry shoot (g) matter were determined 60 days after inoculation. *Trichoderma* spp. was effective in reducing *M. incognita* while *B. subtilis* and *Rhizobium* sp. were effective in reducing *M. javanica* in tomato.

**Keywords:** alternative management, microorganisms, root-knot nematode, rhizobacteri

## 1 INTRODUÇÃO

O tomateiro (*Solanum lycopersicon* L.) é uma cultura de grande importância econômica, tendo como um dos principais problemas fitossanitários o parasitismo por nematoides do gênero *Meloidogyne*, formadores de galhas nas raízes (ARAÚJO; MARCHESI, 2009). Plantas infectadas apresentam dificuldade na absorção de água e nutrientes do solo, resultando em deficiência mineral e perda de produtividade da ordem de 25 a 85% (LOPES; SANTOS, 1994).

Dentre as formas de manejo, o controle biológico desses nematoides tem-se apresentado como uma opção viável, por minimizar o dano ambiental quando comparado aos métodos químicos convencionais (COIMBRA; CAMPOS, 2005). O componente biológico é particularmente importante em limitar ou estabilizar as populações dos nematoides através de mecanismos de competição, parasitismo e produção de compostos tóxicos (LOPES *et al.*, 2007).

Os principais agentes de controle biológico de nematoides são fungos e bactérias. Dentre as bactérias, as rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*- PGPR), com capacidade de colonizar a rizosfera e promover o desenvolvimento vegetal, vem sendo exploradas no controle biológico de fitonematoides (VAZ *et al.*, 2011). Os principais mecanismos de ação das PGPRs são decorrentes do parasitismo, da produção de antibióticos, toxinas e enzimas, da interferência no processo de reconhecimento planta-hospedeiro, da indução de resistência e proporcionando o desenvolvimento saudável da planta (TIAN *et al.* 2007). Relatos de potencial antagonístico das rizobactérias dos gêneros *Bacillus* e *Rhizobium*, habitantes comuns no solo contra fitonematoides, aparecem na literatura (ARAÚJO; MARCHESI, 2009; ARAÚJO *et al.*, 2002; FABRY *et al.*, 2007; JOUZANI *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2008; REITZ *et al.*, 2000).

Outros micro-organismos, cujo *habitat* é o solo, como a levedura *Saccharomyces cerevisiae* e o fungo *Trichoderma* spp., têm sido estudados no controle de nematoides das galhas (CAPRONI *et al.*, 2012; FIALHO *et al.*, 2012; ZANARDO, 2009). Os compostos orgânicos voláteis (VOCs) produzidos por *S. cerevisiae* é sugerido como indutor de resistência na planta contra fitonematoides (KARAJEH, 2013). Em relação *Trichoderma* spp., estudos têm mostrado sua capacidade de infectar ovos de nematoides e juvenis *in vitro* (FREITAS *et al.*, 2012), sendo sugerida também e indução

dos mecanismos de defesa do hospedeiro pelo aumento de enzimas extracelulares, tais como quitinases e proteases (SAHEBANI; HADAVI, 2008).

Nesse cenário, é cada vez mais comum o desenvolvimento de produtos biológicos comerciais para manejo de nematoídes das galhas. O produto comercial LMXBIO é um probiótico e bioativador de plantas, composto pelos micro-organismos *B. subtilis*, *B. thuringiensis*, *Rhizobium* sp., *S. cerevisiae* e *Trichoderma* spp., que possui propriedades nematicidas devido ao amplo espectro de ação de seus componentes contra os nematoídes (LMXBIO, 2014).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia do produto comercial LMXBIO e cada micro-organismo de sua composição, de forma isolada, no controle dos nematoídes das galhas *M. incognita* e *M. javanica* e no desenvolvimento do tomateiro.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Montagem e condução do experimento

O experimento foi conduzido no Laboratório de Nematologia (LANEM) e na casa de vegetação da Universidade Federal de Uberlândia-MG, no período de março a junho de 2014.

O trabalho consistiu na aplicação de uma formulação comercial (LMXBIO) composta por *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, *Rhizobium* sp., *Saccharomyces cerevisiae* e *Trichoderma* spp. e na aplicação isolada de cada micro-organismo constituinte dessa formulação no controle de *M. incognita* ou *M. javanica*. O produto biológico e os isolados de cada micro-organismo na concentração  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>, foram fornecidos pelo fabricante do produto comercial.

Mudas de tomateiro cultivar Santa Clara Kada foram produzidas em bandejas de isopor com substrato contendo casca de pinus e fibra de coco. Após 20 dias as mudas foram transplantadas para vasos plásticos de 1,5 L de capacidade e preenchidos com mistura de solo de barranco e areia, na proporção de 1:2 (v:v).

A aplicação dos tratamentos (TABELA 01) foi realizada no sulco de plantio durante o transplantio das mudas. Após 10 dias, o solo foi infestado com 5.000 ovos de *M. incognita* ou *M. javanica*, de acordo com o tratamento, por meio da adição da suspensão do inóculo em três orifícios feitos ao redor da planta a uma distância de 2 cm

do caule com 2 cm de profundidade. Os ovos dos nematoides foram extraídos pela técnica de Hussey e Barker (1973), modificada por Boneti e Ferraz (1981), a partir de raízes de tomateiros previamente infectadas com populações puras dos nematoides, cedidas pela empresa Syngenta. Para isso, as raízes foram lavadas cuidadosamente em água corrente, fragmentadas em pedaços de 2 cm e colocadas em um copo de liquidificador doméstico, contendo solução de hipoclorito de sódio, a 0,5% para trituração na menor rotação por 60s. A suspensão obtida foi vertida na peneira de 200 mesh sobreposta a de 500 mesh. O resíduo de 500 mesh foi recolhido com jatos de água de uma pisseta para um copo. A suspensão de ovos foi calibrada com auxílio da câmara de contagem de Peters para 5.000 ovos em microscópio óptico.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), em arranjo fatorial 7 x 3 (micro-organismos x nematoides), com dez repetições, sendo a parcela experimental constituída por um vaso contendo uma planta de tomateiro. Após 5 dias da inoculação dos nematoides, repetiu-se a aplicação dos tratamentos (TABELA 01), aplicando-os em três orifícios feitos ao redor da planta a uma distância de 2 cm do caule com 2 cm de profundidade.

Durante a condução do experimento realizou-se o manejo de pragas com armadilhas de plástico de polietileno amarelo contendo óleo vegetal para controle de moscas brancas (*Bemisia tabaci* Genn). Sempre que necessário, as plantas daninhas foram retiradas manualmente. O turno de rega adotado foi o diário, optando-se por uso de mangueira mantendo o solo com, aproximadamente, 60% da capacidade de campo. Com intervalos quinzenais foram aplicados  $100\text{mL.planta}^{-1}$  de uma solução nutritiva contendo: EDTA férrico;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ;  $\text{KNO}_3$ ;  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Diariamente no mesmo horário foram coletados os dados referentes às temperaturas mínima e máxima do ar da casa de vegetação.

**TABELA 01.** Tratamentos utilizados para controle de nematoídes das galhas (*M. incognita* e *M. javanica*), em tomateiro cultivado em casa de vegetação. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2015.

Nematoídes	Micro-organismos
Sem nematoíde	Sem aplicação
Sem nematoíde	LMXBIO (1 mL.planta <sup>-1</sup> )
Sem nematoíde	<i>Bacillus subtilis</i> (1mL.planta <sup>-1</sup> )
Sem nematoíde	<i>Bacillus thuringiensis</i> (1mL.planta <sup>-1</sup> )
Sem nematoíde	<i>Rhizobium</i> sp. (1mL.planta <sup>-1</sup> )
Sem nematoíde	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (1mL.planta <sup>-1</sup> )
Sem nematoíde	<i>Trichoderma</i> sp. (1mL.planta <sup>-1</sup> )
<i>M. incognita</i>	Sem aplicação
<i>M. incognita</i>	LMXBIO (1 mL.planta <sup>-1</sup> )
<i>M. incognita</i>	<i>Bacillus subtilis</i> (1mL.planta <sup>-1</sup> )
<i>M. incognita</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> (1mL.planta <sup>-1</sup> )
<i>M. incognita</i>	<i>Rhizobium</i> sp. (1mL.planta <sup>-1</sup> )
<i>M. incognita</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (1mL.planta <sup>-1</sup> )
<i>M. incognita</i>	<i>Trichoderma</i> sp. (1mL.planta <sup>-1</sup> )
<i>M. javanica</i>	Sem aplicação
<i>M. javanica</i>	LMXBIO (1 mL.planta <sup>-1</sup> )
<i>M. javanica</i>	<i>Bacillus subtilis</i> (1mL.planta <sup>-1</sup> )
<i>M. javanica</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> (1mL.planta <sup>-1</sup> )
<i>M. javanica</i>	<i>Rhizobium</i> sp. (1mL.planta <sup>-1</sup> )
<i>M. javanica</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (1mL.planta <sup>-1</sup> )
<i>M. javanica</i>	<i>Trichoderma</i> sp. (1mL.planta <sup>-1</sup> )

## 2.2 Avaliações

As avaliações do experimento ocorreram no LANEM aos 60 dias após a inoculação dos nematoídes, determinando-se o fator de reprodução (população final/população inicial) e número de ovos, juvenis e adultos dos nematoídes por grama de raiz fresca. A população final foi determinada pela soma da análise nematológica das raízes pela técnica de Hussey e Barker (1973), modificada por Boneti e Ferraz (1981) e pela população final do solo de acordo com a metodologia de flotação centrífuga em solução de sacarose (JENKINS, 1964). Para isso, uma alíquota de 150cm<sup>3</sup> de solo foi colocada em um recipiente contendo 2L de água. Os torrões foram desmochados e a suspensão, após homogeneização, permaneceu em repouso por 15s. Após esse período,

a suspensão foi vertida passando pelas peneiras sobrepostas de 20 e 400 mesh. O resíduo da peneira de 400 mesh foi recolhido e distribuído em tubos de centrífuga balanceados que então foram centrifugados por 5 min, a velocidade de 650 gravidades. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e ao resíduo adicionou-se uma solução de sacarose (454g de açúcar cristal. $1L^{-1}$  de água). Os tubos foram centrifugados novamente na mesma velocidade, durante 1 min. O sobrenadante foi vertido na peneira de 500 mesh. O resíduo dessa peneira foi recolhido com auxílio de jatos de água de uma pisseta para um copo. Uma alíquota obtida foi colocada na câmara de contagem de Peters e levada ao microscópio óptico para a determinação da população de ovos, juvenis e adultos dos nematoides.

Foram determinadas altura de parte aérea (cm), comprimento do sistema radicular (cm), massa fresca e seca de raiz (g) e massa fresca e seca de parte aérea (g). Para determinação da altura de plantas, utilizou-se uma fita métrica, tomando como referência a distância do colo ao ápice da planta. Para determinação do comprimento de raiz, adotou-se como referência a distância do colo até o fim da raiz, sendo realizada antes da análise nematológica. O sistema radicular, após a extração de nematoides, foi seco em estufa de circulação forçada de ar a 60°C, até atingir peso constante, obtido em 72 horas, para posterior determinação do valor do peso da matéria seca sendo realizada a pesagem em balança digital.

Os dados obtidos foram submetidos aos testes de normalidade (Teste de Kolmogorov-Smirnov<sup>a</sup>) e de homogeneidade do erro experimental (Teste de Levene) pelo programa estatístico SPSS Statistics vs. 20 (IBM CORP, 2011). As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa estatístico Sisvar versão 5.10 (FERREIRA, 2010) e as comparações entre os tratamentos foram realizadas pelo teste Tukey a 0,05 de significância. Quando não foram atendidas as pressuposições do modelo de homogeneidade de variâncias e normalidade de resíduos, foi realizada análise não paramétrica dos dados pelo Teste de Kruskal-Wallis e de Mann-Whitney U, a 0,05 de significância das amostras independentes, comparando poços médios (BEIGUELMAN, 2002; CALLEGARI-JACQUES, 2003).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante a condução do experimento, as temperaturas médias mínima e máxima do ar da casa de vegetação foi de 19 a 31°C, respectivamente.

Com relação à altura de parte aérea, não houve interação significativa entre os fatores micro-organismos e nematoides. Nenhum dos micro-organismos diferiu estatisticamente da testemunha e não houve diferença entre os nematoides, conforme Tabela 02.

**TABELA 02.** Altura de parte aérea (cm) de plantas de tomate, tratadas com micro-organismos para controle de nematoides das galhas. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2015.

Micro-organismos	Sem nematoide	<i>M. incognita</i>	<i>M. javanica</i>	Médias
<i>B. thuringiensis</i>	62,70	63,80	58,40	61,63a
<i>Trichoderma</i> spp.	57,80	59,30	61,80	59,63ab
LMXBIO	57,45	53,70	56,60	55,91ab
<i>Rhizobium</i> sp.	56,00	53,40	50,40	53,26ab
Testemunha	55,20	52,90	61,40	59,63ab
<i>B. subtilis</i>	53,00	58,20	55,80	55,66ab
<i>S. cerevisiae</i>	53,40	54,20	49,70	52,43b
Médias	56,5A	56,5A	56,3A	

CV: 20,60% DMS<sub>Micro</sub>: 8,94 DMS<sub>Nem</sub>: 4,64 KS: 0,052\* F: 1,072\*  
Fc: 0,687

CV: Coeficiente de variação dos dados. DMS<sub>Micro</sub>: Diferença mínima significativa para micro-organismos. DMS<sub>Nem</sub>: Diferença mínima significativa para nematoides. KS: estatística do teste de Kolmogorov-Smirnov<sup>a</sup>. F: estatística do teste Levene. \*: significativo a 0,05. Fc: Valor de F calculado da análise de variância. Médias seguidas por letras distintas minúsculas na coluna e maiúsculas na linha diferem entre si a 0,05 de significância pelo teste Tukey.

Assim como nesse trabalho, avaliando o efeito de *B. subtilis* no controle da meloidoginose e na promoção do crescimento do tomateiro, Araújo e Marchesi (2009) não verificaram incrementos na altura de parte aérea das plantas. Todavia, testando *B. subtilis* e *B. thuringiensis* no manejo de nematoides das galhas no feijoeiro, Dawar *et al.* (2008) observaram aumento na altura de parte aérea em relação à testemunha.

No biocontrole de *M. javanica* com *Rhizobium etli* isolado G12, o tratamento com a bactéria não resultou em aumento da altura de parte aérea de plantas de tomate (FABRY, 2006). A inoculação de vários isolados de *Trichoderma* sp. ao solo não aumentou a altura da parte aérea de plantas de feijoeiro inoculadas com *Meloidogyne*

sp. (BORGES *et al.*, 2013). Os isolados 1M, 4M, 12T, 15M e A18 de *Trichoderma* sp., aumentaram a altura da parte aérea de plantas de cana-de-açúcar inoculadas com *M. incognita* (FREITAS *et al.*, 2012).

As contradições encontradas na literatura a respeito da eficiência de micro-organismos no desenvolvimento de plantas são relacionadas, principalmente, as características do isolado utilizado. A variação pode ser devida a adaptação seletiva dos isolados a fatores edáficos em sua origem geográfica, como o tipo de solo ou temperatura ambiente (SANTOS *et al.*, 1992). Além disso, a diferença pode estar associada com a variabilidade genética da espécie em questão, que pode apresentar baixa eficiência do isolado para o que se deseja.

A Tabela 03 apresenta os resultados para comprimento de raiz das plantas de tomate. Houve interação significativa entre os fatores micro-organismos e nematoides.

**TABELA 03.** Comprimento de raiz (cm) de plantas, de tomate tratadas com micro-organismos para controle de nematoides das galhas. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2015.

Micro-organismos	Sem nematoide <sup>1</sup>	<i>M. incognita</i> <sup>1</sup>	<i>M. javanica</i> <sup>1</sup>
<i>B. subtilis</i>	40,0 aA	27,9 abB	37,0 aAB
<i>Rhizobium</i> sp.	38,3 aA	30,9 abA	33,3 abA
LMXBIO	48,4 aA	24,6 bB	31,8 abB
<i>Trichoderma</i> spp.	37,51 aA	37,1 aA	31,1 abA
<i>B. thuringiensis</i>	40,0 aA	33,1 abAB	30,35 abB
Testemunha	40,2 aA	34,2 abAB	29,1 abB
<i>S. cerevisiae</i>	41,2 aA	26,55 abB	25,7 bB

CV<sub>T</sub>: 7,70% CV<sub>NT</sub>: 28,59% DMS<sub>Micro</sub>: 7,56 DMS<sub>Nem</sub>: 3,90 KS: 0,059\*  
F: 1,032\* Fc: 2,063

<sup>1</sup>Dados transformados para Log (x + 1). As médias originais são apresentadas. CV<sub>T</sub>: Coeficiente de variação dos dados transformados. CV<sub>NT</sub>: Coeficiente de variação dos dados não transformados. DMS<sub>Micro</sub>: Diferença mínima significativa para micro-organismos. DMS<sub>Nem</sub>: Diferença mínima significativa para nematoides. KS: estatística do teste de Kolmogorov-Smirnov<sup>a</sup>. F: estatística do teste Levene. \*: significativo a 0,05. Fc: Valor de F calculado da análise de variância. Médias seguidas por letras distintas minúsculas na coluna e maiúsculas na linha diferem entre si a 0,05 de significância pelo teste Tukey.

Sem a inoculação de nematoide, nenhum micro-organismo se diferiu da testemunha. Com a inoculação de *M. incognita*, a aplicação de *Trichoderma* spp. apresentou melhores resultados em relação ao produto LMXBIO, porém ambos foram iguais à testemunha. Com a inoculação de *M. javanica*, foi observada diferença apenas entre *B. subtilis* e *S. cerevisiae* (TABELA 03), com valores maiores para *B. subtilis*.

Avaliando o fator micro-organismo, a inoculação de *M. incognita* limitou o crescimento das raízes do tomateiro mesmo com a aplicação de *B. subtilis*, LMXBIO e *S. cerevisiae*. Com a inoculação de *M. javanica*, o crescimento da raiz foi menor na aplicação de LMXBIO e *S. cerevisiae*.

Somente a utilização de *Trichoderma* spp. e *Rhizobium* sp. foram capazes de manter normal o crescimento das raízes, mesmo com o parasitismo das duas espécies de nematoides. Segundo Harman (2000), além de serem utilizados em controle de patógenos, *Trichoderma* spp. são agentes promotores de crescimento, devido à solubilização de nutrientes para as raízes.

Rizobactérias como *Rhizobium* sp. colonizam as raízes das plantas induzindo a produção de fitohormônios, sideróforos, solubilizando fosfato do solo, inibição da síntese de etileno, aumento da fixação de nitrogênio, solubilização e absorção de nutrientes, melhoria das condições do solo, além de oferecerem benefícios indiretos ao crescimento de plantas pela supressão do solo contra micro-organismos maléficos (KLOEPPEP *et al.*, 1999).

A levedura *S. cerevisiae* tem capacidade de induzir resistência na planta, pelo acúmulo de fitoalexinas (WULFF; PASCHOLATI, 1998). Entretanto, neste trabalho, sua utilização não foi eficiente no aumento do comprimento de raiz.

Vários isolados de *B. thuringiensis* (BT-8, BT-9, BT-10 BT-14 e BT-64) aumentaram o comprimento de raiz em plantas de feijoeiro. Em plantas de quiabo apenas dois isolados (BT-14 e BT-64) foram eficientes (KHAN *et al.*, 2010). *B. subtilis* e *B. thuringiensis* aumentaram o comprimento do sistema radicular do feijoeiro infestado com nematoide das galhas (DAWAR *et al.*, 2008). Resultados semelhantes foram encontrados por Freitas *et al.* (2012), com isolados de *Trichoderma* sp. (2M, 8M, 12T e 15M) em cana-de-açúcar.

Não ocorreu interação significativa entre os fatores micro-organismos e nematoides, quando avaliado peso fresco de raiz, conforme mostra Tabela 04.

**TABELA 04.** Peso fresco de raiz (g) de plantas de tomate, tratadas com micro-organismos para controle de nematoides das galhas. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2015.

Micro-organismos	Sem nematoide <sup>1</sup>	<i>M. incognita</i> <sup>1</sup>	<i>M. javanica</i> <sup>1</sup>	Médias
<i>B. subtilis</i>	15,80	16,90	18,95	17,21a
<i>B. thuringiensis</i>	14,84	15,01	17,36	15,74a
<i>Trichoderma</i> spp.	17,31	12,92	12,99	14,41ab
LMXBIO	13,19	11,82	15,61	13,54ab
<i>Rhizobium</i> sp.	12,63	13,25	13,37	13,08ab
Testemunha	9,24	10,98	11,16	10,46bc
<i>S. cerevisiae</i>	7,15	9,49	8,08	8,24c
Médias	12,88A	12,91A	13,93A	

CV<sub>T</sub>: 20,02% CV<sub>NT</sub>: 41,66% DMS<sub>Micro</sub>: 4,24 DMS<sub>Nem</sub>: 2,20 KS: 0,034 \*

F: 1,264\* Fc: 0,805

<sup>1</sup>Dados transformados para  $\sqrt{x+1,0}$ . As médias originais são apresentadas. CV<sub>T</sub>: Coeficiente de variação dos dados transformados. CV<sub>NT</sub>: Coeficiente de variação dos dados não transformados. DMS<sub>Micro</sub>: Diferença mínima significativa para micro-organismos. DMS<sub>Nem</sub>: Diferença mínima significativa para nematoides. KS: estatística do teste de Kolmogorov-Smirnov<sup>a</sup>. F: estatística do teste Levene.\*: significativo a 0,05. Fc: Valor de F calculado da análise de variância. Médias seguidas por letras distintas minúsculas na coluna e maiúsculas na linha diferem entre si a 0,05 de significância pelo teste Tukey.

A aplicação de *B. subtilis* e *B. thuringiensis* resultou num aumento do peso fresco de raiz, diferindo da testemunha. Comparando os nematoides, não foi observada diferença significativa (TABELA 4).

*B. subtilis* aumenta a fixação de nitrogênio, solubiliza nutrientes para planta, sintetiza fitohormônios, melhora as condições do solo e traz benefícios indiretos pela supressão de fitopatógenos. Além disso, a bactéria produz hormônios como ácido indol-acético (AIA) e indol butírico (AIB), secreta enzimas importantes para a nutrição das plantas e quando aplicada no solo induz a atividade enzimática da fosfatase e disponibilização do fósforo no solo para as plantas (ARAUJO *et al.*, 2005; MANJULA; PODILE, 2005). Aumento do teor de nitrogênio em folhas do milho inoculado com *B. subtilis*, foram relatados por Araújo *et al.*, (2005).

Alguns trabalhos não corroboram com o resultado encontrado, o que pode ser justificado pela variação de cada isolado. A aplicação ao solo de *Bacillus* spp. não incrementou a biomassa das raízes de feijoeiro infectado por *M. javanica* (FERNANDES *et al.*, 2013). Vaz *et al.* (2011) não verificaram aumento da massa fresca de raízes de tomateiro, após microbiolização das sementes com *B. subtilis* e inoculação

com *M. javanica* ou *M. incognita*. A mesma bactéria também não promoveu aumento no peso fresco de raiz de plantas de tomateiro inoculado com nematoides das galhas (ARAÚJO; MARCHESI, 2009).

*B. thuringiensis* aumentou de forma significativa o peso de raiz fresca das plantas (TABELA 04). Estudos de Praça *et al.* (2013) comprovaram sua atuação endofítica, após colonização e penetração de raízes, caules e folhas de plântulas de repolho. Além da proteção contra patógenos, outros benefícios são atribuídos às espécies endofíticas, como produção de fitohormônios e de antibióticos e fixação de nitrogênio, o que direta ou indiretamente, favorecem o crescimento e desenvolvimento de plantas (ANDREOTE *et al.*, 2004; VERMA *et al.*, 2001).

Apesar da composição do produto LMXBIO conter *B. subtilis* e *B. thuringiensis*, o produto não incrementou o peso fresco de raiz. Pode ter ocorrido interação negativa entre os micro-organismos da composição, como a competição por nutrientes, espaço e oxigênio. A comunidade microbiana de bioformulados é variável e depende do processo (aeróbio ou anaeróbio) e do substrato utilizado na sua produção. À medida que o processo de maturação progride, as condições físicas, a composição química do meio e a estrutura da comunidade microbiana tendem a estabilização (BERNARDO; BETTIOL, 2010; MAGRINI *et al.*, 2011).

Avaliando a composição química e microbiológica de biofertilizantes de esterco bovino e de galinha, Marrocos *et al.* (2012) observaram queda na comunidade de fungos com aumento da população bacteriana, atribuindo isso aos compostos voláteis e antibióticos liberados pelas bactérias, principalmente do gênero *Bacillus*, e competição entre esses micro-organismos. Observando interações entre micro-organismos, Berggren *et al.* (2001), verificaram que, com a mudança do pH do meio, isolados de *Pseudomonas* fluorescentes produziram substância inibidora ao processo de fixação simbiótica de estirpes de *Rhizobium leguminosarum*.

Não houve interação significativa entre os fatores micro-organismos e nematoides, quando avaliado peso fresco de parte aérea (TABELA 05).

**TABELA 05.** Peso fresco de parte aérea (g) de plantas de tomate, tratadas com micro-organismos para controle de nematoídeas das galhas. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2015.

Micro-organismos	Sem nematoide	<i>M. incognita</i>	<i>M. javanica</i>	Médias
<i>Trichoderma</i> spp.	22,16	19,53	19,25	20,31a
<i>B. subtilis</i>	20,33	17,84	22,49	20,22a
<i>B. thuringiensis</i>	23,09	18,87	17,43	19,80a
LMXBIO	19,40	15,42	17,67	17,50a
Testemunha	16,27	15,41	19,61	17,10ab
<i>Rhizobium</i> sp.	17,66	16,81	15,74	16,74ab
<i>S. cerevisiae</i>	13,30	15,60	11,20	13,37b
Média	18,89A	17,07A	17,63A	

CV: 27,56% DMS<sub>Micro</sub>: 3,78 DMS<sub>Nem</sub>: 1,96 KS: 0,03\* F: 1,962\* Fc: 1,735  
 CV: Coeficiente de variação dos dados. DMS<sub>Micro</sub>: Diferença mínima significativa para micro-organismos. DMS<sub>Nem</sub>: Diferença mínima significativa para nematoídeas. KS: estatística do teste de Kolmogorov-Smirnov<sup>a</sup>. F: estatística do teste Levene.\*: significativo a 0,05. Fc: Valor de F calculado da análise de variância. Médias seguidas por letras distintas minúsculas na coluna e maiúsculas na linha diferem entre si a 0,05 de significância pelo teste Tukey.

A aplicação de *Trichoderma* spp., *B. subtilis* e *B. thuringiensis* e LMXBIO aumentaram o peso fresco de parte aérea em relação ao tratamento com *S. cerevisiae*, porém nenhum tratamento se diferiu da testemunha. Quando comparados nematoídeas, não foi observada diferença significativa.

*B. subtilis* foi capaz de promover o crescimento do tomateiro aumentando o peso fresco da parte aérea em relação à testemunha (ARÚJO; MARCHESI, 2009). Já Vaz *et al.* (2011) não verificaram o mesmo efeito. A ineficiência foi justificada pelo tratamento ter ocorrido via microbiolização das sementes, o que não foi suficiente para a colonização e produção de substâncias tóxicas inibidoras da eclosão e viabilidade dos juvenis (FREITAS, 2001). A aplicação de bactérias no solo antes ou durante o plantio poderia ser uma maneira mais eficiente para permitir o desenvolvimento de plantas (VAZ *et al.*, 2011), como foi realizado neste trabalho.

Os isolados 12T e A18 de *Trichoderma* sp., também, acrescentaram a massa fresca de parte aérea da cana-de-açúcar inoculada com *M. incognita* (FREITAS *et al.*, 2012).

Para peso seco de raiz os resultados são apresentados na Tabela 06. Não houve diferença significativa quando comparada a aplicação dos micro-organismos, independente do nematoíde inoculado.

**TABELA 06.** Peso seco de raiz (g) de plantas de tomate tratadas, com micro-organismos para controle de nematoídeas das galhas. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2015.

Micro-organismos	Sem nematoide	<i>M. incognita</i>	<i>M. javanica</i>
<i>B. subtilis</i>	4,12aA	1,28aB	0,97aB
<i>Trichoderma</i> spp.	4,12aA	0,98aB	1,12aB
<i>B. thuringiensis</i>	3,55aA	1,46aB	0,98aB
<i>Rhizobium</i> sp.	3,38aA	0,98aB	1,04 aB
LMXBIO	3,40aA	0,79aB	1,19 aB
Testemunha	2,35aA	0,79aB	0,81aB
<i>S. cerevisiae</i>	2,02aA	0,83aAB	0,57 aB
Média	3,30A	1,02B	0,95B

Médias seguidas por letras distintas minúsculas na coluna e maiúsculas na linha diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis e de Mann-Whitney U, a 0,05 de significância das amostras independentes.

Independentemente do micro-organismo aplicado, a inoculação de *M. incognita* e *M. javanica* reduziu o peso seco das raízes (TABELA 06). Fitonematoídes causam mudanças anatômicas nas raízes, ocasionando alteração na absorção de água e nutrientes e redução do sistema radicular por disfunções ocasionadas, bem como a escassez de raízes secundárias, com sistemas radiculares rasos, pobres e deformados (ABRÃO; MAZZAFERA, 2001; GUIMARÃES, 2012).

Apesar de nenhum dos micro-organismos terem sido capazes de retardar o baixo desenvolvimento radicular ocasionado pela infecção dos nematoídes, quando se avaliou peso fresco foi observada eficiência de *B. subtilis* e *B. thuringiensis* (TABELA 04). Isso pode ter ocorrido devido à alta turgidez das células das raízes durante a coleta das plantas, que apresentaram bom conteúdo em água.

Em relação a *B. subtilis* e *B. thuringiensis*, os resultados não corroboram com Dawar *et al.* (2008), em que ambas as bactérias incrementaram a massa seca do sistema radicular do feijoeiro infestado com nematoíde das galhas. Isolados de *B. thuringiensis* (BT-9, BT-10 BT-14 e BT-64) aumentaram o peso seco do sistema radicular do feijoeiro e do quiabeiro inoculados com *M. incognita* (KHAN *et al.*, 2010). O isolado 311T de *Trichoderma* sp. promoveu maior peso seco do sistema radicular da cana-de-açúcar inoculada com *M. incognita* (BORGES *et al.*, 2013).

Rizobactérias isoladas e combinadas (DFs223, DFs416, DFs418, DFs185/306; DFs306/416; DFs185/306/416; DFs185/306/418; DFs185/416/418; DFs306/416/418 e DFs185/306/416/418) aumentaram o peso seco de raízes de arroz atacadas por *M. graminicola* (SOUZA JÚNIOR *et al.*, 2010).

A porcentagem de rizobactérias eficientes na promoção de crescimento é menor que 1%, sendo esse percentual é ainda mais reduzido quando se trata de biocontrole de nematoídeos (VAZ *et al.*, 2011). Essa afirmação pode justificar a ineficiência dos isolados no parâmetro avaliado.

Para peso seco de parte aérea, os resultados estão apresentados na Tabela 07.

**TABELA 07.** Peso seco de parte aérea (g) de plantas de tomate tratadas, com micro-organismos para controle de nematoídeos das galhas. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2015.

Micro-organismos	Sem nematoide	<i>M. incognita</i>	<i>M. javanica</i>
<i>B. thuringiensis</i>	4,23aA	4,78aA	4,47abA
<i>B. subtilis</i>	4,07aA	4,28aA	4,83aA
<i>Trichoderma</i> spp.	4,15aA	3,81aA	4,40abA
LMXBIO	3,95aA	3,26aA	4,02abcA
Testemunha	3,22abB	3,31aAB	4,39abA
<i>Rhizobium</i> sp.	3,25abA	3,75aA	3,41bcA
<i>S. cerevisiae</i>	2,00bA	2,94aA	2,10cA

Tratamentos seguidos por letras distintas minúsculas na coluna e maiúsculas na linha diferem entre pelo teste de Kruskal-Wallis e de Mann-Whitney U, a 0,05 de significância das amostras independentes

Sem inoculação de nematoídeos houve diferença entre aplicação de *S. cerevisiae* em relação a *B. thuringiensis*, *B. subtilis*, *Trichoderma* spp. e LMXBIO, porém, todos foram similares à testemunha. Com inoculação de *M. incognita* não houve diferença entre os micro-organismos. Para *M. javanica*, menor peso seco da parte aérea foi observado para *S. cerevisiae* em relação aos demais micro-organismos, com exceção de *Rhizobium* sp., o qual se diferiu de *B. subtilis*.

Nesse estudo, a aplicação de suspensão de *S. cerevisiae* mostrou-se prejudicial ao desenvolvimento da raiz de tomateiro, na inoculação de *M. javanica*, com resultados inferiores a testemunha. Isso não corrobora com os resultados já relatados. Zanardo (2009), não verificou diferença entre o peso seco de parte aérea de plantas de soja tratadas com extrato bruto autoclavado de *S. cerevisiae* em relação à testemunha não tratada. A aplicação da levedura ( $1 \times 10^8$  UFC.kg<sup>-1</sup> de solo) incrementou o peso seco da parte aérea da berinjela em 54,3%, inoculada com *M. javanica* (MOKBEL; ALHARBI, 2014). Sendo assim, o que pode justificar a ineficácia do micro-organismo ao desenvolvimento das raízes, nesse trabalho, são as características do isolado utilizado.

Há controvérsias em relação ao efeito dos outros micro-organismos testados e outros trabalhos. A inoculação de *Trichoderma* sp. ao solo aumentou a massa seca de parte aérea de plantas de feijoeiro inoculadas com *Meloidogyne* sp. (BORGES *et al.*, 2013). Combinações de isolados de rizobactérias (DFs185/306; DFs185/418; DFs185/306/418 e DFs185/416/418), avaliados no controle biológico *M. graminicola* na cultura do arroz aumentaram o peso seco da parte aérea em relação à testemunha (SOUZA JÚNIOR *et al.*, 2010). Todos os isolados de *B. thuringiensis* testados por Khan *et al.* (2010), aumentaram o peso seco de parte aérea do feijoeiro e do quiabeiro. Na cultura do feijoeiro infestada com nematoide das galhas, Dawar, Tariq e Zaki, (2008) obtiveram incremento da massa seca da parte aérea da planta com aplicação de *B. subtilis* e *B. thuringiensis*.

Para fator de reprodução dos nematoides , os resultados são expressos na Tabela 08.

**TABELA 08.** Fator de reprodução de *M. incognita* e *M. javanica* em plantas de tomate, tratadas com micro-organismos. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2015.

Micro-organismos	<i>M. incognita</i>	<i>M. javanica</i>
Testemunha	4,66aA	4,21aA
<i>S. cerevisiae</i>	5,36aA	3,34abA
<i>B. thuringiensis</i>	1,80abA	2,61abA
LMXBIO	2,36abA	1,91abA
<i>Rhizobium</i> sp.	3,06abA	1,11bA
<i>B. subtilis</i>	2,28abA	1,17bA
<i>Trichoderma</i> spp.	1,57bA	1,81abA

Tratamentos seguidos por letras distintas minúsculas na coluna e maiúsculas na linha diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis e de Mann-Whitney U, a 0,05 de significância das amostras independentes.

Para *M. incognita*, *Trichoderma* spp. reduziu o fator de reprodução em relação à testemunha. Para *M. javanica* essa redução foi observada com *Rhizobium* sp. e *B. subtilis*. Independente do micro-organismo aplicado, o fator de reprodução de *M. incognita* não diferiu de *M. javanica*.

Assim como nesse trabalho, a aplicação de *Trichoderma* sp. ao solo reduziu o fator de reprodução de *M. incognita* no feijoeiro (BORGES *et al.*, 2013). Segundo os autores, ovos de *M. incognita* foram parasitados pelo fungo *Trichoderma* sp. quando aplicado ao solo, o que provavelmente ocorreu nesse trabalho. *Trichoderma* sp. tem sido estudado por produzir uma série de enzimas extracelulares com atividade

antimicrobiana e por sua capacidade de degradar a parede celular (MENEZES; SOUZA, 1995).

Segundo Harman *et al.* (2004), tais enzimas como quitinase e protease, com atividade antifúngica, participam da relação de interação de *Meloidogyne* spp. e *Trichoderma* sp. O número dessas enzimas e metabólitos extracelulares chega a mais de 100 compostos conhecidos. Além disso, *Trichoderma* sp. tem a capacidade de indução dos mecanismos de defesa do hospedeiro (FREITAS *et al.*, 2012), compete por exsudatos liberados no desenvolvimento radicular, inibindo a eclosão de ovos pela falta de estímulo ocasionado pela redução ou falta do exsudatos (HARMAN *et al.*, 2004).

A redução do fator de reprodução de *M. javanica* ocasionado por *B. subtilis* ocorreu pelo fato da bactéria ser um agente eficiente de controle biológico, principalmente, pela produção de antibióticos que interferem no estímulo à eclosão dos ovos dos nematoides (MATSUNO *et al.*, 1992).

De forma geral, o controle biológico de nematoides por rizobactérias pode acontecer pela paralisação do ciclo ou, pelo menos pela redução da capacidade reprodutiva do parasita. Além disso, a transformação dos exsudados radiculares em subprodutos faz com que o nematode não reconheça o estímulo quimiotrópico e continue movimentando-se no solo até morrer. As rizobactérias ou seus metabólitos desencadeiam reações de hipersensibilidade nas células vegetais, impedindo que as fêmeas dos nematoides consigam energia suficiente para produzir ovos, e induzem resistência na planta (FREITAS, 2001; MACIEL; FERRAZ, 1996).

Estudando a interferência de *B. subtilis* em etapas do ciclo de vida de *Heterodera glycines* e infecção do nematode em raízes de soja, Araújo, Silva e Araújo (2002), verificaram que a bactéria afetou a orientação do nematode reduzindo a migração em direção à raiz. De acordo com os autores, isso ocorreu devido à degradação bacteriana dos componentes dos exsudatos que estimulam a migração dos juvenis recém-eclodidos. Além disso, ocorre redução na penetração nas raízes devido à habilidade da bactéria envolver-se ou ligar-se às lectinas da superfície das raízes.

Colocando *R. etli* G12 numa parte separada da raiz para controlar *M. javanica*, Fabry *et al.* (2007) observaram bons resultados no controle do patógeno. Segundo os autores os mecanismos de ação são indiretos, relacionados à indução de resistência sistêmica, translocada para toda planta a partir de um ponto inicial de colonização.

Apesar da composição do produto LMXBIO conter os micro-organismos *B. subtilis*, *Trichoderma* spp. e *Rhizobium* sp, não foi evidenciada eficiência no controle de *M. incognita* e *M. javanica*. Na prática, deveria ocorrer uma eficiência de forma combinada, relacionada com mais de um mecanismo de controle biológico, resultando em um nível mais elevado de proteção (BOER *et al.*, 2003). Porém, o que pode ser afirmado nesse contexto, é que possivelmente a competição dos micro-organismos da formulação por nutrientes, espaço e oxigênio desestabilizou a comunidade microbiana original do bioformulado (BERNARDO; BETTIOL, 2010; MAGRINI *et al.*, 2011), além de antibiose entre os micro-organismos, o que não apresentou resultados satisfatórios. Com o uso combinado de *B. firmus* e *P. lilacinus*, Anastasiadis *et al.* (2008) observaram maior redução no número de ovos nas raízes de tomateiro infestadas com *Meloidogyne* spp.

Para número de ovos, juvenis e adultos de *Meloidogyne* sp. por grama de raiz, os resultados são apresentados na Tabela 09.

**TABELA 09.** Ovos, juvenis e adultos de *M. incognita* e *M. javanica* por grama de raiz de plantas de tomate, tratadas com micro-organismos. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2015.

Micro-organismos	<i>M. incognita</i>	Redução (%)	<i>M. javanica</i>	Redução (%)
<i>S. cerevisiae</i>	3753,00aA	+ 97,92	2191,74aA	+ 17,05
Testemunha	1896,15aA	-	1872,35aA	-
<i>Rhizobium</i> sp.	1151,84aA	39,25	428,72abA	77,10
<i>Trichoderma</i> spp.	849,19aA	55,21	425,13abA	77,29
<i>B. subtilis</i>	632,12abA	66,66	236,86bA	87,34
LMXBIO	613,56abA	67,64	547,52abA	70,75
<i>B. thuringiensis</i>	549,37bA	71,02	604,2abA	67,70

Tratamentos seguidos por letras distintas minúsculas na coluna e maiúsculas na linha diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis e de Mann-Whitney U, a 0,05 de significância das amostras independentes.

*B. thuringiensis* reduziu em 71,02% o número de ovos, juvenis e adultos de *M. incognita* por grama de raiz do tomateiro em relação à testemunha. Para *M. javanica*, foi observada eficiência com *B. subtilis*, com redução de 87,34% em relação à testemunha. Independente do micro-organismo aplicado, não houve diferença entre as médias de *M. incognita* e *M. javanica* (TABELA 09).

Apesar do *B. thuringiensis* não ter reduzido o fator de reprodução em relação à testemunha (TABELA 08), apresentou o menor número de ovos, juvenis e adultos por

grama de raiz na inoculação de *M. incognita* (TABELA 09) como consequência do bom desenvolvimento radicular proporcionado pela bactéria (TABELA 04). Sendo que o contrário ocorreu com *Trichoderma* spp. Para *M. javanica* os resultados com aplicação de *B. subtilis* seguiram a mesma tendência em relação ao fator de reprodução. Porém, para *Rhizobium* sp. a redução do fator de reprodução (TABELA 08) não refletiu na redução do número de ovos, juvenis e adultos por grama de raiz (TABELA 09).

Assim como neste trabalho, a aplicação de *B. subtilis* no solo para controle de *Meloidogyne* spp. em tomateiro, Araújo e Marchesi (2009) verificaram redução significativa no número de juvenis e massa de ovos por raiz. Isolados de *B. thuringiensis* e *Rhizobium leguminosarum* reduziram o número de galhas de *M. incognita* em plantas de berinjela em até 94,55 a 96,36%, respectivamente (ASHOUB; AMARA, 2010). Ao contrário dos resultados obtidos, Vaz *et al.* (2011) não obtiveram reduções significativas no número de ovos e galhas de *M. incognita* e *M. javanica* na microbiolização de sementes de tomateiro com de *B. subtilis*.

A aplicação de *R. etli* isolado G12 reduziu o número de ovos e galhas de *M. javanica* em raízes de tomateiro em 38,8 e 35,34%, respectivamente, em sistema de raiz bipartida (FABRY *et al.*, 2007). Segundo os autores, o mecanismo de ação que envolve o biocontrole de fitonematoídes pelas rizobactérias é resultante da indução de resistência sistêmica em plantas, porém não apresenta efeito sobre o crescimento das plantas, o que corrobora com os resultados encontrados nesse trabalho.

#### 4. CONCLUSÕES

*Trichoderma* spp. foi eficiente na redução de *M. incognita* no tomateiro. *B. subtilis* e *Rhizobium* sp. foram eficazes na redução de *M. javanica* no tomateiro.

## REFERÊNCIAS

- ABRÃO, M.M.; MAZZAFERA, P. Efeitos do nível de inóculo de *Meloidogyne incognita* em algodoeiro. **Bragantia**, Campinas, v. 60, n. 1, p. 19-26, 2001. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0006-87052001000100003&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0006-87052001000100003&script=sci_arttext)>. Acesso em: 27 dez. 2014.
- ANASTASIADIS, I.A.; GIANNAKOU, I.O.; PROPHETOU-ATHANASIADOU, D.A.; GOWEN, S.R. The combined effect of the application of a biocontrol agent *Paecilomyces lilacinus*, with various practices for the control of root-knot nematodes. **Crop Protection**, Kidlington, v. 27, p. 352–361, 2008. Disponível em: <<http://centaur.reading.ac.uk/8253/>>. Acesso em: 27 dez. 2014.
- ANDREOTE, F. D.; GULLO, M. J. M.; SOUZA LIMA, A. O.; JUNIOR, W. M.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Impact of genetically modified *Enterobacter cloacae* on indigenous endophytic community of Citrus sinensis seedlings. **Journal of Microbiology**, Seoul, v. 42, n. 3, p. 169-173, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15459643>>. Acesso em: 27 dez. 2014.
- ARAÚJO, F. F.; HENNING, A.; HUNGRIA, M. Phytohormones and antibiotics produced by *Bacillus subtilis* and their effects on seed pathogenic fungi and on soybean root development. **World Journal of Microbiology e Biotechnology**, Dordrecht, v. 21, p. 1639-1645, 2005. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11274-005-3621-x>>. Acesso em: 23 nov. 2014.
- ARAÚJO, F.F., MARCHESI, G.V.P. Uso de *Bacillus subtilis* no controle da meloidoginose e na promoção do crescimento do tomateiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 5, p. 1558-1561, 2009. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-84782009000500039&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-84782009000500039&script=sci_arttext)>. Acesso em: 27 dez. 2014.
- ARAÚJO, F.F.; MENEZES, D. Indução de resistência a doenças foliares em tomateiro por indutores biótico (*Bacillus subtilis*) e abiótico (Acibenzolar-S-Metil). **Summa phytopathologica**, Botucatu, v. 35, n. 3, p. 169-172, 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/sp/v35n3/a01v35n3.pdf>>. Acesso em: 23 nov. 2014.
- ARAÚJO, F.F.; SILVA, J.F.V.; ARAÚJO, A.S.F. Influência de *Bacillus subtilis* na eclosão, orientação e infecção de *Heterodera glycines* em soja. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 2, p. 197-202, 2002. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84782002000200003](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782002000200003)>. Acesso em: 23 dez. 2014.
- ASHOUB, A.H.; AMARA, M.T. Biocontrol activity of some bacterial genera against *Root-knot nematode*, *Meloidogyne incognita*. **Journal of American Science**, Stanford, v. 6, n. 10, p. 321-328, 2010. Disponível em: <[http://www.jofamericanscience.org/journals/am-sci/am0610/36\\_3079am0610\\_321\\_328.pdf](http://www.jofamericanscience.org/journals/am-sci/am0610/36_3079am0610_321_328.pdf)>. Acesso em: 27 dez. 2014.

BEIGUELMAN, B. **Curso prático de bioestatística**. São Paulo: FUNPEC, 2002.

BERGGREN, J.W.; VAN-VUURDE, L.; MARTEENSSON, A.M. Factors influencing the effect of deleterious *Pseudomonas putida* rhizobacteria on initial infection of pea roots by *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*. **Application Soil Ecology**, Londres, v. 17, p. 97-105, 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0929139301001305>>. Acesso em: 27 dez. 2014.

BERNARDO, E. R. A.; BETTIOL, W. Controle da pinta preta dos frutos cítricos em cultivo orgânico com agentes de biocontrole e produtos alternativos. **Tropical plant pathology**, Brasília, v. 35, n. 1, p. 37-42, 2010. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1982-56762010000100006&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1982-56762010000100006&script=sci_arttext)>. Acesso em: 27 dez. 2014.

BOER, M.; BOM, P.; KINDT, F.; KEURENTJES, J.J.B.; SLUIS, I.; LOON, L.C.; BAKKER, P.A.H.M. Control of *Fusarium* wilt of radish by combining *Pseudomonas putida* strains that have different disease-suppressive mechanisms. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 93, n. 5, p. 626-632, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18942986>>. Acesso em: 21 dez. 2014.

BONETI, J. I. S.; FERRAZ, S. Modificação do método de Hussey e Barker para a extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de cafeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 6, n. 3, p. 553, 1981. Suplemento.

BORGES, F.G.; BATTISTUS, A.G.; MULLER, M.A.; MORANZA, T.M.; KUHN, O.J. Manejo alternativo de nematoídes de galha (*Meloidogyne incognita*) em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*). **Scientia Agraria Paranaensis**, Marechal Cândido Rondon, v. 12, p. 425-433, 2013. Disponível em: <<http://e-revista.unioeste.br/index.php/scientiaagaria/article/view/9573>>. Acesso em: 19 dez. 2014.

CALLEGARI-JACQUES, S.M. **Bioestatística: princípios e aplicações**. Porto Alegre: ARTMED, 2003.

CAPRONI, C.M.; FERREIRA, S.; GONÇALVES, E.D.; SOUZA, A.G. Resposta às aplicações de *Trichoderma*, óleo de Nim e Vertimec no controle de nematoide na cultura do morango. **Revista Agrogeoambiental**, Pouso Alegre, v. 4, n. 3, 2012. Disponível em: <<http://agrogeoambiental.if sulde minas.edu.br/index.php/Agrogeoambiental/article/viewFile/473/443>>. Acesso em: 24 mai. 2014.

COIMBRA, J.L.; CAMPOS, V.P. Efeito de exsudatos de colônias e de filtrados de culturas de actinomicetos na eclosão, motilidade e mortalidade de juvenis do segundo estádio de *Meloidogyne javanica*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 3, p. 232-238, 2005. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-41582005000300003&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-41582005000300003&script=sci_arttext)>. Acesso em: 27 out. 2014.

DAWAR, S.; TARIQ, M.; ZAKI, M.J. Application of *Bacillus* species in control of *Meloidogyne javanica* (treub) chitwood on cowpea and mash bean. **Pakistan Journal of Botany**, Karachi, v. 40, n.1, p. 439-444, 2008. Disponível em: <<http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/40%281%29/PJB40%281%29439.pdf>>. Acesso em: 20 dez. 2014.

FABRY, C.F.S. **Indução de resistência ao nematoide das galhas (*Meloidogyne* spp.) em tomateiro por rizobactérias.** 2006. 63 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2006. Disponível em: <[http://www.tede.ufv.br/tedesimplificado/tde\\_arquivos/15/TDE-2007-10-10T123730Z-809/Publico/texto%20completo.pdf](http://www.tede.ufv.br/tedesimplificado/tde_arquivos/15/TDE-2007-10-10T123730Z-809/Publico/texto%20completo.pdf)>. Acesso em: 20 dez. 2014.

FABRY, C.F.S.; FREITAS, L.G.; GODINHO, M.T.; NEVES, W.S.; FERRAZ, S. Resistência sistêmica a *Meloidogyne javanica* induzida por *Rhizobium etli*. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 31, n. 2, 2007. Disponível em: <<http://docentes.esalq.usp.br/sbn/nbonline/ol%20312/88-92%20pb.pdf>>. Acesso em: 18 abr. 2014.

FERNANDES, R.H.; LOPES, E.A.; VIEIRA, B.S.; BOMTEMPO, A.F. Controle de *Meloidogyne javanica* na cultura do feijoeiro com isolados de *Bacillus* spp. **Revista Tropica: Ciências Agrárias e Biológicas**, Chapadina, v.7, n.1, p. 76-81, 2013. Disponível em: <<http://www.periodicoseletronicos.ufma.br/index.php/ccaatropica/article/view/899>>. Acesso em: 20 dez. 2014.

FERREIRA, D.F. **SISVAR - Sistema de análise de variância.** Versão 5.10. Lavras-MG: UFLA, 2010.

FREITAS, L.G. Rizobacterias *versus* nematoides. In: REUNIÃO DE CONTROLE BIOLÓGICO DE FITOPATÓGENOS, 7., 2001. **Anais...** Bento Gonçalves: EMBRAPA Uva e Vinho, p. 25-35. 2001.

FREITAS, M.A.; PEDROSA, E.M.R.; MARIANO, R.L.R. MARANHÃO, S.R.V.L. Seleção de *Trichoderma* spp. como potenciais agentes de biocontrole de *Meloidogyne incognita* em cana-de-açúcar. **Nematropica**, Flórida, v. 42, n. 1, p. 115-122, 2012. Disponível em: <<http://journals.fcla.edu/nematropica/article/view/79590>>. Acesso em: 22 dez. 2014.

FIALHO, M.B.; BESSI, R.; INOMOTO, M.M.; PASCHOLATI, S.F. Nematicidal effect of volatile organic compounds (VOCs) on the plant-parasitic nematode *Meloidogyne javanica*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 38, n. 2, p. 152-154, 2012. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-54052012000200008](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-54052012000200008)>. Acesso em: 29 nov. 2014.

GUIMARÃES, T. M. **Multiplicação do nematoide *Meloidogyne javanica* em plantas invasoras e seu efeito sobre o desenvolvimento do manjericão.** 2012. 78 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade de Brasília, Brasília. 2012. Disponível em: <[http://repositorio.unb.br/bitstream/10482/12831/1/2012\\_ThassyaMenezesGuimaraes.pdf](http://repositorio.unb.br/bitstream/10482/12831/1/2012_ThassyaMenezesGuimaraes.pdf)>. Acesso em: 27 out. 2014.

HARMAN, G.E. Myth and dogmans of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 84, p. 377-393, 2000. Disponível em: <<http://www.hort.cornell.edu/bjorkman/lab/trichoweb/mythsanddogmas.pdf>>. Acesso em: 27 dez. 2014.

HARMAN, G.E.; HOWELL, C.R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* species- opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, Washington, v. 2, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15035008>>. Acesso em: 27 dez. 2014.

IBM CORP. **SPSS, Statistics for Windows, Version 20.0**. Armonk, New York. 2011.

JENKINS, W. R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Reporter**, Saint Paul, v. 48, p. 692, 1964. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_nlinks&ref=000049&pid=S0103-9016199600020000500004&lng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000049&pid=S0103-9016199600020000500004&lng=en)>. Acesso em 19 dez. 2014.

JOUZANI, G.S.; SEIFINEJAD, A.; SAEEDIZADEH, A.; NAZARIAN, A.; YOUSEFLOO, M.; SOHEILIVAND, S.; MOUSIVAND, M.; JAHANGIRI, R.; YAZDANI, M.; AMIRI, R.M.; AKBARI, S. Molecular detection of nematicidal crystalliferous *Bacillus thuringiensis* strains of Iran and evaluation of their toxicity on free-living and plant-parasitic nematodes. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 54, n. 10, p. 812-822, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1139/W08-074>>. Acesso em: 28 dez. 2014.

KARAJEH, M.R. Efficacy of *Saccharomyces cerevisiae* on controlling the root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*) infection and promoting cucumber growth and yield under laboratory and field conditions. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, Berlin, v. 46, n. 20, p. 2492-2500, 2013. Disponível em: <[http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/03235408.2013.799819#.VFDqyLF\\_4Y](http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/03235408.2013.799819#.VFDqyLF_4Y)>. Acesso em: 27 dez. 2014.

KHAN, M.Q.; WASSEM, M.A.; ZAKI, M.J.; KHAN, S.A. Evaluation of *Bacillus thuringiensis* isolates against root-knot nematodes following seed application in okra and mungbean. **Pakistan Journal of Botany**, Karachi, v. 42, n. 4, p. 2903-2910, 2010. Disponível em: <[http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/42\(4\)/PJB42\(4\)2903.pdf](http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/42(4)/PJB42(4)2903.pdf)>. Acesso em: 28 dez. 2014.

KLOEPER, J.W.; RODRIGUEZ-UBANA, R.; ZEHNDER, G.W.; MURPHY, J.F.; SIKORA, E.; FERNÁNDEZ, C. Plant root-bacterial interactions in biological control of soilborne diseases and potential extension to systemic and foliar diseases. **Australasian Plant Pathology**, Orange v. 28, n. 1, p. 21-26, 1999. Disponível em: <<http://www.bashanfoundation.org/kloepper/kloepersoilborne.pdf>>. Acesso em: 27 out. 2014.

LI, X.Q.; TAN, A.; VOEGTLIN, M.; BEKELE, S.; CHEN, C.S.; AROIAN, R.V. Expression of Cry5B protein from *Bacillus thuringiensis* in plant roots confers resistance to root-knot nematode. **Biological Control**, Orlando, v. 47, n. 1, p. 97-102,

2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.06.007>>. Acesso em: 28 dez. 2014.

**LMXBIO: Probiótico e Bioativador.** 2014. Online. Disponível em: <<http://www.lmxbio.com.br/>>. Acesso em: 27 dez. 2014.

LOPES, E.A.; FERRAZ, S.; FERREIRA, P.A.; FREITAS, L.G.; DHINGRA, Q.D.; GARDIANO, C. G.; CARVALHO, S.L. Potencial de isolados de fungos nematófagos no controle de *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 31, n. 2, p. 20-26, 2007. Disponível em: <<http://docentes.esalq.usp.br/sbn/nbonline/ol%20312/78-84%20pb.pdf>>. Acesso em: 13 dez. 2014.

LOPES, C.A.; SANTOS, J.R.M. **Doenças do tomateiro**. Brasília: Embrapa-SPI, 1994. 67p.

MACIEL, S.L.; FERRAZ, L.C.C.B. Reprodução de *Meloidogyne incognita* raça 2 e de *Meloidogyne javanica* em oito espécies de plantas medicinais. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.53, n. 2-3, p. 956-960, 1996. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-90161996000200007](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-90161996000200007)>. Acesso em: 14 dez. 2014.

MAGRINI, F.E.; CAMATTI-SARTORI, V.; FINKLER, R.; TORVES, J.; VENTURIN, L. Características químicas e avaliação microbiológica de diferentes fases de maturação do biofertilizante Bokashi. **Revista Agrarian**. Dourados, v. 4, n. 12, p. 146-151, 2011. Disponível em: <<http://www.periodicos.ufgd.edu.br/index.php/agrarian/article/view/1136/741>>. Acesso em: 14 dez. 2014.

MANJULA, K.; PODILE, A.R. Increase in seedling emergence and dry weight of pigeon pea in the field with chitin-supplemented formulation of *Bacillus subtilis* AF1. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 21, p. 1057-1062, 2005. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11274-004-8148-z>>. Acesso em: 29 nov. 2014.

MARROCOS, S.T.P.; NOVO JUNIOR, J.; GRANGEIRO, L.C.; AMBROSIO, M.M.Q.; CUNHA, A.P.A. Composição química e microbiológica de biofertilizantes em diferentes tempos de decomposição. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 25, n. 4, p. 34-43, 2012. Disponível em: <[http://periodicos.ufersa.edu.br/revistas/index.php/sistema/article/viewFile/2557/pdf\\_24](http://periodicos.ufersa.edu.br/revistas/index.php/sistema/article/viewFile/2557/pdf_24)>. Acesso em: 29 nov. 2014.

MATSUNO, Y.; ANO, T.; SHODA, M. Cloning of a gene responsible for the specific production of an antifungal antibiotic iturin with n-C<sub>16</sub>-b-amino acid residue. **Journal of General and Applied Microbiology**, Tokyo, v. 38, p. 505-509, 1992. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_nlinks&ref=000078&pid=S0103-8478200200020000300007&lng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000078&pid=S0103-8478200200020000300007&lng=pt)>. Acesso em: 29 nov. 2014.

MENEZES, M; SOUZA, E.E.B. Avaliação de isolados de *Trichoderma* através da análise eletroforética em gel de poliacrilamida. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, 20, p. 308, 1995. Suplemento. Disponível em: <<http://www>>

[scielo.oces.mctes.pt/scielo.php?script=sci\\_nlinks&ref=000167&pid=S0871-018X201300020000700041&lng=pt](http://scielo.oces.mctes.pt/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000167&pid=S0871-018X201300020000700041&lng=pt). Acesso em: 29 nov. 2014.

MOKBEL, A.A.; ALHARBI, A.A. Suppressive effect of some microbial agents on root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* infected eggplant. **Australian Journal of Crop Science**, Sydney, v. 8, n. 10, p. 1428-1434, 2014. Disponível em: <[http://www.cropj.com/mokbel\\_8\\_10\\_2014\\_1428\\_1434.pdf](http://www.cropj.com/mokbel_8_10_2014_1428_1434.pdf)>. Acesso em: 29 nov. 2014.

PRAÇA, L.B.; CAIXETA, C.F.; JUSTEN, F.; GOMES, A.C.M.M.; MARTINS, E.S.; SUJII, E.R. MONNERAT, R.G. Colonização endofítica de plantas de repolho por estirpes brasileiras de *Bacillus thuringiensis* para o controle de insetos-praga. In: 13º SINCOBIO, 2013. **Anais...** Bonito- MS: 2013. Disponível em: <<http://seb.org.br/cd/trabalhos/oral/APORAL50.pdf>>. Acesso em: 29 nov. 2014.

REITZ, M.; RUDOLPH, K.; SCHRODER, I.; HOFFMANN-HERGARTEN, S.; HALLMANN, J.; SIKORA, R.A. Lipopolysaccharides of *Rhizobium etli* strain G12 act in potato roots as an inducing agent of systemic resistance to infection by the cyst nematode *Globodera pallida*. **Applied and Environment Microbiology**, Washington, v. 66, n. 8, p. 3515-3518, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC92179/>>. Acesso em: 29 nov. 2014.

SAHEBANI, N.; HADAVI, N. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 40, n. 8, p. 2016–2020, 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0038071708001193>>. Acesso em: 30 nov. 2014.

SANTOS, M.A.; FERRAZ, S.; MUCHOVEJ, J.J. Evaluation of 20 species of fungi from Brazil for biocontrol of *Meloidogyne incognita* race 3. **Nematópica**, Flórida, v. 22, n. 2, p. 183-192, 1992. Disponível em: <<http://journals.fcla.edu/nematropica/article/view/64041/61709>>. Acesso em: 27 dez. 2014.

SOUZA JÚNIOR, I.T.; MOURA, A.B.; SCHAFER, J.T.; CORRÊA, B.O.; GOMES, C.B. Biocontrole da queima-das-bainhas e do nematoide-das-galhas e promoção de crescimento de plantas de arroz por rizobactérias. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 11, p. 1259-1267, 2010. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/pab/v45n11/05.pdf>>. Acesso em: 27 dez. 2014.

TIAN, B.Y.; YANG, J.K.; LIAN, L.H.; WANG, C.Y.; ZHANG, K.Q. Role of neutral protease from *Brevibacillus laterosporus* in pathogenesis of nematode. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 74, n. 2, p. 372-380, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17109172>>. Acesso em: 27 dez. 2014.

VERMA, S. C.; LADHA, J. K.; TRIPATHI, A. K. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. **Journal of Biotechnology**, Londres, v. 91, p. 127-141, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11566385>>. Acesso em: 27 dez. 2014.

VAZ, M.V.; CANEDO, E.J.; MACHADO, J.C.; VIEIRA, B.S.; LOPES, E.A. Controle biológico de *Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne incognita* com *Bacillus subtilis*.

**Perquirere**, Patos de Minas n. 8, v. 1, p. 203-2012, 2011. Disponível em:

<[http://perquirere.unipam.edu.br/documents/23456/50270/controle\\_biologico.pdf](http://perquirere.unipam.edu.br/documents/23456/50270/controle_biologico.pdf)>.

Acesso em: 11 nov. 2014.

WULFF, N.A.; PASCHOLATI, S.F. Partial characterization of sorghum phytoalexin elicitors isolated from *Saccharomyces cerevisiae*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 3, p. 428-435, 1999. Disponível em:

<[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_nlinks&ref=000106&pid=S1517-8382200600020001500025&lng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000106&pid=S1517-8382200600020001500025&lng=en)>. Acesso em: 29 nov. 2014.

ZANARDO, N. M. T. **Purificação parcial de frações de *Saccharomyces cerevisiae* indutoras de resistência contra antracnose e avaliação de agentes bióticos (*S. cereviciae* e Agro-Mos) e abiótico (Bion) na indução de resistência contra inseto (*Tuta absoluta* x tomateiro), nematoide (*Meloidogyne incognita* x pepineiro) e organismo não alvo (*Bradyrhizobium elkanii* x soja)**. 2009. 98 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agronomia “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2009. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11138/tde-10092009-091437/pt-br.php>>. Acesso em: 24 nov. 2014.

## CAPÍTULO II: Compatibilidade de *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, *Rhizobium* sp., *Saccharomyces cerevisiae* e *Trichoderma* spp. a agroquímicos

### RESUMO

O uso de agentes de controle biológico com a aplicação de produtos químicos vem se tornando hábito entre os produtores. Porém o efeito provocado pelos produtos químicos na ação desses micro-organismos precisa ser estudado. O objetivo deste trabalho foi avaliar a sensibilidade dos micro-organismos *B. subtilis*, *B. thuringiensis*, *Rhizobium* sp., *S. cerevisiae* e *Trichoderma* spp. à agroquímicos que são utilizados no cultivo do tomate. Foram testados os agroquímicos: imidacloprido, benalaxil + mancozeb, casugamicina e metribuzim, cada um em 5 concentrações (não diluído,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ). A concentração recomendada para o tomateiro corresponde a diluição  $10^{-2}$ . Para *B. subtilis*, *B. thuringiensis*, *Rhizobium* sp. e *S. cerevisiae* foram avaliados o halo de inibição através de antibiogramas. Para *Trichoderma* sp. foi avaliada a velocidade média de crescimento do fungo ( $\text{mm.h}^{-1}$ ), adicionando os produtos ao meio de cultura BDA. Nas concentrações recomendadas para o tomateiro, o fungicida benalaxil + mancozeb inibiu o crescimento de *B. thuringiensis* e *Rhizobium* sp.; o herbicida metribuzim inibiu o crescimento de *B. thuringiensis* e reduziu a velocidade de crescimento micelial do *Trichoderma* sp.; e o bactericida casugamicina inibiu o crescimento da *B. thuringiensis*. Nenhum agroquímico, nas concentrações recomendadas para o tomateiro, inibiu o crescimento de *B. subtilis* e *S. cerevisiae*. O inseticida imidacloprido não interferiu no desenvolvimento de nenhum dos micro-organismos avaliados.

**Palavras-chaves:** defensivos, micro-organismos, sensibilidade.

## **CHAPTER II: Compatibility of *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, *Rhizobium* sp., *Saccharomyces cerevisiae* and *Trichoderma* spp. to agrichemicals**

### **ABSTRACT**

The use of biological control agents with the application of pesticides has become a habit among producers. However, the effect caused by the action of these chemicals on microorganisms need to be studied. This study evaluated the sensitivity of the microorganisms *B. subtilis*, *B. thuringiensis*, *Rhizobium* sp., *S. cerevisiae* and *Trichoderma* spp. to pesticides that are used early in the tomato crop. The agrichemicals imidacloprid, benalaxil + mancozeb, kasugamycin and metribuzim, each in five concentrations (undiluted,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ) were tested. Recommended concentration for tomato crop correspond to the dilution  $10^{-2}$ . The inhibition zone was evaluated, for *B. subtilis*, *B. thuringiensis*, *Rhizobium* sp. and *S. cerevisiae*, through antibiograms. The average speed of fungal growth ( $\text{mm.h}^{-1}$ ), adding the products to BDA culture medium, was determined for *Trichoderma* sp. Using the recommended concentrations for tomato, the fungicide benalaxil + mancozeb inhibited growth of *B. thuringiensis* and *Rhizobium* sp.; metribuzim inhibited growth of *B. thuringiensis* and reduced radial growth rate of *Trichoderma* sp.; kasugamycin inhibited the growth of *B. thuringiensis*. No agrichemicals, at the recommended concentrations for tomato crop, inhibited growth of *B. subtilis* or *S. cerevisiae*. The insecticide imidacloprid did not affect the development of any of the studied microorganisms.

**Keywords:** pesticides, microorganisms, sensitivity.

## **1 INTRODUÇÃO**

No manejo de fitonematoides, o controle biológico apresenta uma série de vantagens em relação ao químico, pois não contamina e não desequilibra o meio ambiente e nem deixa resíduos no solo (SOARES, 2006). Mas apesar da crescente utilização do controle biológico, o controle químico é bastante empregado. Em muitos casos é a única ferramenta para o controle de pragas e doenças, conferindo uma maior rentabilidade de produção (SILVA, 2011).

O uso de agentes de controle biológico em campo associado a aplicação de produtos químicos como fungicidas, por exemplo, vem se tornando hábito entre os produtores (SILVA, 2011). Deve-se ter cautela, pois no caso de fungos, a preservação da viabilidade dos conídios é de extrema importância, pois estas estruturas são as responsáveis pela sobrevivência e desenvolvimento posterior (DUARTE *et al.*, 1992).

O efeito provocado pelos produtos químicos na ação desses micro-organismos ainda vem sendo estudado e necessita de especial atenção (RIBAS, 2010). Os agroquímicos utilizados na proteção das culturas podem ter efeitos antagônicos, nulos ou sinérgicos sobre a atividade de micro-organismos de controle biológico (BENZ, 1987 In: NUNES, 2008). Por esse motivo, para a comercialização desses antagonistas são necessárias muitas pesquisas preliminares para conhecer a compatibilidade destes produtos sobre as diversas fases de desenvolvimento dos biocontroladores, pois sua performance em campo pode ser bastante inconsistente (NUNES, 2008; RIBAS, 2010).

Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a sensibilidade dos micro-organismos *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, *Rhizobium* sp., *Saccharomyces cerevisiae* e *Trichoderma* spp. a agroquímicos utilizados na cultura do tomate.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

O experimento foi realizado no Laboratório de Bacteriologia Vegetal (LABAC) da Universidade Federal de Uberlândia no período de junho a setembro de 2014.

Foi determinada a compatibilidade dos micro-organismos *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, *Rhizobium* sp., *Saccharomyces cerevisiae* e *Trichoderma* spp. a

quatro agroquímicos registrados para cultura do tomate. Foram utilizados os seguintes agroquímicos (MAPA, 2014):

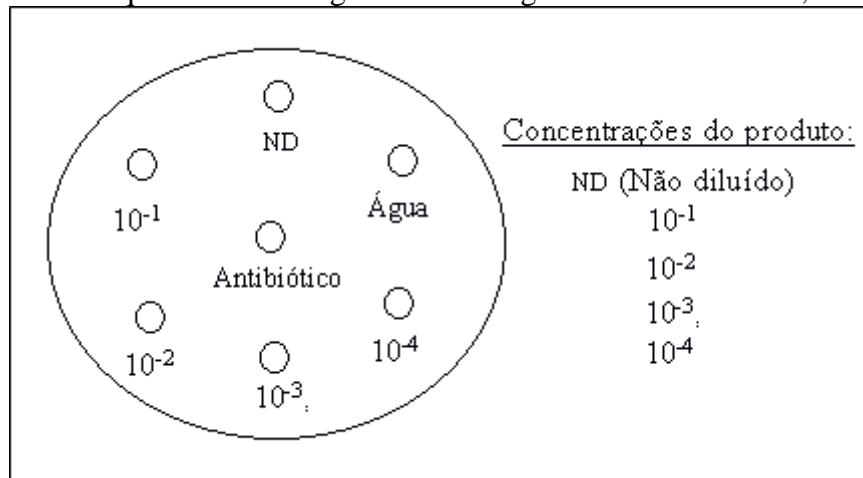
- Imidacloprido (Evidence 700WG- Granulado dispersível). Inseticida sistêmico do grupo neonicotinoide. Recomendado para controle de pragas em geral. Dose recomendada: 200 g.ha<sup>-1</sup> com 300 L.ha<sup>-1</sup> de calda.
- Benalaxyl + Mancozebe (Galben-M - pó molhável). Fungicida sistêmico do grupo químico dos acilalaninato ou fenilamidas (Benalaxyl) e ditiocarbamato (Mancozebe). Recomendado para controle de *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, no início do florescimento da cultura. Dose recomendada: 200 kg.ha<sup>-1</sup> com 1.000 L.ha<sup>-1</sup> de calda.
- Casugamicina (Kasumin – Concentrado solúvel). Fungicida/bactericida, antibiótico. Recomendado para controle preventivo de *Clavibacter michiganensis* subst. *michiganensis* (Smith). Dose recomendada: 300 mL.100L d' água com 1200 L.ha<sup>-1</sup> de calda.
- Metribuzim (Sencor 480- Suspensão concentrada). Herbicida pré e pós-emergente, seletivo residual do grupo triazinona. Recomendado para controle de plantas daninhas de folhas largas. Dose recomendada: 1 L.ha<sup>-1</sup> com 400 L.ha<sup>-1</sup> de calda.

## **2.1 *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, *Rhizobium* sp. e *Saccharomyces cerevisiae***

Na avaliação das três bactérias (*B. subtilis*, *B. thuringiensis*, *Rhizobium* sp.) e da levedura (*S. cerevisiae*) foram montados antibiogramas. Para isso, foi adotada a metodologia descrita por Romeiro (2001), utilizando antibiogramas para avaliar a toxidez direta dos agroquímicos através do halo de inibição do crescimento em meio de cultura. Para tal, dez mL de cada suspensão bacteriana ou da levedura (10<sup>8</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>) foram adicionados ao meio Nutriente Líquido (NL) para cultivo sob agitação a 150 rpm a 28°C por 24h. Em placa de Petri foi vertida uma camada básica de meio agar-água (2%). Em seguida ao meio de cultura 523 Kado & Heskett semissólido (0,8% de ágar), em temperatura fundente foi adicionado, o NL contendo o micro-organismo cultivado, que então foi vertido sobre a camada básica. Em seguida foram colocados sobre o meio de cada placa (FIGURA 02), sete discos de papel de filtro estéril (6 mm de diâmetro) e

adicionados 10 $\mu$ L das concentrações dos produtos. As placas foram incubadas em BOD a 28 °C. A avaliação dos halos de inibição foi realizada após 48 horas de incubação determinando-se o diâmetro do halo.

**FIGURA 02.** Esquema de montagem de antibiograma. Fonte: MOTA, 2015.



Para cada produto, o delineamento foi inteiramente casualizados (DIC), com sete tratamentos: concentrações (não diluído, 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup>), água (testemunha) e antibiótico ou antifúngico, com quatro repetições. Para *B. subtilis* e *B. thuringiensis* foi utilizado o antibiótico estreptomicina (500  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>). Para *Rhizobium* sp. o antibiótico cefalexina (200  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>) e para *S. cerevisiae* o antifúngico nitrato de miconazol (2%). Considerando o volume de calda, a dose recomendada pelo MAPA (2015) para a cultura do tomate, de cada produto, correspondeu aproximadamente à diluição 10<sup>-2</sup>.

Os dados obtidos foram submetidos aos testes de normalidade (Teste de Shapiro Wilk) e de homogeneidade do erro experimental (Teste de Levene) pelo programa estatístico SPSS Statistics vs. 20 (IBM CORP, 2011). As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa estatístico Sisvar versão 5.10 (FERREIRA, 2010) e as comparações entre os tratamentos foram realizadas pelo teste Tukey a 0,05 de significância.

## 2.2 *Trichoderma* sp.

O efeito dos produtos sobre o *Trichoderma* sp. foi avaliado pelo crescimento do fungo em meio de cultura com a presença dos produtos, de acordo com metodologia de Pandolfo (2007). Para cada produto, o delineamento experimental foi inteiramente

casualizados (DIC) com seis tratamentos: não diluído,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  e testemunha (sem produto), com quatro repetições. A concentração do produto no meio foi estabelecida considerando o volume de meio utilizado, sendo que a recomendação do MAPA (2015) para a cultura do tomate correspondeu aproximadamente à diluição  $10^{-2}$ .

A adição do agroquímico, de acordo com cada concentração, foi feita no meio de cultura Batata-dextrose-ágar (BDA) depois de autoclavado e ainda líquido (40°C). Após o meio ser vertido em placa de Petri, a inoculação do *Trichoderma* sp. foi feita colocando um disco de colônia de 0,6 cm de diâmetro no centro da placa. As placas foram incubadas em câmara de crescimento, com temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 horas.

A avaliação do crescimento micelial consistiu na leitura a cada 24 h após o plaqueamento, do diâmetro da colônia com auxílio de régua milimetrada. As leituras foram concluídas quando o crescimento da colônia cobriu completamente o diâmetro da placa em um dos tratamentos, determinando-se a velocidade média de crescimento do fungo, através da fórmula de Lilly e Barnett (1951), citada por Jackisch-Matsuura e Menezes (1999):

$$V_{mc} = \frac{Ct_2 - Ct_1}{T}$$

Onde:

$V_{mc}$  = velocidade média de crescimento ( $mm.h^{-1}$ );

$Ct_1$  = crescimento no primeiro intervalo de tempo;

$Ct_2$  = crescimento no segundo intervalo de tempo;

T = intervalo de tempo considerado.

Os dados obtidos foram submetidos aos testes de normalidade dos resíduos (Teste de Shapiro-Wilk) e de homogeneidade do erro experimental (Teste de Levene) pelo programa estatístico SPSS Statistics vs. 20 (IBM, 2014). As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa estatístico Sisvar versão 5.10 (FERREIRA, 2010) e a comparações entre os tratamentos foram realizadas pelo teste Tukey a 0,05 de significância.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos halos de inibição de crescimento de *B. subtilis* com agroquímicos estão representados na Tabela 10.

**TABELA 10.** Halo de inibição ao crescimento (mm) de *Bacillus subtilis* com agroquímicos em diferentes diluições. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2015.

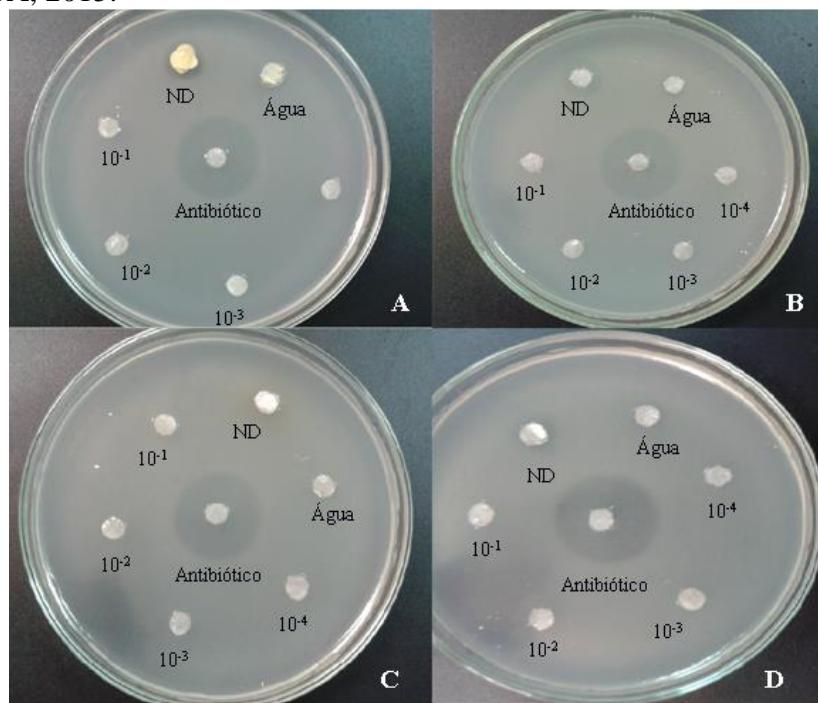
Diluições	Imidacloprido	Casugamicina <sup>1</sup>	Benalaxyl + Mancozebe <sup>1</sup>	Metribuzim <sup>1</sup>
Não diluído	0,00b	12,75b	12,00b	0,25b
$10^{-1}$	0,00b	10,00c	4,50c	0,00b
$10^{-2}$	0,00b	0,00d	0,00c	0,00b
$10^{-3}$	0,00b	0,00d	0,00c	0,00b
$10^{-4}$	0,00b	0,00d	0,00c	0,00b
Testemunha	0,00b	0,00d	0,00c	0,00b
Estreptomicina	22,75a	22,50a	22,50a	22,75a
CV (%)	17,44	11,57	37,57	26,15

<sup>1</sup>Dados transformados para  $\sqrt{x+1,0}$ . As médias originais são apresentadas. CV: Coeficiente de variação dos dados. Médias seguidas por letras distintas minúsculas na coluna diferem entre si a 0,05 de significância pelo teste Tukey.

Apenas os produtos casugamicina e benalaxyl + mancozebe nas concentrações: não diluído e  $10^{-1}$ , diferiram em relação à testemunha. Não foi demonstrada sensibilidade da bactéria aos produtos imidacloprido e metribuzim (FIGURA 03).

Apesar da inibição do crescimento de *B. subtilis* pelos produtos casugamicina e benalaxyl + mancozebe, deve-se ressaltar que as doses que comprometeram o crescimento da bactéria foram:  $10^{-1}$  e não diluído, ou seja, 10 e 100 vezes maior do que a dose recomendada para a cultura do tomate ( $10^{-2}$ ). Sendo assim, sua utilização de forma correta não prejudica o desenvolvimento do isolado testado.

**FIGURA 03.** Antibiogramas de compatibilidade de *Bacillus subtilis* a agroquímicos. A- Benalaxyl + Mancozebe; B- Casugamicina; C- Imidacloprido; D- Metribuzim. Fonte: MOTA, 2015.



Avaliando o halo de inibição de crescimento de *B. thuringiensis*, o micro-organismo se mostrou sensível a todas as doses testadas do agroquímico benalaxyl + mancozebe e as concentrações: não diluído,  $10^{-1}$  e  $10^{-2}$  dos produtos casugamicina e metribuzim, em relação à testemunha. O produto Imidacloprido não inibiu o crescimento da bactéria (TABELA 11).

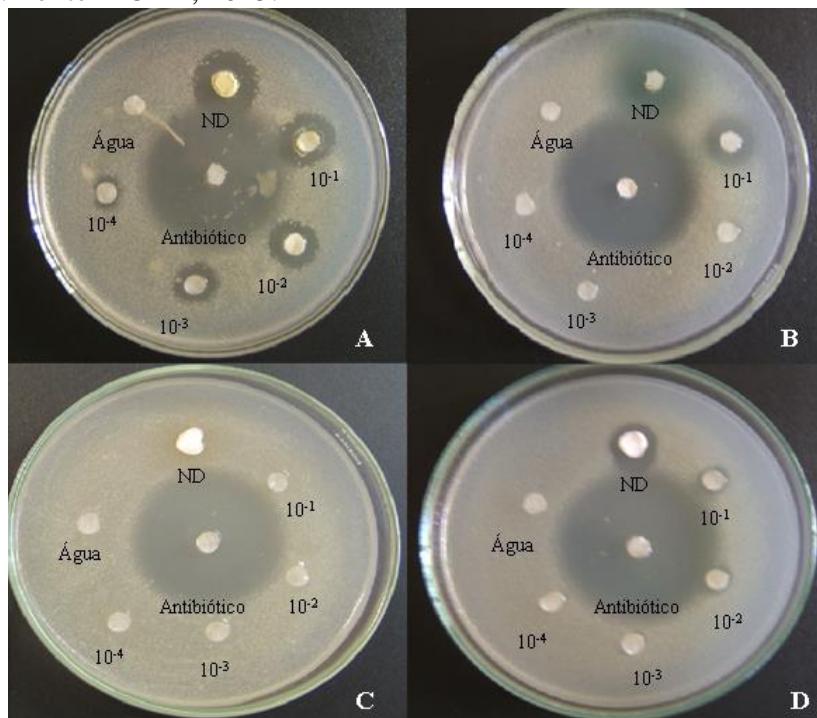
**TABELA 11.** Halo de inibição ao crescimento (mm) de *Bacillus thuringiensis* com agroquímicos em diferentes diluições. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2015.

Diluições	Imidacloprido <sup>1</sup>	Casugamicina <sup>1</sup>	Benalaxyl + Mancozebe <sup>1</sup>	Metribuzim <sup>1</sup>
Não diluído	0,00b	22,75b	17,25b	12,75b
$10^{-1}$	0,00b	14,00c	14,50c	8,50c
$10^{-2}$	0,00b	8,00d	13,00c	5,50c
$10^{-3}$	0,00b	0,00e	11,00d	0,00d
$10^{-4}$	0,00b	0,00e	8,00e	0,00d
Testemunha	0,00b	0,00e	0,00f	0,00d
Estreptomicina	38,25a	38,50a	39,00a	39,25a
CV (%)	8,70	11,57	5,90	19,57

<sup>1</sup>Dados transformados para  $\sqrt{x+1,0}$ . As médias originais são apresentadas. CV: Coeficiente de variação dos dados. Médias seguidas por letras distintas minúsculas na coluna diferem entre si a 0,05 de significância pelo teste Tukey.

Diante dos resultados, pode-se afirmar que não é compatível a utilização dos produtos casugamicina, metribuzim e benalaxyl + mancozebe com *B. thuringiensis* (FIGURA 04). O modo de ação de casugamicina (Kasumin) sobre a bactéria está no fato da substância ligar-se à subunidade pequena do ribossomo e inibir a elongação de proteínas nas células (RODRIGUES, 2006).

**FIGURA 04.** Antibiogramas de compatibilidade de *Bacillus thuringiensis* a agroquímicos. A- Benalaxil + Mancozeb; B- Casugamicina; C- Imidacloprido; D- Metribuzim. Fonte MOTA, 2015.



Não há trabalhos na literatura sobre a compatibilidade de *B. subtilis* e *B. thuringiensis* a agroquímicos, existem apenas estudos similares com outras espécies do gênero *Bacillus*. Neves (2005) testou a sensibilidade de *B. cereus* a vários agroquímicos, nas doses recomendadas para a cultura do tomate, e não verificou sensibilidade aos princípios ativos metribuzim (Sencor) e imidacloprido (Confir 700 GrDa). Quando testado mancozebe (Manzate 800), o produto limitou o desenvolvimento da bactéria. Em parte, seus resultados corroboram com os encontrados, pois o uso de metribuzin (Sencor) e imidacloprido (Evidence 700WG), também, não interferiu no crescimento de *B. subtilis*, já benalaxyl e mancozebe (Galben-M) apresentou efeito variável sobre o desenvolvimento de *B. subtilis* e *B. thuringiensis*, podendo afirmar que provavelmente mancozeb afeta o gênero *Bacillus*.

O halo de inibição de *B. subtilis* e *B. thuringiensis* com antibiótico estreptomicina confirma a viabilidade do teste realizado. O antibiótico pertence ao grupo dos aminoglicosídeo, que são agentes que possuem um grupo amino básico e uma unidade de açúcar. Apresenta efeito bactericida ao gênero *Bacillus*, por ligar-se especificamente à subunidade 30S dos ribossomos bacterianos, impedindo o movimento do ribossomo ao longo do mRNA e, consequentemente, interrompendo a síntese de proteínas (GUIMARÃES *et al.*, 2010).

Os resultados dos halos de inibição de crescimento de *Rhizobium* sp. com agroquímicos são representados na Tabela 12:

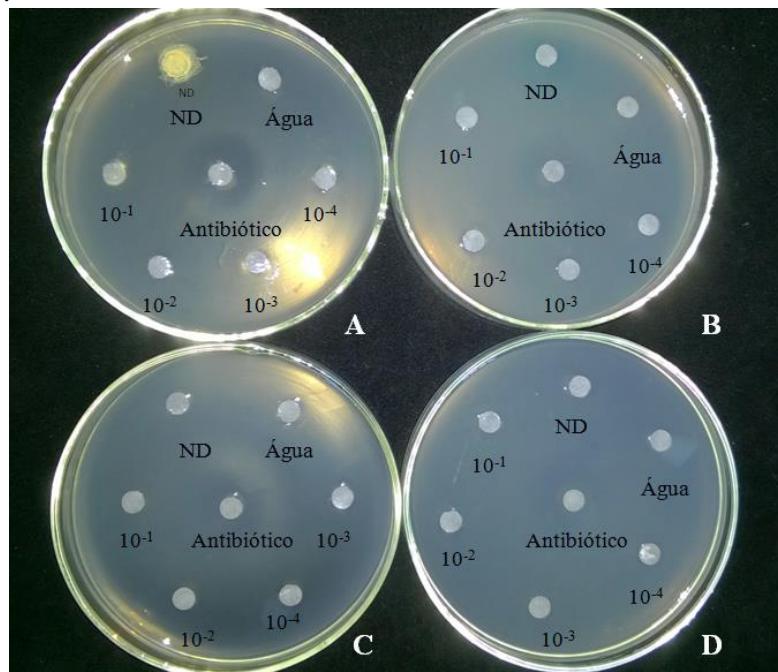
**TABELA 12.** Halo de inibição ao crescimento (mm) de *Rhizobium* sp. com agroquímicos em diferentes diluições. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2015.

Diluições	Imidacloprido <sup>1</sup>	Casugamicina <sup>1</sup>	Benalaxil + Mancozeb <sup>1</sup>	Metribuzim <sup>1</sup>
Não diluído	0,00b	12,50b	17,00a	0,00b
10 <sup>-1</sup>	0,00b	0,00b	11,50b	0,00b
10 <sup>-2</sup>	0,00b	0,00b	8,50c	0,00b
10 <sup>-3</sup>	0,00b	0,00b	0,00d	0,00b
10 <sup>-4</sup>	0,00b	0,00b	0,00d	0,00b
Testemunha	0,00b	0,00b	0,00d	0,00b
Cefalexina	19,00a	19,25a	18,75a	19,25a
CV (%)	2,27	11,54	32,01	13,16

<sup>1</sup>Dados transformados para  $\sqrt{x+1,0}$ . As médias originais são apresentadas. CV: Coeficiente de variação dos dados. Médias seguidas por letras distintas minúsculas na coluna diferem entre si a 0,05 de significância pelo teste Tukey.

O crescimento de *Rhizobium* sp. foi afetado pelo produto benalaxil + mancozeb nas concentrações: não diluído, 10<sup>-1</sup> e 10<sup>-2</sup> e pelo produto casugamicina apenas na concentração não diluído. Os produtos imidacloprido e metribuzim não inibiram o crescimento da bactéria (FIGURA 05).

**FIGURA 05.** Antibiogramas de compatibilidade de *Rhizobium* sp. a agroquímicos. A- Benalaxil + Mancozeb; B- Casugamicina; C- Imidacloprido; D- Metribuzim. Fonte: MOTA, 2015.



É possível afirmar que o produto benalaxil + mancozeb não é compatível com *Rhizobium* sp., devendo-se limitar o uso combinado no campo. Apesar da inibição do crescimento pelo produto casugamicina, ressalta-se que a dose que interferiu no desenvolvimento da bactéria é 100 vezes maior do que a dose recomendada para a cultura do tomate ( $10^{-2}$ ), podendo o produto ser utilizado em combinação com *Rhizobium* sp, de forma correta.

Os resultados encontrados corroboram com Castro *et al.* (1997). Os autores verificaram que o fungicida mancozebe diminui em 50% o crescimento de *Rhizobium* sp. isolado USDA 3187. Posteriormente, Fabra *et al.* (1998), estudando o mesmo isolado, inferiram que mancozeb produziu alterações bioquímicas na composição da membrana, polissacarídeos e poliaminas; e que apesar do aumento do teor de glutationa (GSH) e da atividade de glutationa S-transferase (GST), molécula e izoenzima envolvida no processo de desintoxicação, respectivamente, isso não foi suficiente para evitar a diminuição do crescimento, o que explica o efeito tóxico para a bactéria.

O halo de inibição de *Rhizobium* sp. com antibiótico cefalexina confirma a viabilidade do teste realizado. O modo de ação do antibiótico refere-se à capacidade de ligar-se a PLP's específicas (proteínas que realizam a ligação de peptidioglicanos),

inibir a síntese da parede celular pelo bloqueio da transpeptidação do peptidoglicano e ativar as enzimas autolíticas na parede celular, capazes de produzir lesões com consequente morte da bactéria (lise celular) (OLIVEIRA *et al.*, 2014). Através de antibiogramas, Cunha *et al.* (2006), também, verificaram efeito do antibiótico sobre o crescimento dos isolados RVV11 e BSV16 de *Rhizobium* sp.

*S. cerevisiae* foi sensível apenas à concentração não diluída dos produtos casugamicina, benalaxil + mancozeb e metribuzim. As demais doses desses produtos e o inseticida imidacloprido não inibiram o crescimento da levedura *in vitro* (TABELA 13).

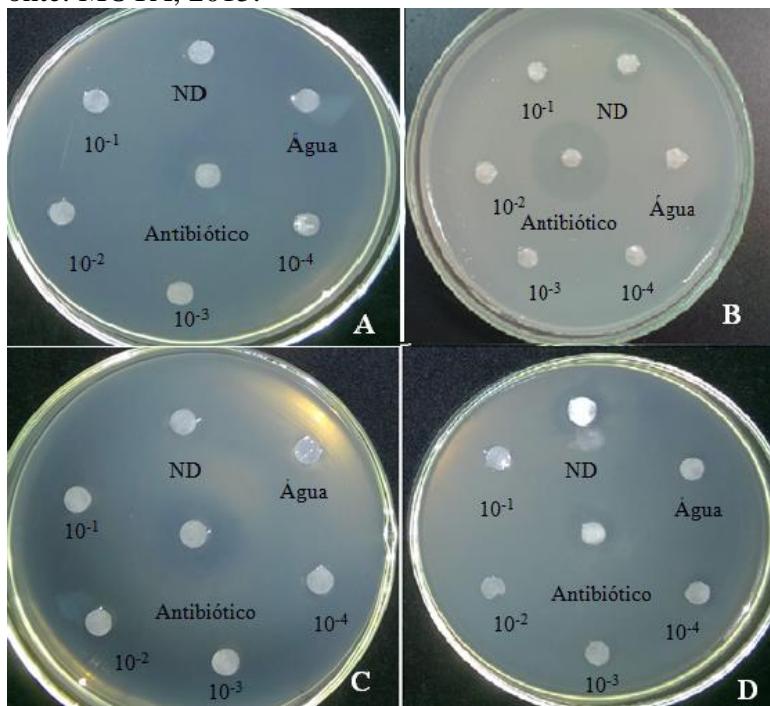
**TABELA 13.** Halo de inibição ao crescimento (mm) de *Saccharomyces cerevisiae* com agroquímicos em diferentes diluições. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2015.

Diluições	Imidacloprido <sup>1</sup>	Casugamicina <sup>1</sup>	Benalaxil + Mancozeb <sup>1</sup>	Metribuzim <sup>1</sup>
Não diluído	0,00b	9,75a	8,00b	11,00a
10 <sup>-1</sup>	0,00b	0,00b	0,00b	0,00b
10 <sup>-2</sup>	0,00b	0,00b	0,00b	0,00b
10 <sup>-3</sup>	0,00b	0,00b	0,00b	0,00b
10 <sup>-4</sup>	0,00b	0,00b	0,00b	0,00b
Testemunha	0,00b	0,00b	0,00d	0,00b
Nitrato de miconazol	10,75a	11,25a	12,00a	11,75a
CV (%)	23,56	26,73	30,55	17,44

<sup>1</sup>Dados transformados para  $\sqrt{x+1,0}$ . As médias originais são apresentadas. CV: Coeficiente de variação dos dados. Médias seguidas por letras distintas minúsculas na coluna diferem entre si a 0,05 de significância pelo teste Tukey.

Com esses resultados, pode-se afirmar que todos os produtos, quando aplicados na dose adequada, são compatíveis com a levedura (FIGURA 06). Nenhum trabalho foi encontrado na literatura sobre a compatibilidade da levedura aos produtos testados.

**FIGURA 06.** Antibiogramas de compatibilidade de *Saccharomyces cerevisiae* a agroquímicos. A- Benalaxil + Mancozeb; B- Casugamicina; C- Imidacloprido; D- Metribuzim. Fonte: MOTA, 2015.



O halo de inibição de *S. cerevisiae* com antifúngico nitrato de miconazol confirma a viabilidade do teste realizado. Seu mecanismo de ação consiste em inibir a biossíntese de ergosterol, esterol mais abundante na parede celular de leveduras, o que resulta em extrema alteração da membrana celular, causando perda de constituintes celulares essenciais (CALAHORRA *et al.*, 2011, CORDEIRO, 2009). Esimone *et al.* (2007) observaram halo de inibição do crescimento de dois isolados de *S. cerevisiae*, de 25 e 27 mm, com o antifúngico miconazol ( $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ).

A velocidade media de crescimento micelial de *Trichoderma* sp. foi afetada de forma negativa por todas as doses do herbicida metribuzim em relação a testemunha. As concentrações: não diluído e  $10^{-1}$  do bactericida casugamicina e do fungicida benalaxil + mancozeb não foram compatíveis ao crescimento do fungo, reduzindo a velocidade média de crescimento micelial. O inseticida imidacloprido não interferiu no desenvolvimento do *Trichoderma* sp. (TABELA 14).

**TABELA 14.** Velocidade média de crescimento micelial ( $\text{mm.h}^{-1}$ ) de *Trichoderma* spp. em meio de cultura BDA com e sem agroquímicos. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2015.

Diluições	Imidaclorprido <sup>1</sup>	Casugamicina <sup>1</sup>	Benalaxil + Mancozeb <sup>1</sup>	Metribuzim <sup>1</sup>
Testemunha	0,97a	0,97a	0,97a	0,97a
$10^{-4}$	0,93a	0,88a	0,96a	0,63b
$10^{-3}$	0,87a	0,98a	0,91a	0,32bc
$10^{-2}$	0,93a	0,90a	0,82a	0,23c
$10^{-1}$	0,83a	0,48b	0,30b	0,08c
Não diluído	0,90a	0,08c	0,06b	0,06c
CV (%)	17,78	21,53	21,44	36,38

<sup>1</sup>Dados transformados para  $\sqrt{x+1,0}$ . As médias originais são apresentadas. CV: Coeficiente de variação dos dados. Médias seguidas por letras distintas minúsculas na linha diferem entre si a 0,05 de significância pelo teste Tukey.

O herbicida metribuzim não foi compatível com o fungo *Trichoderma* sp. em nenhuma dose testada em relação a testemunha. Esse resultado não corrobora com Resende (2011), que relatou que o tratamento de sementes com o produto metribuzim foi compatível com o fungo *Trichoderma asperellum*. Com essa contradição, pode-se inferir que a compatibilidade pode variar de acordo com a espécie ou característica do isolado utilizado.

A velocidade de crescimento micelial do fungo foi reduzida com o fungicida benalaxil + mancozeb e com bactericida casugamicina apenas nas concentrações não diluído e  $10^{-1}$ . Isso sugere, que na concentração recomendada para cultura do tomateiro ( $10^{-2}$ ), os produtos são compatíveis ao *Trichoderma* sp.

No caso do fungicida benalaxil + mancozeb, a interferência no crescimento do fungo nas doses mais elevadas é devido ao seu mecanismo de ação. O produto tem como princípio ativo mancozeb, que pertence ao grupo químico dos ditiocarbamatos, atua na inativação de enzimas essenciais ao fungo e interferem na produção de energia; e benalaxil, pertencente ao grupo das fenilamidas, que interfere na síntese de ácido nucléico, inibindo a síntese de RNA ribossômico sendo normalmente este o processo mais sensível que ocorre através de interação com a enzima RNA polimerase (JULIATTI, 2005; RODRIGUES, 2006).

Há alguns relatos da interferência de agroquímicos no desenvolvimento do fungo *Trichoderma* sp. O fungicida mancozeb ( $1,6 \text{ kg.h}^{-1}$ ) inibiu 100% da germinação de *T. harzianum* isolado C52, sendo a sensibilidade ao produto confirmada em

experimento em estufa (MCLEAN *et al.*, 2001). Avaliando a compatibilidade de *Trichoderma* sp. a diferentes agroquímico, Pandolfo (2007), verificou que o fungo apresentou sensibilidade *in vitro* aos fungicidas carbendazim, carbendazim + thiram, trifloxistrobina + tebuconazole e epoxiconazole + pyraclostrobin, nas doses recomendadas para cultura do feijão. O autor também relatou variação de compatibilidade de isolados ao produtos testados.

À partir dos resultados encontrados, deve-se atentar para a compatibilidade dos micro-organismos com os agroquímicos citados no controle biológico de doenças.

#### **4 CONCLUSÕES**

Nas concentrações recomendadas para o tomateiro, o fungicida benalaxil + mancozeb inibiu o crescimento de *B. thuringiensis* e *Rhizobium* sp.; o herbicida metribuzim inibiu o crescimento de *B. thuringiensis* e reduziu a velocidade de crescimento micelial do *Trichoderma* sp.; e o bactericida casugamicina inibiu o crescimento da *B. thuringiensis*. Nenhum produto, nas concentrações recomendadas para o tomateiro, inibiu o crescimento de *B. subtilis* e *S. cerevisiae*. O inseticida imidacloprido não interferiu no desenvolvimento de nenhum dos micro-organismos avaliados.

## REFERÊNCIAS

- BENZ, G. Environment. In: FUXA, R.; TANADA, Y. (Eds.). *Epizootiology of insect diseases*. New York: Wiley, 1987. p. 177-214. In: NUNES, H.T. **Agentes microbianos no controle de nematoídes e fungos fitopatogênicos de soja e sua compatibilidade com agroquímicos**. 2008. 77f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2008. Disponível em: <<http://docentes.esalq.usp.br/sbn/nbras/nunes.pdf>>. Acesso em: 09 nov. 2014.
- CALAHORRA, M.; LOZANO, C.; SANCHEZ, N.S.; PENA, A. Ketoconazole and miconazole alter potassium homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochimica et Biophysica Acta**, Londres, v. 1808, p. 433–445, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20932953>>. Acesso em: 19 nov. 2014.
- CASTRO, S.; VINOCU, M.; PERMIGIANI, M.; HALLE, C.; TAURIAN, T.; FABRA, A. Interaction of the fungicide mancozeb and *Rhizobium* sp. in pure culture and under field conditions. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 1997, n. 2, p. 147-151, 1997. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs003740050295>>. Acesso em: 23 dez. 2014.
- CORDEIRO, A.M.H. **Estudos biofísicos em sistemas modelo da membrana plasmática da levedura**. 2009, 114f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica). Universidade de Lisboa, Lisboa- Portugal, 2009. Disponível em: <[http://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/4573/1/ulfc096095\\_tm\\_Aandre\\_Cordeiro.pdf](http://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/4573/1/ulfc096095_tm_Aandre_Cordeiro.pdf)>. Acesso em: 19 nov. 2014.
- CUNHA, J.F.; PICOLI, E.A.T.; ALFENAS, A.C.; GONCALVES, R.C. Efeito *in vitro* de antibióticos e rizobactérias no controle de bactérias fitopatogênicas ao *Eucalyptus* spp. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v. 30, n. 6, p. 871-876, 2006. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-67622006000600001](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-67622006000600001)>. Acesso em: 23 dez. 2014.
- DUARTE, A.; MENENDEZ, J. M.; TRIGUEIRO, N. Estudio preliminar sobre la compatibilidad de *Metarhizium anisopliae* con algunos plaguicidas químicos. **Revista Baracoa**, La Habana, v. 22, p. 31-39, 1992. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_nlinks&ref=000062&pid=S0103-9016200300040000900005&lng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000062&pid=S0103-9016200300040000900005&lng=pt)>. Acesso em: 04 nov. 2014.
- ESIMONE, C.O.; OLEGHE, P.O.; IBEZIM, E.C.; OKEH, C.O.; IROHA, I.R. Susceptibility-resistance profile of micro-organisms isolated from herbal medicine products sold in Nigeria. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 6, n. 24, p. 2766-2775, 2007. Disponível em: <[www.ajol.info/index.php/ajb/article/.../46562](http://www.ajol.info/index.php/ajb/article/.../46562)>. Acesso em: 23 dez. 2014.

FABRA, A.; ANGELINI, J.; DONOLO, A.; PERMIGIANI, M.; CASTRO, S. Alterações bioquímicas em *Bradyrhizobium* sp USDA 3187 induzidas pelo fungicida Mancozeb. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 73, n. 3, p. 223-228, 1998. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1023/A:1000987524112>>. Acesso em: 23 dez. 2014.

FERREIRA, D.F. **SISVAR - Sistema de análise de variância**. Versão 5.10. Lavras-MG: UFLA, 2010.

GUIMARÃES, D.O.; MOMESSO, L.S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422010000300035](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422010000300035)>. Acesso em: 23 dez. 2014.

IBM CORP. **SPSS, Statistics for Windows, Version 20.0**. Armonk, New York. 2011.

JACKISCH-MATSUURA, A.; MENEZES, M. Efeito de *Trichoderma* spp. no controle de *Pythium aphanidermatum* em fumo (*Nicotiana tabacum*). **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 25, n. 2, p. 161-164, 1999. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_nlinks&ref=000123&pid=S0100-540520100010001100009&lng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000123&pid=S0100-540520100010001100009&lng=en)>. Acesso em: 04 nov. 2014.

JULIATTI, F.C. Modo de ação dos fungicidas sobre plantas e fungos. In: **SIMPÓSIO SOBRE RELAÇÕES ENTRE NUTRIÇÃO MINERAL E INCIDÊNCIA DE DOENÇAS DE PLANTAS**, 1, 2005. **Anais...** Piracicaba: Patafós, 2005. Disponível em: <[http://www.ipni.net/ppiweb/pbrazil.nsf/1c678d0ba742019483256e19004af5b8/4d4c7e5503f5a2c503256fdd004c4a8f/\\$FILE/Anais%20Fernando%20Juliatti.pdf](http://www.ipni.net/ppiweb/pbrazil.nsf/1c678d0ba742019483256e19004af5b8/4d4c7e5503f5a2c503256fdd004c4a8f/$FILE/Anais%20Fernando%20Juliatti.pdf)>. Acesso em: 23 dez. 2014.

MCLEAN, K.L.; HUNT, J.; STEWART, A. Compatibility of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* c52 with selected fungicides. **New Zealand Plant Protection**, Wellington, v. 54, p. 84-88. 2001. Disponível em: <[http://www.nzpps.org/journal/54/nzpp\\_540840.pdf](http://www.nzpps.org/journal/54/nzpp_540840.pdf)>. Acesso em: 23 dez. 2014.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO- MAPA. **Produtos formulados**. 2014. Disponível em: <[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em: 10 nov. 2014.

NEVES, D.M.S. **Biocaracterização de um isolado de *Bacillus cereus* selecionado para o controle biológico de enfermidades do tomateiro (*Lycopersicum esculentum* Mill)**. 2005. 147f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2005. Disponível em: <<http://alexandria.cpd.ufv.br:8000/teses/fitopatologia/2005/190323f.pdf>>. Acesso em: 23 dez. 2014.

NUNES, H.T. **Agentes microbianos no controle de nematoides e fungos fitopatogênicos de soja e sua compatibilidade com agroquímicos.** 2008. 77f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2008. Disponível em: <<http://docentes.esalq.usp.br/sbn/nbras/nunes.pdf>>. Acesso em: 09 nov. 2014.

OLIVEIRA, A.L.D.; SOARES, M.M.; SANTOS, T.C.D.; SANTOS, A. Mecanismos de resistência bacteriana a antibióticos na infecção urinária. **Uningá Review**, Maringá, v. 20, n. 3, p. 65-71, 2014. Disponível em: <[http://mastereditora.com.br/periodico/20141130\\_221311.pdf](http://mastereditora.com.br/periodico/20141130_221311.pdf)>. Acesso em: 27 dez. 2014.

PANDOLFO, J.D. **Associação de *Trichoderma* sp. e fungicidas no controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*.** 2007. 78 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007. Disponível em: <[http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/11189?locale=pt\\_BR](http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/11189?locale=pt_BR)>. Acesso em: 13 nov. 2014.

REZENDE, A.A. **Eficiência de diferentes produtos comerciais a base de *Trichoderma* sp. no controle da podridão branca da haste da soja.** 2011, 133 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal do Uberlândia, Uberlândia, 2011. Disponível em: <[repositorio.ufu.br/handle/123456789/4119](http://repositorio.ufu.br/handle/123456789/4119)>. Acesso em: 13 nov. 2014.

RIBAS, P.P. **Compatibilidade de *Trichoderma* spp. a princípios ativos comerciais aplicados na cultura do feijão.** 2010. 89 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010. Disponível em: <<file:///I:/DISSERTA%C3%87%C3%83O%20MESTRADO/ARTIGOS/RIBAS,%202010.pdf>>. Acesso em: 13 nov. 2014.

RODRIGUES, M.A.T. **Classificação de fungicidas de acordo com o mecanismo de ação proposto pelo frac.** 2006. 291 f. Dissertação (Mestrado em Proteção de Plantas) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2006. Disponível em: <<http://www.pg.fca.unesp.br/Teses/PDFs/Arq0086.pdf>>. Acesso em: 13 nov. 2014.

ROMEIRO, R.S. **Métodos em bacteriologia de plantas.** Viçosa: UFV, 2001. 279p.

SILVA, A.N. **Efeito de produtos químicos e de *Trichoderma* spp. no controle de *fusarium solani* do maracujazeiro.** 2011. 55f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual do Sudeste da Bahia, Vitória da Conquista, 2011. Disponível em: <<http://www.uesb.br/mestradoagronomia/banco-de-dissertacoes/2011/aline-novais-da-silva.pdf>>. Acesso em: 12 nov. 2014.

SOARES, P. L. M. **Estudo do controle biológico de fitonematoïdes com fungos nematófagos.** 2006. 217f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2006. Disponível em: <<http://www.fcav.unesp.br/download/pgtrabs/ea/d/1571.pdf>>. Acesso em: 12 nov. 2014.

## **CAPÍTULO III: Quitina e quitosana no manejo de *Meloidogyne incognita* e *Meloidogyne javanica* e na ativação de proteínas relacionadas à patogênese em tomateiro**

### **RESUMO**

A adição de quitina ao solo e aplicação de eliciadores abióticos como a quitosana, vêm sendo usados contra o ataque de fitonematoídes, por aumentar micro-organismos quitinolíticos no solo e induzir resistência sistêmica em plantas, respectivamente. Nesse contexto, produtos utilizados no manejo alternativo contra fitonematoídes estão sendo comercializados. O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia dos produtos HYT-C (quitina) e HYT-D (quitosana) no controle de *M. incognita* e *M. javanica*. O experimento foi realizado aplicando os produtos durante o transplante das mudas de tomate, via pulverização foliar ou em solo, previamente infestado ou não com *M. javanica* ou *M. incognita*. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), em arranjo fatorial 7 x 3 (combinação dos produtos x nematoídes), com dez repetições. As avaliações ocorreram após 60 dias, determinando-se o fator de reprodução, número de ovos, juvenis e adultos por grama de raiz fresca, altura de parte aérea (cm), comprimento de sistema radicular (cm), massa fresca e seca de raiz e de parte aérea (g), populações de micro-organismos quitinolíticos presentes no solo ( $\text{UFC.g}^{-1}$  de solo), atividade da enzima quitinase nas folhas. Quitina via solo aumentou comprimento e o peso fresco raiz em plantas inoculadas com *M. incognita*. Quando associada à quitosana via foliar, também, promoveu peso aéreo das plantas. A aplicação de quitina via solo e associada com quitosana foliar, reduziu o fator de reprodução e a população por grama de raiz de *M. javanica*. Para *M. incognita* não foram obtidos resultados expressivos. Quitina via solo aumentou a população de micro-organismos quitinolíticos do solo. A aplicação de quitina solo, quitosana foliar, e associação de ambas, aumentou a atividade da enzima quitinase nas folhas do tomateiro quatro dias após aplicação, independente do nematoide inoculado.

**Palavras-chaves:** indução de resistência, micro-organismos quitinolíticos, nematoide das galhas.

### **CHAPTER III: Chitin and chitosan in the management of *Meloidogyne incognita* and *Meloidogyne javanica* and activation of pathogenesis-related proteins in tomato**

#### **ABSTRACT**

The addition of chitin to soil and spraying abiotic elicitors, such as chitosan, have been used against plant-parasitic nematodes, to increase chitinolytic microorganisms in the soil and to induce systemic resistance in plants, respectively. In this context, products used in alternative management against plant-parasitic nematodes are being marketed. This study evaluated the efficacy of the products HYT-C (chitin) and HYT-D (chitosan) in the control of *M. incognita* and *M. javanica*. The experiment was conducted by applying the products at tomato seedlings transplanting, by foliar spray or soil amendment, previously infested or not with *M. javanica* or *M. incognita*. The experimental design was completely randomized (DIC) in a factorial 7 x 3 (combination of products x root-knot nematodes), with ten replications. Evaluations were done after 60 days, determining the reproduction rate, number of eggs, juveniles and adults per gram of fresh root, shoot height (cm), root length (cm), fresh and dry root and shoot mass (g), population of chitinolytic organisms in the soil (UFC g<sup>-1</sup> soil) and the activity of chitinase enzyme in the leaves. Chitin added to the soil increased length and fresh root mass in plants inoculated with *M. incognita*. When combined with foliar chitosan, it also increased plant shoot length. The application of chitin to soil associated with leaf spraying of chitosan, reduced reproduction factor and population of *M. javanica* per root gram. No significant results were obtained for *M. incognita*. Chitin in the soil increased the population of soil chitinolytic microorganisms. The application of soil chitin, foliar chitosan and a combination of both, increased the activity of the enzyme chitinase in the leaves four days after application, regardless of nematode inoculated.

**Keywords:** induction of resistance, chitinolytic microorganisms, root-knot nematode.

## 1 INTRODUÇÃO

A busca por métodos alternativos de controle de doenças tem gerado produtos com potencial de induzir mecanismos latentes de defesa das plantas ao ataque de patógenos. Tais produtos eliciadores podem ser bióticos (organismos vivos ou partes destes) ou abióticos (INÁCIO, 2011), como a quitosana. Além disso, a adição de compostos orgânicos no solo, como a quitina, tem o potencial para modificar a estrutura do solo e influenciar as populações microbianas (CASTRO *et al.*, 2011), suprimindo patógenos.

A quitina ( $\beta$ -1,4-N-acetylglucosamina) é um biopolímero natural, insolúvel e, com exceção da celulose, é o polissacarídeo mais abundante na natureza, presente como elemento estrutural em animais invertebrados, artrópodes e na parede celular de alguns fungos. A quitosana (D-glucosamina) é um polímero solúvel, derivado da desacetilação da quitina. É encontrada na parede celular de fungos, que podem apresentar até 50% deste na sua estrutura (BERGER *et al.*, 2011; FRANCO *et al.*, 2005).

A quitina e quitosana têm sido pesquisadas no controle de nematosses em plantas. São relatados que, a adição de quitina ao solo leva ao aumento da população de micro-organismos quitinolíticos capazes de degradar a quitina presente na casca dos ovos dos fitonematoides (CASTRO *et al.*, 2011), e que a quitosana favorece o crescimento vegetal e ativa as defesas da planta, aumentando a atividade de enzimas como quitinases e peroxidases na planta (BERGER *et al.*, 2011).

Nesse contexto, produtos utilizados no manejo alternativo contra fitonematoides como HYT-C e HYT-D estão sendo comercializados. O primeiro é um produto a base de quitina micronizada, extraída de uma fonte natural a partir de resíduos de camarão, e o segundo sua forma desacetilada, a quitosana. Ambos os produtos reforçam a formação de raízes e estruturas celulares e estimulam a capacidade natural da planta para resistir aos patógenos de solo, como fitonematoides (AGRINOS, 2014).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia dos produtos HYT-C (quitina) e HYT-D (quitosana) no controle dos nematoides das galhas *M. incognita* e *M. javanica*, no aumento da população de micro-organismos quitinolíticos do solo, na atividade da enzima quitinase e no desenvolvimento do tomateiro.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Montagem e condução do experimento

O experimento foi realizado no Laboratório de Nematologia (LANEM), Laboratório de Nanobiotecnologia e na casa de vegetação da Universidade Federal de Uberlândia-MG, no período de julho a novembro de 2014.

Para controle de *M. javanica* e *M. incognita* foram utilizados um produto comercial a base de quitina (HYT-C) e outro a base de quitosana (HYT-D), fornecidos pela empresa Agrinos do Brasil. Mudas de tomateiro cultivar Santa Clara VF5600 com 20 dias foram obtidas de viveiro comercial e transplantadas para vasos plásticos de 1,5 L de capacidade preenchidos com mistura de solo de barranco e areia, na proporção de 1:2 (v:v).

Antes da colocação do solo nos vasos, foi realizada análise química do substrato que apresentou o seguinte resultado: pH: 5,6; K<sup>+</sup>: 0,05 cmolc dm<sup>-3</sup>; Ca<sup>2+</sup>: 0,7 cmolc dm<sup>-3</sup>; Mg<sup>2+</sup>: 0,2 cmolc dm<sup>-3</sup>; Al<sup>3+</sup>: 0,0 cmolc dm<sup>-3</sup>; H+Al: 1,8 cmolc dm<sup>-3</sup>; P (Mehlich-1): 13,5 mg dm<sup>-3</sup>; V: 34%. Com a interpretação dos resultados foi realizada calagem 40 dias antes da montagem do experimento com a dose de 3,4 t de calcário dolomítico.h<sup>-1</sup>.

Um dia antes do transplantio, o solo foi infestado com suspensão do inóculo em todo volume do vaso através de homogeneização manual em balde plástico de forma a simular uma condição de campo. Para isso foram inoculados 8.000 ovos de *M. incognita* ou 10.000 ovos de *M. javanica* por vaso de acordo com cada tratamento. Os ovos dos nematoides foram extraídos pela técnica de Hussey e Barker (1973), modificada por Boneti e Ferraz (1981), a partir de raízes de tomateiros previamente infectadas com populações puras dos nematoides, mantidas na casa de vegetação. Para isso as raízes foram lavadas cuidadosamente em água corrente, fragmentadas em pedaços de 2 cm e colocadas em um copo de liquidificador doméstico, contendo solução de hipoclorito de sódio, a 0,5% para trituração na menor rotação por 60s. A suspensão obtida foi vertida na peneira de 200 mesh sobreposta a de 500 mesh. O resíduo de 500 mesh foi recolhido com jatos de água de uma pisseta para um copo. As suspensões de ovos foram calibradas com auxílio da câmara de contagem de Peters em microscópio óptico.

A aplicação dos tratamentos (TABELA 15) foi realizada durante o transplantio das mudas. A quitina, por ser insolúvel em água foi aplicada apenas via solo no sulco de transplantio na dose de 0,3 g.planta<sup>-1</sup> e a quitosana aplicada por meio de pulverização na parte aérea das plantas, ou por adição direta à superfície do solo, na base das plantas na dose de 0,2 mL.planta<sup>-1</sup>, de acordo com cada tratamento. As pulverizações manuais foram realizadas conforme descrito por Lopes *et al.* (2005), com o envolvimento dos vasos em sacos plásticos, evitando-se que o produto da parte aérea da planta atingisse o solo.

**TABELA 15.** Tratamentos com quitina e/ou quitosana para controle de *Meloidogyne javanica* e *M. incognita*, e para o desenvolvimento do tomateiro. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2015.

Nematoides	Produtos
<i>M. javanica</i>	Quitosana solo + foliar
<i>M. javanica</i>	Quitosana foliar
<i>M. javanica</i>	Quitina solo + Quitosana foliar
<i>M. javanica</i>	Quitina solo
<i>M. javanica</i>	Quitosana solo
<i>M. javanica</i>	Quitina solo + Quitosana solo
<i>M. javanica</i>	Sem aplicação
<i>M. incognita</i>	Quitosana solo + foliar
<i>M. incognita</i>	Quitosana foliar
<i>M. incognita</i>	Quitina solo + Quitosana foliar
<i>M. incognita</i>	Quitina solo
<i>M. incognita</i>	Quitosana solo
<i>M. incognita</i>	Quitina solo + Quitosana solo
<i>M. incognita</i>	Sem aplicação
Sem nematoide	Quitosana solo + foliar
Sem nematoide	Quitosana foliar
Sem nematoide	Quitina solo + Quitosana foliar
Sem nematoide	Quitina solo
Sem nematoide	Quitosana solo
Sem nematoide	Quitina solo + Quitosana solo
Sem nematoide	Sem aplicação

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), em arranjo fatorial 7 x 3 (combinação dos produtos x nematoides), com dez repetições, sendo a parcela experimental constituída por um vaso contendo uma planta de tomateiro.

Durante a condução do experimento realizou-se o manejo de pragas com armadilhas de polietileno amarelo contendo óleo vegetal para controle de moscas brancas (*Bemisia tabaci* Genn). Sempre que necessário, as plantas daninhas foram retiradas manualmente. O turno de rega adotado foi o diário, optando-se por uso de mangueira mantendo o solo com, aproximadamente, 60% da capacidade de campo. Com intervalos quinzenais foram aplicados  $100\text{mL.planta}^{-1}$  de uma solução nutritiva contendo: EDTA férrego;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ;  $\text{KNO}_3$ ;  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Diariamente no mesmo horário eram coletados os dados referentes às temperaturas mínima e máxima do ar da casa de vegetação.

## 2.2 Avaliações

### 2.2.1 Análises nematológicas e desempenho do tomateiro

As avaliações do experimento ocorreram no LANEM aos 60 dias após o transplantio das mudas, determinando-se o fator de reprodução (população final/população inicial) e número de ovos, juvenis e adultos por grama de raiz fresca. A população final foi determinada pela soma da análise nematológica das raízes pela técnica de Hussey e Barker (1973), modificada por Boneti e Ferraz (1981) e pela população final do solo de acordo com a metodologia de flotação centrífuga em solução de sacarose (JENKINS, 1964). Para isso, uma alíquota de  $150\text{ cm}^3$  de solo foi colocada em um recipiente contendo 2 L de água. Os torrões foram desmanchados e a suspensão, após homogeneização, permaneceu em repouso por 15 segundos. Após esse período, a suspensão foi vertida passando pelas peneiras sobrepostas de 20 e 400 mesh. O resíduo da peneira de 400 mesh foi recolhido e distribuído em tubos de centrífuga balanceados que então foram centrifugados por 5 min., a velocidade de 650 gravidades. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e ao resíduo adicionou-se uma solução de sacarose ( $454\text{g de açúcar cristal.1 L}^{-1}$  de água). Os tubos foram centrifugados novamente na mesma velocidade, durante 1 min. O sobrenadante foi vertido na peneira de 500 mesh. O resíduo dessa peneira foi recolhido com auxílio de jatos de água de uma pisseta para um copo. Uma alíquota obtida foi colocada na câmara de contagem de

Peters e levada ao microscópio óptico para a determinação da população de ovos, juvenis e adultos dos nematoides.

Foram determinadas altura de parte aérea (cm), comprimento do sistema radicular (cm), massa fresca e seca de raiz (g) e massa fresca e seca de parte aérea (g). Para determinação da altura de plantas, utilizou-se uma fita métrica, tomando como referência a distância do colo ao ápice da planta. E para determinação do comprimento de raiz, adotou-se como referência a distância do colo até o fim da raiz, sendo realizada antes da análise nematológica. A parte aérea e o sistema radicular, após a extração de nematoides, foram secos em estufa de circulação forçada de ar a 60°C, até atingirem o peso constante, obtido em 72 h para posterior determinação do valor do peso da matéria seca sendo realizada a pesagem em balança digital.

Os dados obtidos foram submetidos aos testes de normalidade (Teste de Kolmogorov-Smirnov<sup>a</sup>) e de homogeneidade do erro experimental (Teste de Levene) pelo programa estatístico SPSS Statistics vs. 20 (IBM CORP, 2011). As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa estatístico Sisvar versão 5.10 (FERREIRA, 2010) e as comparações entre os tratamentos foram realizadas pelo teste Tukey a 0,05 de significância. Quando não foram atendidas as pressuposições do modelo de homogeneidade de variâncias e normalidade de resíduos, foi realizada análise não paramétrica dos dados pelo Teste de Kruskal-Wallis e de Mann-Whitney U, a 0,05 de significância das amostras independentes, comparando os tratamentos por poços médios (BEIGUELMAN, 2002; CALLEGARI-JACQUES, 2003).

### **2.2.2 Avaliação de micro-organismos quitinolíticos**

Foram determinadas as populações de micro-organismos quitinolíticos presentes no solo em unidade formadoras de colônia (UFC).g<sup>-1</sup> de solo. Em cada tratamento foi coletada uma amostra simples de solo de cada repetição (alíquota de 150 cm<sup>3</sup>), que foram misturadas compondo uma amostra composta por tratamento. Cada amostra composta foi homogeneizada e passada em peneiras de 20 mesh, recolhendo-se 10g de solo e adicionando a este 90 mL de água destilada em frasco tampado. A solução foi agitada por 9 min em agitador TE-085. Em seguida realizou-se uma diluição de 10<sup>-3</sup> para o isolamento. O plaqueamento foi realizado adicionando-se 100 µL da suspensão em placas de Petri com meio de cultura CDA (*Chitosan Detector Agar*) contendo

quitosana como a única fonte de carbono, com a seguinte composição: 1,0g de NaCl; 2,0g de quitosana; 0,5g de  $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ ; 1,0g de  $\text{MgSO}_4$ ; 0,5g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 0,01g de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,001g de  $\text{FeSO}_4$ ; 0,01g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0,0086g de  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e 20,0g de Ágar, conforme proposto por Cheng e Li (2000). A suspensão foi espalhada uniformemente com o auxílio da alça de *Drigalski*. As placas foram incubadas em BOD a 28°C durante 3 dias. Após este período, a atividade quitinolítica dos micro-organismos foi detectada pela visualização de uma zona de hidrólise hialina em torno das colônias crescidas, determinando-se por contagem o número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC). $\text{g}^{-1}$  de solo.

Os dados obtidos foram submetidos aos testes de normalidade (Teste de Shapiro-Wilk) e de homogeneidade do erro experimental (Teste de Levene) pelo programa estatístico SPSS Statistics vs. 20 (IBM, 2014). As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa estatístico Sisvar versão 5.10 (FERREIRA, 2010) e a comparações entre os tratamentos foram realizadas pelo teste Tukey a 0,05 de significância.

### **2.3 Proteínas relacionadas à patogênese**

Para avaliar o efeito da quitina e/ou quitosana na ativação de proteínas relacionadas à patogênese em tomateiro, foi instalado um ensaio paralelo na casa de vegetação da UFU com os mesmos procedimentos anteriores. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), em arranjo fatorial 7 x 3 (combinação dos produtos x nematóides) + adicional, com cinco repetições, sendo a parcela experimental constituída por dois vasos contendo uma planta de tomateiro cada. Cada repetição representou um tempo de coleta: 2, 4, 6, 10 e 12 dias após a aplicação dos produtos. O tratamento adicional foi o tempo 0 para todos os tratamentos.

De cada planta coletou-se 1g de folhas que foram maceradas e homogeneizadas em 4mL de tampão acetato de sódio 100 mM (pH 5,0) com auxílio de almofariz, sendo centrifugadas a 14.000g por 25 min a 4°C. Os sobrenadantes foram coletados e armazenados em congelador a -20°C para posterior avaliação das proteínas (BOAVA *et al.*, 2010).

As avaliações de quitinases ocorreram no Laboratório de Nanobiotecnologia da UFU. Foram determinadas pelo *Chitinase Assay Kit* com absorbância de 405 nm,

através do *Synergy 2 Multidetection Microplate Reader* (*BioTek*), utilizando microplacas de 96 poços. O kit de ensaio para quitinase é baseado na hidrólise enzimática do substrato quitinase ( $\beta$ -N-acetilglucosaminidase), liberando p-nitrofenol (4-nitrofenol), que por ionização, em pH básico, pode ser medido colorimetricamente (SIGMA ALDRICH, 2014).

A atividade da quitinase é determinada em termos de equivalentes da enzima já conhecida de quitinase de *Trichoderma viride*. Os resultados foram expressos em unidades de absorbância. $\text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$ .

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante a condução do experimento, a temperatura média mínima e média máxima da casa de vegetação variou de 17 a 33°C, respectivamente.

Avaliando altura de parte aérea das plantas de tomateiro, verificou-se que houve interação significativa entre os fatores nematoides e produtos (TABELA 16).

**TABELA 16.** Altura de parte aérea (cm) de plantas de tomate tratadas com quitina e/ou quitosana via solo e/ou foliar para controle de nematoides das galhas. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2015.

Produtos	Sem nematoide	<i>M. incognita</i>	<i>M. javanica</i>
Quitina solo + Quitosana foliar	32,8aB	39,6aA	36,5aAB
Testemunha	34,3aA	37,8abA	32,8aA
Quitosana foliar	37,6aA	37,4abA	37,9aA
Quitina solo + Quitosana solo	32,1aA	35,5abA	36,8aA
Quitina solo	35,3aA	36,9abA	38,9aA
Quitosana solo	34,2aA	33,88abA	36,7aA
Quitosana solo e foliar	32,5aB	31,9bB	38,8aA
CV: 14,52% DMS <sub>Prod</sub> : 3,99 DMS <sub>Nem</sub> : 2,07 KS: 0,041* F: 1,437* Fc: 1,850			

CV: Coeficiente de variação dos dados. DMS<sub>Prod</sub>: Diferença mínima significativa para produtos. DMS<sub>Nem</sub>: Diferença mínima significativa para nematoides. KS: estatística do teste de Kolmogorov-Smirnov<sup>a</sup>. F: estatística do teste Levene. \*: significativo a 0,05. Fc: Valor de F calculado da análise de variância. Médias seguidas por letras distintas minúsculas na coluna e maiúsculas na linha diferem entre si a 0,05 de significância pelo teste Tukey.

Independente do nematoide inoculado, nenhum produto se diferiu da testemunha. Avaliando a variável produtos, o tratamento quitina solo + quitosana foliar apresentou maior média quando inoculado *M. incognita*. O tratamento quitosana solo e

foliar apresentou diferença significativa com inoculação de *M. javanica* em relação a *M. incognita* e sem inoculação de nematoide.

Não corroborando com esse trabalho, a aplicação foliar de quitosana no morangueiro, até certa dose ( $2 \text{ mL.L}^{-1}$ ), aumentou a altura das plantas e o número de folhas, resultado associado ao conteúdo de nitrogênio do produto, que favoreceu o desenvolvimento das plantas (ABDEL-MAWGOUD *et al.*, 2010). Em trabalho semelhante com a mesma cultura, a aplicação de quitosana via foliar ( $2,5$  ou  $5,0 \text{ mL.L}^{-1}$ ) favoreceu o crescimento vegetativo das plantas (EL-MINIAWY *et al.*, 2013).

Em relação ao comprimento de raiz, houve interação significativa entre os fatores nematoídeos e produtos (TABELA 17).

**TABELA 17.** Comprimento de raiz (cm) de plantas de tomate tratadas quitina e/ou quitosana via solo e/ou foliar para controle de nematoídes das galhas. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2015.

Produtos	Sem nematoide	<i>M. incognita</i>	<i>M. javanica</i>
Quitina solo	32,4aA	33,4aA	35,6aA
Quitina solo+ Quitosana foliar	31,1aAB	29,6abB	34,8aA
Quitosana solo e foliar	26,8aB	27,2abcB	33,0aA
Quitina solo+ Quitosana solo	27,3aB	26,2bcB	37,2aA
Testemunha	28,7aAB	24,9bcB	31,7aA
Quitosana solo	32,3aA	23,1cB	33,4aA
Quitosana foliar	27,0aAB	22,8cB	31,7aA
CV: 15,5% DMS <sub>Prod</sub> : 3,58 DMS <sub>Nem</sub> : 1,85 KS: 0,044* F: 0,816* Fc: 2,30			

CV: Coeficiente de variação dos dados. DMS<sub>Prod</sub>: Diferença mínima significativa para micro-organismos. DMS<sub>Nem</sub>: Diferença mínima significativa para nematoídes. KS: estatística do teste de Kolmogorov-Smirnov<sup>a</sup>. F: estatística do teste Levene. \*: significativo a 0,05. Fc: Valor de F calculado da análise de variância. Médias seguidas por letras distintas minúsculas na coluna e maiúsculas na linha diferem entre si a 0,05 de significância pelo teste Tukey.

Sem inoculação de nematoídes e com *M. javanica* não houve diferença significativa entre os produtos. Com inoculação de *M. incognita*, a aplicação de quitina solo obteve maior média, se diferindo estatisticamente da testemunha. Comparando a variável produtos, com exceção do produto quitina solo, quando inoculado *M. javanica*, houve aumento do comprimento radicular das plantas em relação a *M. incognita*. A inoculação de *M. javanica* apresentou maiores médias com aplicação dos produtos quitosana solo e foliar e quitina solo + quitosana solo, em relação as plantas não inoculadas.

A quitina aplicada de forma isolada no solo foi o único produto capaz de favorecer o comprimento radicular independente da interferência ou não de nematoides. A quitina é rica em nitrogênio o que pode favorecer, pela ativação da biomassa microbiana, a produção de substâncias promotoras de crescimento e a liberação de nutrientes presentes no solo para o desenvolvimento de plantas (CASTRO *et al.*, 2011).

Para peso fresco de raiz os resultados são apresentados na Tabela 18.

**TABELA 18.** Peso fresco raiz (g) de plantas de tomate tratadas com quitina e/ou quitosana via solo e/ou foliar para controle de nematoides das galhas. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2015.

Produtos	Sem nematoide	<i>M. incognita</i>	<i>M. javanica</i>
Quitina solo	9,88aAB	12,84aA	5,79aB
Testemunha	7,29abA	8,22bcA	6,19aA
Quitina solo + Quitosana foliar	8,12abAB	10,76abA	6,12aB
Quitosana foliar	7,41abA	6,66cA	5,42aA
Quitosana solo e foliar	6,66bA	8,07bcA	6,84aA
Quitosana solo+ Quitosana solo	6,61bA	8,7bcA	7,16aA
Quitosana solo	5,66bA	6,31cA	5,88aA

Tratamentos seguidos por letras distintas minúsculas na coluna e maiúsculas na linha diferem entre si pelo Teste de Kruskal-Wallis e de Mann-Whitney U, a 0,05 de significância das amostras independentes.

Sem a inoculação de nematoides e com *M. javanica* nenhum produto se diferiu da testemunha. Com inoculação de *M. incognita*, a aplicação de quitina no solo resultou em maior massa fresca de raiz em relação à testemunha. Em relação aos produtos, o peso fresco de raiz aumentou com inoculação de *M. incognita* em relação a *M. javanica* nos produtos: quitina solo; quitina solo + quitosana foliar.

Pode-se inferir que a quitina via solo retardou a interferência de *M. incognita* no desenvolvimento do sistema radicular do tomateiro. Estudando a aplicação de quitina no solo na cultura do azevém, Sarathchandra *et al.* (1996), verificaram que o peso de parte aérea das plantas foram maiores, provavelmente devido ao N mineralizado pela quitina.

Para peso fresco de parte aérea não houve interação significativa entre os fatores nematoides e produtos (TABELA 19).

**TABELA 19.** Peso fresco de parte aérea (g) de plantas de tomate tratadas com quitina e/ou quitosana via solo e/ou foliar para controle de nematoides das galhas. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2015.

Produtos	Sem nematoide <sup>1</sup>	<i>M.</i> <i>incognita</i> <sup>1</sup>	<i>M.</i> <i>javanica</i> <sup>1</sup>	Médias
Quitina	19,09	24,97	23,37	22,47a
Quitina solo + Quitosana foliar	16,70	23,84	24,00	21,51ab
Quitosana foliar	19,37	18,71	25,05	21,03abc
Quitina solo+ Quitosana solo	15,15	20,17	21,56	18,96bcd
Quitosana solo e foliar	14,94	18,54	22,51	18,66bcd
Testemunha	15,96	19,06	18,47	17,74cd
Quitosana solo	15,67	16,78	20,08	17,51d
Média	16,66C	20,29B	22,14A	

CV<sub>T</sub>: 7,11% CV<sub>NT</sub> : 21,46% DMS<sub>Prod</sub>: 3,25 DMS<sub>Nem</sub>:1,68 KS: 0,066 \*  
F: 1,387\* Fc:1,707

<sup>1</sup>Dados transformados para Log (x + 1,0). As médias originais são apresentadas. CV<sub>T</sub>: Coeficiente de variação dos dados transformados. CV<sub>NT</sub>: Coeficiente de variação dos dados não transformados. DMS<sub>Prod</sub>: Diferença mínima significativa para produtos. DMS<sub>Nem</sub>: Diferença mínima significativa para nematoides. KS: estatística do teste de Kolmogorov-Smirnov<sup>a</sup>. F: estatística do teste Levene.\*: significativo a 0,05. Fc: Valor de F calculado da análise de variância. Médias seguidas por letras distintas minúsculas na coluna e maiúsculas na linha diferem entre si a 0,05 de significância pelo teste Tukey.

A aplicação de quitina solo e quitina solo + quitosana foliar resultou em maior desenvolvimento da parte aérea em relação à testemunha. A inoculação de *M. javanica* e *M. incognita* favoreceu o peso fresco de parte aérea em relação a não inoculação de nematoides.

Os resultados significativos obtidos pela aplicação de quitina via solo são justificadas pelo fornecimento de nitrogênio e favorecimento de micro-organismos benéficos do solo. Apesar dos resultados encontrados com a combinação da quitina solo + quitosana solo, não se pode afirmar que a quitosana favoreceu o desenvolvimento das plantas, visto que sua aplicação foliar de forma isolada não apresentou resultados satisfatórios. Esse resultado contradiz o trabalho de Abdel-Mawgoud *et al.* (2010), em que a quitosana aplicada nas folhas de morango favoreceu o aumento biomassa das folhas.

Para peso seco de raiz os resultados são expressos na Tabela 20.

**TABELA 20.** Peso seco de raiz (g) de plantas de tomate tratadas com quitina e/ou quitosana via solo e/ou foliar para controle de nematoides das galhas. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2015.

Produtos	Sem nematoide	<i>M. incognita</i>	<i>M. javanica</i>
Quitosana solo e foliar	1,16aA	0,75aB	1,0aAB
Quitina solo	1,02abA	1,10aA	0,92aA
Quitosana foliar	1,02abA	0,74aA	0,96aA
Quitina solo + Quitosana solo	0,90abA	0,99aA	0,73aA
Quitina solo + Quitosana foliar	0,89abAB	1,03aA	0,69aB
Testemunha	0,84abA	0,76aA	0,69aA
Quitosana solo	0,74bA	0,82aA	0,69aA

Tratamentos seguidos por letras distintas minúsculas na coluna e maiúsculas na linha diferem entre si teste de Kruskal-Wallis e de Mann-Whitney U, a 0,05 de significância das amostras independentes.

Independentemente do nematoide inoculado, nenhum produto se diferiu da testemunha no peso seco de raiz. Com aplicação de quitosana solo e foliar, a inoculação de *M. incognita* reduziu o peso seco de raiz em relação a não inoculação de nematoides. O que pode explicar a redução do peso seco de raiz com o nematoide é o fato de que fitonematoides causam mudanças anatômicas nas raízes, ocasionando alteração na absorção de água e nutrientes e redução do sistema radicular por disfunções ocasionadas (ABRÃO; MAZZAFERA, 2001).

A aplicação de vermicomposto combinado com quitosana ao solo promoveu incrementos do peso fresco e seco da parte aérea e peso fresco de raiz de tomateiro (CASTRO *et al.*, 2011). Ao avaliar diferentes modos de aplicação da quitosana na cultura do arroz cv. Suphanburi, Boonlertnirun *et al.*, (2008), observaram maior produção de matéria seca de raiz com aplicação via sementes e no solo. Segundo os autores, este fato pode estar associado ao maior período de disponibilidade da quitosana no solo, quando comparado à aplicação nas folhas.

Para peso seco de parte aérea, não houve interação significativa entre os fatores nematoides e produtos (TABELA 21).

**TABELA 21.** Peso seco de parte aérea (g) de plantas de tomate tratadas com quitina e/ou quitosana via solo e/ou foliar para controle de nematoides das galhas. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2015.

Produtos	Sem nematoide <sup>1</sup>	<i>M.</i> <i>incognita</i> <sup>1</sup>	<i>M.</i> <i>javanica</i> <sup>1</sup>	Médias
Quitosana foliar	2,55	2,21	4,03	2,93a
Quitina solo	2,23	3,21	3,51	2,98a
Quitina solo+ Quitosana foliar	1,98	3,04	3,83	2,95a
Quitosana solo e foliar	1,67	2,16	3,64	2,49ab
Quitina solo + Quitosana solo	1,67	2,67	3,23	2,53ab
Testemunha	1,70	2,11	2,68	2,16b
Quitosana solo	1,51	1,71	2,78	2,00b
Médias	1,90C	2,44B	3,39A	

CV<sub>NT</sub>: 31,65% CV<sub>T</sub>: 11,67% DMS<sub>Prod</sub>: 0,62 DMS<sub>Nem</sub>: 0,32 KS: 0,053\*

F: 1,314\* Fc: 1,714

<sup>1</sup>Dados transformados para  $\sqrt{x} + 1,0$ . As médias originais são apresentadas. CV<sub>T</sub>: Coeficiente de variação dos dados transformados. CV<sub>NT</sub>: Coeficiente de variação dos dados não transformados. DMS<sub>Prod</sub>: Diferença mínima significativa para produtos. DMS<sub>Nem</sub>: Diferença mínima significativa para nematoides. KS: estatística do teste de Kolmogorov-Smirnov<sup>a</sup>. F: estatística do teste Levene. \*\*: Significativo a 0,01. \*: significativo a 0,05. Fc: Valor de F calculado da análise de variância. Médias seguidas por letras distintas minúsculas na coluna e maiúsculas na linha diferem entre si a 0,05 de significância pelo teste Tukey.

A aplicação de quitina solo e quitosana foliar, ou a combinação de ambas, favoreceu o desenvolvimento da parte aérea das plantas. Assim como a inoculação dos nematoides em relação às plantas não inoculadas.

Possivelmente a aplicação de quitina no solo aumentou a disponibilidade de N e outros nutrientes no solo, o que pode também ter induzido à maior alocação de biomassa para a parte aérea, principalmente para as folhas, como resposta a menor necessidade de produção de raízes para a absorção de nutrientes (BENCHIMOL *et al.*, 2006), como foi observado nesse trabalho. Ainda de acordo com Boonlertnirun e colaboradores (2008), a quitina serve como fonte de carbono para micro-organismos do solo e ajuda a acelerar o processo de transformação da matéria orgânica para matéria inorgânica, que é facilmente absorvido pelas plantas.

Ao contrário do peso fresco de parte aérea (TABELA 19), com esse resultado é possível inferir que a quitosana quando aplicada via foliar favoreceu o desenvolvimento aéreo das plantas. Isso pode ter ocorrido devido à baixa turgidez das células das folhas durante a coleta das plantas, que apresentaram baixo conteúdo em água. A quitosana possui na sua constituição química entre 6,89 a 8,7% de nitrogênio, o que pode

promover aumento no crescimento vegetativo e reprodutivo em algumas plantas (OTHA *et al.*, 2000).

Incrementos significativos na massa seca de plantas de pimenta do reino foram obtidos com a adição de 0,5% de casca de caranguejo no solo (BENCHIMOL *et al.*, 2006). Os autores afirmam que o aumento na disponibilidade de N entre outros nutrientes, no solo contribuiu para a obtenção desses resultados. O desenvolvimento satisfatório de plântulas de repolho (*Brassica oleraceae* L.) e a supressão do tombamento provocado por *Rhizoctonia solani* J.G. Kühn foram obtidos com a utilização de substrato composto de casca de caranguejo e outros materiais orgânicos (HUANG; HUANG, 2000).

A aplicação isolada da quitosana via solo, não permitiu bom desenvolvimento aéreo das plantas. Esse dado não corrobora com Otha *et al.* (2000), que observaram que o crescimento do lisianto (*Eustoma grandiflorum* Shinners) foi melhorado na presença de quitosana a 1% acrescida ao solo.

Para análise do fator de reprodução os resultados são expressos na Tabela 22.

**TABELA 22.** Fator de reprodução de *M. incognita* e *M. javanica* em plantas de tomate tratadas com quitina e/ou quitosana via solo e/ou foliar. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2015.

Produtos	<i>M. incognita</i>	<i>M. javanica</i>
Testemunha	4,76abA	7,78aA
Quitosana solo	6,46aA	3,17abA
Quitina solo+ Quitosana solo	3,68abA	2,42abA
Quitosana foliar	1,34bA	2,16abA
Quitosana solo e foliar	2,95abA	1,62abA
Quitina solo	4,02abA	0,86bB
Quitina solo + Quitosana foliar	3,19abA	0,83bB

Tratamentos seguidas por letras distintas minúsculas na coluna e maiúsculas na linha diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis e de Mann-Whitney U, a 0,05 de significância das amostras independentes.

Para *M. incognita* nenhum produto reduziu o fator de reprodução em relação à testemunha. Já para *M. javanica* a aplicação de quitina solo e quitina solo + quitosana foliar foram eficazes na redução do fator de reprodução do nematoide.

Os mecanismos envolvidos com a supressão de nematoides com uso de materiais orgânicos como a quitina são relacionados com a modificação das propriedades físicas e químicas do solo; liberação de compostos nematicidas do material

orgânico; aumento da resistência das plantas e aumento dos micro-organismos antagonistas (OKA, 2010). Além disso, liberação de compostos voláteis como ácidos orgânicos e compostos nitrogenados ( $\text{NH}_3$ ) a partir da decomposição de resíduos orgânicos tem mostrado atividade nematicida (CASTRO *et al.*, 2011).

A aplicação de quitina no solo provoca resultados adversos sobre as proporções de nematoides (DE-JIN *et al.*, 2005), podendo essa variação ocorrer pela forma e quantidade aplicada ou ainda pelo fitonematoide avaliado.

No trevo branco o nematoide de cisto, *Heterodera trifolii* Schimidt, foi significativamente reduzido com aplicação de quitina no solo, possivelmente devido ao aumento dos níveis de quitinase produzidos por microrganismos da rizosfera. No mesmo trabalho, os nematoides *Pratylenchus* spp. Godfrey e *Tylenchus* spp. Bastian, também foram reduzidos em raízes de azevém, como resultado da alteração quitina (SARATHCHANDRA *et al.*, 1996).

A aplicação isolada de quitina via solo não reduziu o fator de reprodução, número de galhas e massas de ovos por raiz de *M. incognita* em tomateiro (CASTRO *et al.*, 2011). A adição de quitina a 1% (v/v) no solo reduziu significativamente a infestação de *M. incognita* após o segundo plantio de algodoeiro cv. Rowden (HALLMANN *et al.*, 1999). Os autores inferiram que a supressividade ao nematoide, ocasionada pela quitina, pode ocorrer em longo prazo, devido à alteração orgânica do solo, associado ao aumento nas populações bacterianas e fúngicas, especialmente aqueles com atividade quitinolítica.

Apesar de relatos na literatura a respeito da eficiência da quitosana contra nematoides do gênero *Meloidogyne*, nesse trabalho isso não foi verificado. Segundo Berger *et al.*, (2011), a atividade antimicrobiana da quitosana é devido ao grupamento amino em sua forma poliaciônica, na presença de pH abaixo de 6. Nessas condições, o produto é capaz de interagir com as cargas negativas da membrana celular do fitonematoide, causando mudanças na permeabilidade da membrana plasmática, e perda de componentes. Vale ressaltar, que nesse trabalho as condições não foram ideais para que ocorresse esse processo, pois a acidez do solo foi corrigida antes da montagem do experimento.

Essa propriedade da quitosana foi testada por Liu *et al.* (2004), que observaram efeito inibitório do crescimento dos micro-organismos *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* na presença de quitosana, sugerindo

que o produto pode se ligar a superfície da célula formando um filme ao redor desta, dificultando o transporte de nutrientes pela membrana plasmática.

Para análise do número de ovos, juvenis e adultos de *M. incognita* e *M. javanica* por grama de raiz os resultados são expressos na Tabela 23.

**TABELA 23.** Ovos, juvenis e adultos de *M. incognita* e *M. javanica* por grama de raiz de plantas de tomate tratadas com quitina e/ou quitosana via solo e/ou foliar. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2015.

Produtos	<i>M. incognita</i>	Redução (%)	<i>M. javanica</i>	Redução (%)
Testemunha	4786,01abA	-	10153,28aA	-
Quitosana solo	8070,74aA	+68,63	5621,14abA	44,63
Quitosana solo e foliar	2740,54abA	42,73	2070,67abA	79,60
Quitina solo + Quitosana solo	3202,25abA	33,09	3081,37abA	69,65
Quitina solo+ Quitosana foliar	2190,32abA	54,22	1263,53bB	87,55
Quitina solo	2339,72abA	51,11	1701,57bA	83,24
Quitosana foliar	1117,25b	76,65	3667,02ab	63,88

Tratamentos seguidos por letras distintas minúsculas na coluna e maiúsculas na linha diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis e de Mann-Whitney U, a 0,05 de significância das amostras independentes.

O número de ovos, juvenis e adultos de *M. incognita* e *M. javanica* por grama de raiz seguiu o mesmo padrão da análise do fator de reprodução (TABELA 22). Não houve diferença significativa dos produtos para *M. incognita*, mas para *M. javanica* a quitina solo e quitina solo + quitosana foliar diferiram significativamente da testemunha, apresentando redução da população de 83,24 e 87,55%, respectivamente.

De acordo com Castro *et al.*, (2011), a aplicação de quitina com vermicomposto mostrou redução significativa no número de *M. incognita* por sistema radicular no tomateiro. Quando a quitina foi aplicada isolada, não foram observadas diferenças significativas, como mostra este trabalho. De-Jin *et al.* (2005) indicaram que a aplicação de composto com quitina reduziu de maneira significativa número de galhas de *M. incognita* em raízes de tomateiro em 64% em relação ao controle. Os autores indicam que a atividade quitinolítica pode ser um fator relevante para redução da infecção de nematóides.

Na análise de micro-organismos quitinolíticos no solo, houve interação significativa entre os fatores nematóides e produtos (TABELA 24).

**TABELA 24.** Micro-organismos quitinolíticos no solo após tratamento com quitina e/ou quitosana via solo e/ou foliar para controle de nematoídeas das galhas. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2015.

Produtos	UFC.g <sup>-1</sup> de solo (x10 <sup>3</sup> )		
	Sem nematoide <sup>1</sup>	<i>M. incognita</i> <sup>1</sup>	<i>M. javanica</i> <sup>1</sup>
Quitina solo	393,33aA	220,00aA	493,33aA
Quitina solo + Quitosana foliar	360,00aA	43,33bcB	36,66bB
Quitosana foliar	40,00bA	36,66bcA	13,33bA
Quitosana solo e foliar	40,00bA	30,00bcA	36,66bA
Quitosana solo	30,00bA	20,00cA	20,00bA
Quitina solo+ Quitosana solo	26,66bB	113,33abA	23,33bB
Testemunha	13,33bA	16,666cA	13,33bA

CV<sub>T</sub>: 5,66% CV<sub>NT</sub>: 62,96% DMS<sub>Prod</sub>: 88399,53 DMS<sub>Nem</sub>: 45426,12 W: 0,975\*  
F: 1,776\* Fc:6,761

<sup>1</sup>Dados transformados para Log (x + 1,0). As médias originais são apresentadas. CV<sub>T</sub>: Coeficiente de variação dos dados transformados. CV<sub>NT</sub>: Coeficiente de variação dos dados não transformados. DMS<sub>Prod</sub>: Diferença mínima significativa para produtos. DMS<sub>Nem</sub>: Diferença mínima significativa para nematoídeas. W: estatística do teste de Shapiro-Wilk. F: estatística do teste Levene.\*: significativo a 0,05. Fc: Valor de F calculado da análise de variância. Médias seguidas por letras distintas minúsculas na coluna e maiúsculas na linha diferem entre si a 0,05 de significância pelo teste Tukey.

Sem nematoide, a aplicação de quitina solo e quitina solo + quitosana foliar levou a um aumento significativo de micro-organismos quitinolíticos do solo, em relação à testemunha. Com inoculação de *M. incognita* esse aumento foi verificado com quitina solo e quitina solo + quitosana solo; e para *M. javanica* resultados significativos foram obtidos apenas com aplicação de quitina solo (FIGURA 11). O que sugere que a quitina é a responsável pelo aumento desses micro-organismos no solo.

Apesar do aumento das populações de micro-organismos quitinolíticos com quitina solo e quitina solo + quitosana solo na inoculação de *M. incognita*, essa elevação da população não foi suficiente para reduzir o fator de reprodução do nematoide.

**FIGURA 07.** Micro-organismos quitinolíticos com halo de degradação da quitosana como única fonte de carbono do meio de cultura. Fonte: MOTA, 2015.



O resultado encontrado explica em parte, a redução no fator de reprodução de *M. javanica*. A adição de quitina ao solo leva ao aumento da população de micro-organismos quitinolíticos e à supressão de fungos fitopatogênicos e fitonematoídes presentes no solo. Esse aumento nas comunidades de fungos e bactérias em solo tem sido atribuído ao aumento do suprimento de C e N, advindo da adição da quitina (BENCHIMOL *et al.*, 2006; HALLMANN *et al.*, 1999).

Castro e colaboradores (2011) verificaram que a aplicação isolada de quitina aumentou a população de micro-organismos no solo, principalmente de fungos. Quando aplicado somente vermicomposto sem quitina não foram observadas alterações significativas na população de fungos. De acordo com os autores, os fungos têm mostrado grande potencial no controle de nematoídes, devido à degradação da quitina presente na casca dos ovos dos fitonematoídes.

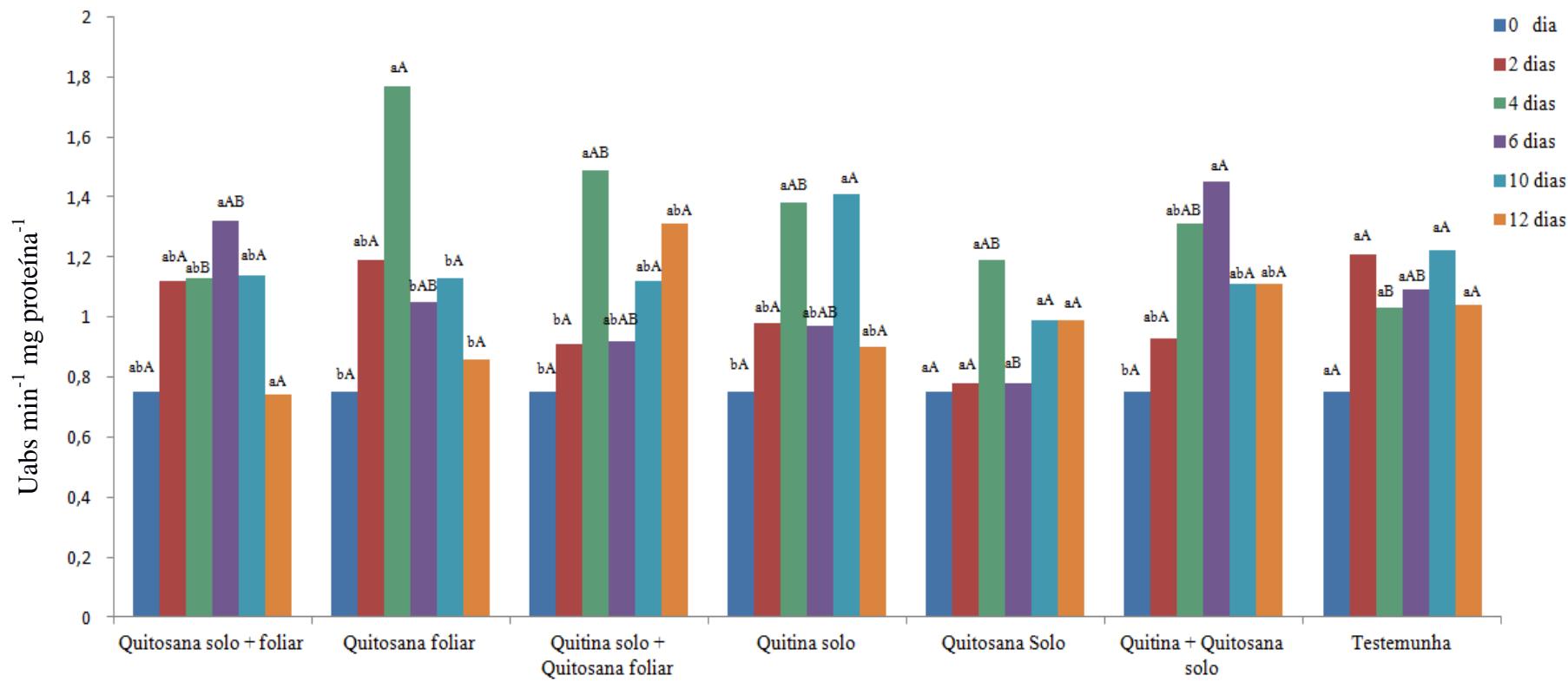
A adição de quitina no solo a 1% (v/v), causou a supressão *M. incognita*, em algodoeiro devido à supressão com populações crescentes de fungos quitinolíticos (HALLMANN *et al.*, 1999). Em outro trabalho, a diminuição da incidência de podridão de raízes causada por *Fusarium* spp. em diferentes culturas pela adição de casca de camarão moída (fonte de quitina) ao solo foi atribuída ao estímulo do desenvolvimento de micro-organismos antagônicos ao patógeno (BETTIOL; GHINI, 2004).

Quitina aplicada via solo no azevém e no trevo branco, aumentou as populações no solo de bactérias, fungos e nematoídes de vida livre, em 13, 2,5 e 5,4 vezes, respectivamente (SARATHCHANDRA *et al.*, 1996). Estudando a multiplicação de *B.*

*subtilis* na presença de quitina, Manjula e Podile (2001), verificaram um aumento significativo no número de células da bactéria com utilização do produto.

A atividade da enzima quitinase em folhas de tomateiro atacadas por *M. javanica* apresentou resultados expressivos para determinados produtos (FIGURA 08).

**FIGURA 08.** Atividade da enzima quitinase em unidade de absorbância.minuto<sup>-1</sup>.mg de proteína<sup>-1</sup>, de plantas de tomateiro atacadas por *Meloidogyne javanica* e tratadas com e sem quitina via solo e/ou quitosana via solo e/ou foliar. Médias seguidas por letras distintas minúsculas, para tempo, e maiúsculas para produtos, diferem entre si a 0,05 de significância pelo teste de Tukey. Fonte: MOTA, 2015.



Após quatro dias da aplicação dos produtos, foi evidenciado aumento expressivo na atividade da enzima quitinase das folhas, nos tratamentos com aplicação de quitosana foliar, quitina solo + quitosana foliar e quitina solo. A atividade da enzima com aplicação de quitina solo + quitosana solo foi evidenciada após seis dias da aplicação. Em relação aos produtos, houve diferença apenas entre quitosana foliar, aos quatro dias, que se diferiu estatisticamente da testemunha.

Esses resultados podem ser correlacionados com a redução do fator reprodução obtido nos tratamentos quitina solo, quitosana foliar e associação entre ambas (TABELA 22). O que explica essa correlação é o fato que a planta ao ser exposta ao agente indutor quitosana via folha, expressou o fenômeno de Resistência Sistêmica Induzida (ISR), apresentando defesas contra o patógeno (ARAÚJO; MENEZES, 2009) pelo aumento da atividade da enzima.

No caso da quitina quando aplicada via solo, foi comprovado aumento de micro-organismos quitinolíticos no solo (TABELA 24), ou seja, possivelmente a extensa colonização da rizosfera de micro-organismos indutores de ISR, que levou ao aumento da atividade de quitinases. Muitos componentes bacterianos individuais induzem ISR, tais como lipopolissacarídeos, flagelos, ácido salicílico e sideróforos (VAN-LOON, 2007). A indução de resistência confere “memória imunológica”, que podem durar semanas, e até mesmo em toda a fase de crescimento da planta (FU; DONG, 2013), suprimindo a infecção por fitopatógenos.

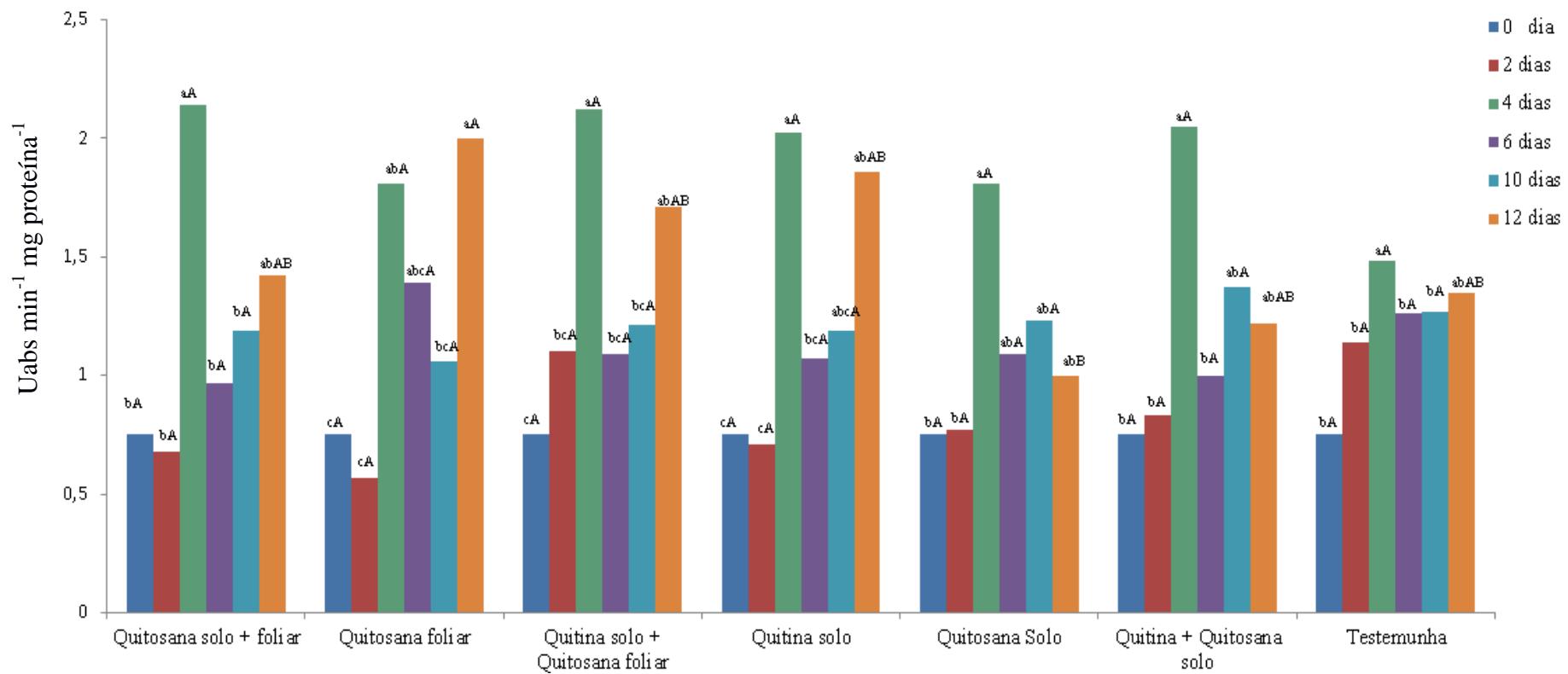
A adição de casca de caranguejo, ao solo reduziu a infecção de *M. javanica* em tomateiro (SPIEGEL *et al.*, 1987). Esta redução foi parcialmente atribuída ao aprimoramento das populações de micro-organismos do solo com atividade de quitinolítica que reduziram a atividade e sobrevivência dos nematoides, além de induzirem resistência.

Compostos produzidos pela planta, durante o processo de doença, têm desempenhado um papel crucial na resistência ao organismo invasor (CAMPOS *et al.* 2004). Avaliando o efeito da quitosana no feijoeiro, Di-Piero e Garda (2008), verificaram aumento na atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase, em folhas previamente tratadas. Sendo que esse aumento foi pouco perceptível no segundo dia após o tratamento, mas ficou evidenciado no quarto dia, quando se detectou pico na atividade enzimática; como ocorreu nesse trabalho.

Apesar do pico de atividade da quitinase observado com aplicação de quitina solo+ quitosana solo aos seis dias após a aplicação dos produtos (FIGURA 08), essa indução de resistência não foi significativa na redução do fator de reprodução.

A atividade da enzima quitinase em folhas de tomateiro atacadas por *M. incognita* está representada na Figura 09.

**FIGURA 09.** Atividade da enzima quitinase em unidade de absorbância. $\text{minuto}^{-1}.\text{mg proteína}^{-1}$ , de plantas de tomateiro atacadas por *Meloidogyne incognita*, e tratadas com e sem quitina via solo e/ou quitosana via solo e/ou foliar. Médias seguidas por letras distintas minúsculas, para tempo, e maiúsculas para produtos, diferem entre si a 0,05 de significância pelo teste de Tukey. Fonte: MOTA, 2015.



Não foi observada diferença entre os produtos aplicados na atividade da enzima, independente do tempo observado.

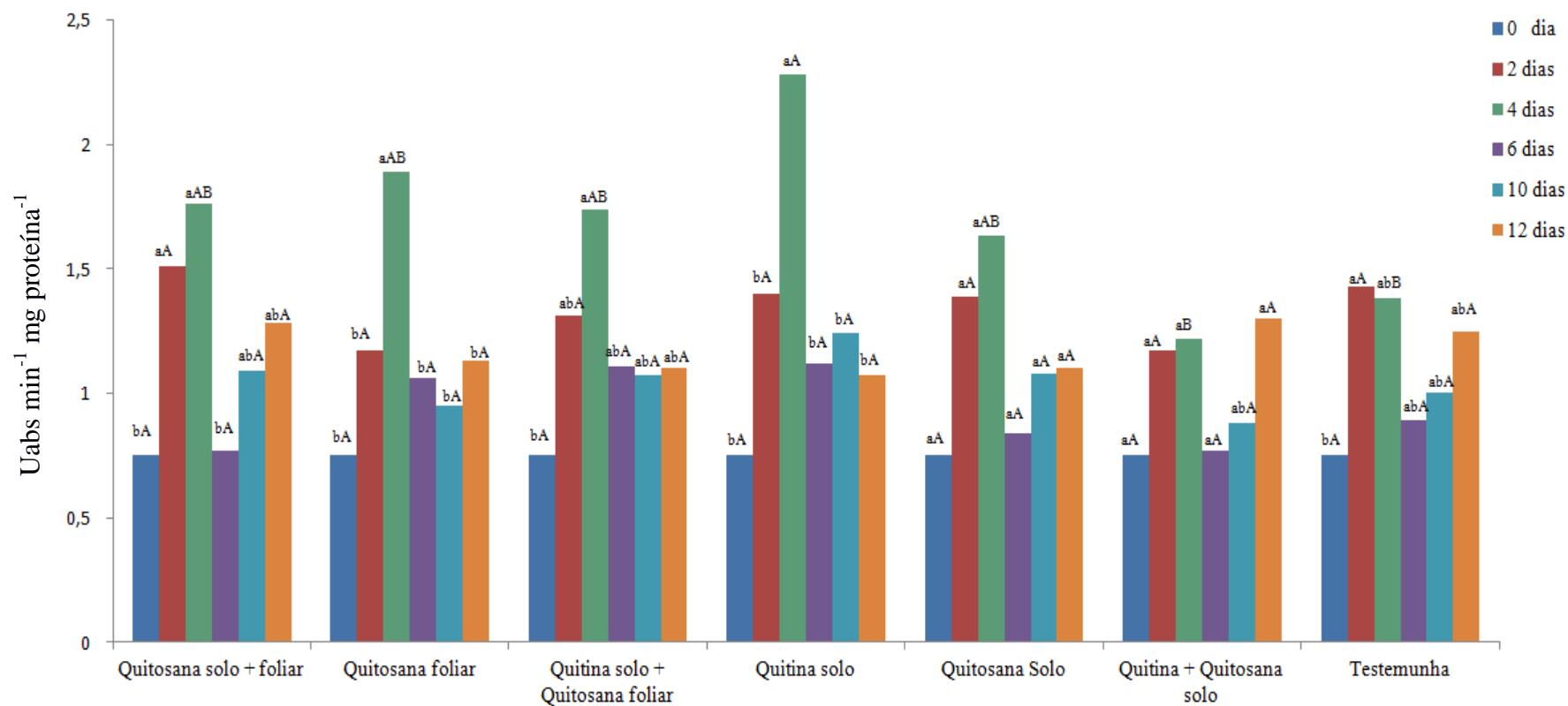
Apesar de ser observado um pico de atividade da enzima quitinase nas folhas do tomateiro após quatro dias da aplicação de todos os produtos; aos doze dias com a quitina solo; quitina solo + quitosana foliar; e quitosana foliar, isso não foi suficiente para controle de *M. incognita*. A rapidez de indução de quitinase em tecidos de plantas varia consideravelmente dependendo na interação patógeno-hospedeiro específico, bem como ao comportamento do patógeno e interação patógeno-hospedeiro ao nível celular também podem influenciar a eficácia das quitinases (PUNJA; ZHANG, 1993).

Vale ressaltar que a planta foi colocada em um solo infectado com nematoides, e após a infecção por um agente patogênico, a célula hospedeira dispara um sinal a ser emitido em toda a planta, o que resulta na Resistência Sistêmica Adquirida (SAR). Nesse contexto, proteínas relacionadas à patogênese (PRP), como as quitinases, se acumulam localmente ou sistemicamente nas plantas como resposta a infecção por patógenos e como resposta a resistência induzida (PUNJA; ZHANG, 1993; TIRYAKI; TUNAZ, 2004; VAN-LOON *et al.*, 1994). Esse fato pode ser observado no aumento de quitinase no tratamento testemunha, aos 4 dias após aplicação dos produtos, resultante da infecção por nematoides.

No patossistema caupi-*Macrophomina phaseolina* a atividade da enzima quitinase mostrou-se efetivamente aumentada nos tratamentos com ASM em associação com o patógeno ou isoladamente (SOBRINHO, 2004), o que reforça o fato da atividade da quitinase ser aumentada com infecção por um agente patogênico.

A atividade da enzima quitinase em folhas de tomateiro está representada abaixo (FIGURA 10).

**FIGURA 10.** Atividade da enzima quitinase em unidade de absorbância.minuto<sup>-1</sup>.mg de proteína<sup>-1</sup>, de plantas de tomateiro tratadas com e sem quitina via solo e/ou quitosana via solo e/ou foliar. Médias seguidas por letras distintas minúsculas, para tempo, e maiúsculas para tratamentos, diferem entre si a 0,05 de significância pelo teste de Tukey. Fonte: MOTA, 2015.



Foi verificado aumento da atividade da enzima quitinase no segundo dia após aplicação dos produtos apenas para os produtos quitosana solo + foliar. Aos quatros dias, o aumento foi verificado para produtos quitosana solo + foliar, quitosana foliar, quitina solo, quitina solo + quitosana foliar. Em relação aos produtos, houve diferença apenas entre quitina solo; quitina solo + quitosana foliar, aos quatro dias, que se deferiram da testemunha.

A atividade da enzima quitinase em plantas sem inoculação de nematoídes não seguiu a mesma tendência observado nos gráficos anteriores, quando foram inoculados nematoídes. Um pico da atividade foi demonstrado em todos os tratamentos, com exceção da quitina solo + quitosana solo e da testemunha. Após esse período houve uma queda da atividade que se manteve constante até o 12º dia. Quando inoculado nematoídes (FIGURA 12 e 13), essa aumento da atividade, na maioria dos tratamentos, também foi mais evidente no quarto dia, porém houve um aumento da expressão da atividade em outros dias, que variou com tratamento. O que justifica esses outros picos elevados de atividade enzimática, é o fato de que houve infecção ocasionada pelos fitonematoídes, que desencadearam a Resistência Sistêmica Adquirida (SAR) na planta, o que não ocorreu na representação deste último gráfico. Segundo Van-Loon *et al.* (1994), tanto a infecção por patógenos, como resposta a resistência induzida, acumulam proteínas relacionadas a patogênese nas plantas como a quitinase.

#### 4 CONCLUSÕES

Quitina via solo aumentou comprimento e o peso fresco de raiz em plantas inoculadas com *M. incognita*. Quando associada à quitosana via foliar, também, promoveu peso aéreo das plantas.

A aplicação de quitina via solo e associada com quitosana foliar, reduziu o fator de reprodução e a população por grama de raiz de *M. javanica*. Para *M. incognita* não foram obtidos resultados expressivos.

Quitina via solo aumentou a população de micro-organismos quitinolíticos do solo.

A aplicação de quitina solo, quitosana foliar, e associação de ambas, aumentou a atividade da enzima quitinase nas folhas do tomateiro quatro dias após aplicação, independente do nematoide inoculado.

## REFERÊNCIAS

- ABDEL-MAWGOUD, A.M.R.; TANTAWY, A.S.; EL-NEMR, M.A.; SASSINE, Y.N. Growth and yield responses of strawberry plants to chitosan application. **European Journal of Scientific Research**, Mahé, v. 39, n. 1, p. 161-168, 2010. Disponível em: <<http://connection.ebscohost.com/c/articles/50881526/growth-yield-responses-strawberry-plants-chitosan-application>>. Acesso em: 29 dez. 2014.
- ABRAÃO, M.M.; MAZZAFERA, P. Efeitos do nível de inóculo de *Meloidogyne incognita* em algodoeiro. **Bragantia**, Campinas, v. 60, n. 1, p. 19-26, 2001. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0006-87052001000100003&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0006-87052001000100003&script=sci_arttext)>. Acesso em: 27 dez. 2014.
- AGRINOS: innovadores por naturaleza. HYT-C: Bio quitina. 2014. Disponível em: <<http://www.agrinos.com.mx/reporteco/upload/procesos/HYTc%20BioQuitina.pdf>>. Acesso em: 29 out. 2014.
- ARAÚJO, F.F.; MENEZES, D. Indução de resistência a doenças foliares em tomateiro por indutores biótico (*Bacillus subtilis*) e abiótico (Acibenzolar-S-Metil). **Summa phytopathologica**, Botucatu, v. 35, n. 3, p. 169-172, 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/sp/v35n3/a01v35n3.pdf>>. Acesso em: 03 nov. 2014.
- BEIGUELMAN, B. **Curso prático de bioestatística**. São Paulo: FUNPEC, 2002.
- BENCHIMOL, R.L.; SUTTON, J. C.; DIAS FILHO, M. B. Potencialidade da casca de caranguejo na redução da incidência de fusariose e na promoção do crescimento de mudas de pimenteira-do-reino. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, p. 180-184, 2006. Disponível em <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-41582006000200009](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-41582006000200009)>. Acesso em: 03 jan. 2015.
- BERGER, L.R.R.; STAMFORD, T.C.H.M., STAMFORD, N.P. Perspectivas para o uso da quitosana na agricultura. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, País Vasco, v. 12, n. 4, 2011. Disponível em: <<http://www.ehu.es/reviberpol/pdf/AGO11/ramos.pdf>>. Acesso em: 06 nov. 2014.
- BETTIOL, W.; GHINI, R. Métodos alternativos usados com sucesso no Brasil para o controle de doenças de plantas. In: STADNICK, M.J.; TALAMINI, V. (Eds.). **Manejo Ecológico de Doenças de Plantas**. Florianópolis, CCA/UFSC, p. 143-157, 2004.
- BOAVA, L.P.; KUHN, O.J.; PASCHOLATI, S.F.; DI PIERO, R.M.; FURTADO, E.L. Atividade de quitinases e peroxidases em folhas de eucalipto em diferentes estágios de desenvolvimento após tratamento com acibenzolar-S-metil (ASM) e inoculação com *Puccinia psidii*. **Tropical Plant Pathology**, Viçosa, v. 35, n. 2, p. 124-128, 2010. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/tpp/v35n2/v35n2a09.pdf>>. Acesso em 19 dez. 2014.
- BONETI, J. I. S.; FERRAZ, S. Modificação do método de Hussey e Barker para a extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de cafeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 6, n. 3, p. 553, 1981. Suplemento.

BOONLERTNIRUN, S.; BOONRAUNG, C.; SUVANASARA, R. Application of chitosan in rice production. **Journal of Metals Materials and Minerals**, Pensilvânia, v. 18, p. 47-52, 2008.  
Disponível em: <<http://www.material.chula.ac.th/Journal/v18-2/47-52%20BOONLERTNIRUN.pdf>>. Acesso em: 06 jan. 2015.

CALLEGARI-JACQUES, S.M. **Bioestatística:** princípios e aplicações. Porto Alegre: ARTMED, 2003.

CAMPOS, A.D.; FERREIRA, A.G.; HAMPE, M.M.V.; ANTUNES, I.F.; BRANCÃO, N.; SILVEIRA, E.P.; OSÓRIO, V.; AUGUSTIN, E. Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão à antracnose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n.7, 2004.  
Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-204X2004000700004&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-204X2004000700004&script=sci_arttext)>. Acesso em: 11 jan. 2015.

CASTRO, L.; FLORES, L. Uribe, L. Efecto del vermicompost y quitina sobre el control de *Meloidogyne incognita* en tomate a nível de invernadero. **Agronomía Costarricense**, San Pedro de Montes de Oca, v. 35, n. 2, p. 21-32, 2011. Disponível em:  
<[http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S0377-94242011000200002&script=sci\\_arttext&tlang=pt](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S0377-94242011000200002&script=sci_arttext&tlang=pt)>. Acesso em: 27 out. 2014.

CHENG, C.Y.; LI, Y.K. An *Aspergillus* chitinase with potential for largescale preparation of chitosan oligosaccharides, Biotechnol. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, Totowa, 32, 197-203, 2000. Disponível em:  
<<http://www.ljemail.org/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1049363>>. Acesso em: 29 dez. 2014.

DE-JIN, R.; SUH, J.; PARK, R.; KIM, Y. Effect of chitin compost and broth on biological control of *Meloidogyne incognita* on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). **Nematology**, Hertfordshire, v. 7, n. 1, p. 125-132, 2005. Disponível em:  
<<http://booksandjournals.brillonline.com/content/journals/10.1163/1568541054192171?crawler=true>>. Acesso em: 09 jan. 2015.

DI-PIERO, R.M.; GARDA, M.V. Quitosana reduz a severidade da antracnose e aumenta a atividade de glucanase em feijoeiro-comum. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n.9, 2008. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-204X2008000900004&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-204X2008000900004&script=sci_arttext)>. Acesso em: 11 jan. 2015.

EL-MINIAWY, S.M.; RAGAB, M.E.; YOUSSEF, S.M.; METWALLY, A.A. Response of strawberry plants to foliar spraying of chitosan. **Research Journal of Agriculture and Biological Sciences**, Islamabad, v. 9, n. 6, p. 366-372, 2013. Disponível em:  
<<http://www.aensiweb.com/old/rjabs/rjabs/2013/366-372.pdf>>. Acesso em: 29 dez. 2014.

FERREIRA, D.F. **SISVAR - Sistema de análise de variância**. Versão 5.10. Lavras-MG: UFLA, 2010.

FRANCO, L.O.; STAMFORD, T.C.M.; STAMFORD, N.P.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. *Cunninghamella elegans* (IFM 46109) como fonte de quitina e quitosana. **Revista Analytica**, São Paulo, n. 14, p. 40-44, 2005. Disponível em: <[http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:NAv7beE5o3gJ:www.revistaanalytica.com.br/ed\\_anteriores/14/cunningamella.pdf+&cd=1&hl=pt-BR&ct=clnk&gl=br](http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:NAv7beE5o3gJ:www.revistaanalytica.com.br/ed_anteriores/14/cunningamella.pdf+&cd=1&hl=pt-BR&ct=clnk&gl=br)>. Acesso em: 06 nov. 2014.

FU, Z.Q.; DONG, X. Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. **Annual Review of Plant Biology**, Los Angeles, v. 64, p. 839-863, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23373699>>. Acesso em: 15 nov. 2014.

HALLMANN, J.; RODRIGUEZ-KABANA, R.; KLOEPFER, J.W. Chitin-mediated changes in bacterial communities of the soil, rhizosphere and within roots of cotton in relation to nematode control. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 31, n. 4, p. 551-560, 1999. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0038071798001461>>. Acesso em 05 jan. 2015.

HUANG, J.W.; HUANG, H.C. A formulated container medium suppressive to *Rhizoctonia* damping-off of cabbage. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, Taipé, v. 41, p. 49-56. 2000. Disponível em: <[http://tao.wordpedia.com/show\\_pdf.ashx?sess=5cnhc55h20rtzqnlg3t1tf0&file\\_name=JO00001095\\_41-1\\_49-56&file\\_type=r](http://tao.wordpedia.com/show_pdf.ashx?sess=5cnhc55h20rtzqnlg3t1tf0&file_name=JO00001095_41-1_49-56&file_type=r)>. Acesso em: 04 jan. 2015.

IBM CORP. **SPSS, Statistics for Windows, Version 20.0**. Armonk, New York. 2011.

INÁCIO, S.V. **Respostas da cultura do tomateiro a diferentes frequências de aplicação de Acibenzolar-S-Metil e quitosana**. 2011. 49f. Monografia (Graduação em Agronomia) - Universidade Federal De Santa Catarina, Florianópolis, 2011. Disponível em: <<https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/121401/294736.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 16 dez. 2014.

JENKINS, W. R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Reporter**, Saint Paul, v. 48, p. 692, 1964. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_nlinks&ref=000049&pid=S0103-9016199600020000500004&lng=e](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000049&pid=S0103-9016199600020000500004&lng=e)>. Acesso em: 19 dez. 2014.

LIU, H.; DU, Y.; YANG, J.; ZHU, H. Structural characterization and antimicrobial activity of chitosan/betaine derivative complex. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 55, n. 3, p. 291-297, 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861703002959>>. Acesso em 05 jan. 2015.

LOPES, E.A.; FERRAZ, S.; FREITAS, L.G.; FERRRRIA, P.A.; AMORA, D.X. Efeito dos extratos aquosos de mucuna preta e de manjericão sobre *Meloidogyne incognita* e *M. javanica*. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 29, n. 1, p. 67-74, 2005. Disponível em: <<http://docentes.esalq.usp.br/sbn/nbonline/ol%20291/67-74%20pb.pdf>>. Acesso em: 28 dez. 2014.

MANJULA, K.; PODILE, A.R. Chitin-supplemented formulations improve biocontrol and plant growth promoting efficiency of *Bacillus subtilis* AF 1. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 47, n. 7, p. 618-625, 2001. Disponível em: <<http://www.nrcresearchpress.com/doi/pdfplus/10.1139/w01-057>>. Acesso em 09 jan. 2015.

OHTA, K.; ATARASHI, H.; SHIMATANI, Y.; MATSUMOTO, S.; ASAOKA, T.; HOSOKI, T. Effect of chitosan with or without nitrogen treatments on seedling growth in *Eustoma grandiflorum*. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, Tokyo, v. 69, n. 1, p. 63-65, 2000. Disponível em: <[https://www.jstage.jst.go.jp/article/jjshs1925/69/1/69\\_1\\_63/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jjshs1925/69/1/69_1_63/_pdf)>. Acesso em: 10 jan. 2015.

OKA, Y. Mechanisms of nematode suppression by organic soil amendments – a review. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 44, n. 2, p. 101–115, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0929139309001942>>. Acesso em 10 jan. 2015.

PUNJA, Z.K.; ZHANG, Y. Plant chitinases and their roles in resistance to fungal diseases. **Journal of Nematology**, Lakeland, v. 25, n. 4, p. 526-540, 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2619419/>>. Acesso em: 29 dez. 2014.

SARATHCHANDRA , S.U.; WATSON, R.N.; COX, N.R.; DI-MENNA, M.E.; BROWN, J.A.; BURCH, G.; NEVILLE, F.J. Effects of chitin amendment of soil on microorganisms, nematodes, and growth of white clover (*Trifolium repens* L.) and perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). **Biology and Fertility of Soils**, Berlim, v. 22, n. 3, p. 221-226, 1996. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/BF00382516>>. Acesso em: 28 dez. 2014.

SIGMA ALDRICH. **Chitinase Assay Kit**. 2014. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Bulletin/cs0980bul.pdf>>. Acesso em 01 dez. 2014.

SOBRINHO, A.C. **Patossistema caupi x Macrophomina phaseolina: método de detecção em sementes, esporulação e controle do patógeno**. 2004. 139f. Tese (Doutorado em Fitopatologia)– Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 139p., Piracicaba, 2004. Disponível em: <[www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11135/tde.../candido.pdf](http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11135/tde.../candido.pdf)>. Acesso em 11 jan. 2015.

SPIEGEL, Y.; CHET, I.; CONH, E. Use of chitin for controlling plant-parasitic nematodes. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 87, n. 3, p. 337-345, 1987. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2FBF02378355>>. Acesso em 11 jan. 2015.

TIRYAKI, I.; TUNAZ, H. Systemic acquired resistance: characterization of genes associated with plant defense response. **Journal of Cell and Molecular Biology**, Halic, v. 3, p. 9-14, 2004. Disponível em: <<http://jcmb.halic.edu.tr/pdf/3-1/Systemic.pdf>>. Acesso em: 03 nov. 2014.

VAN-LOON, L.C. Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. **European Journal Plant Pathology**, Dordrecht, v. 119, p. 243-254, 2007. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10658-007-9165-1#page-1>>. Acesso em: 03 nov. 2014.

VAN-LOON, L.C.; PIERPOINT, W.S.; BOLLER, T.H.; CONEJERO, V. Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. **Plant Molecular Biology Reporter**, Tucson, v. 12, n. 3, p. 245-264, 1994. Disponível em:  
<<http://link.springer.com/article/10.1007%2FBF02668748#page-1>>. Acesso em: 03 nov. 2014.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Os nematoides das galhas *Meloidogyne javanica* e *M. incognita* são um dos problemas fitossanitários mais agressivos da cultura do tomateiro, que ocasionam perdas significativas na cultura. Um dos principais entraves está relacionado com o controle dessa doença, pois sua erradicação é praticamente impossível. Manejos sustentáveis que não agride o solo e que apresentem resultados eficientes estão sendo cada vez mais utilizados. Dentre essas opções está o controle biológico e a indução de resistência na planta, temas desta dissertação de mestrado.

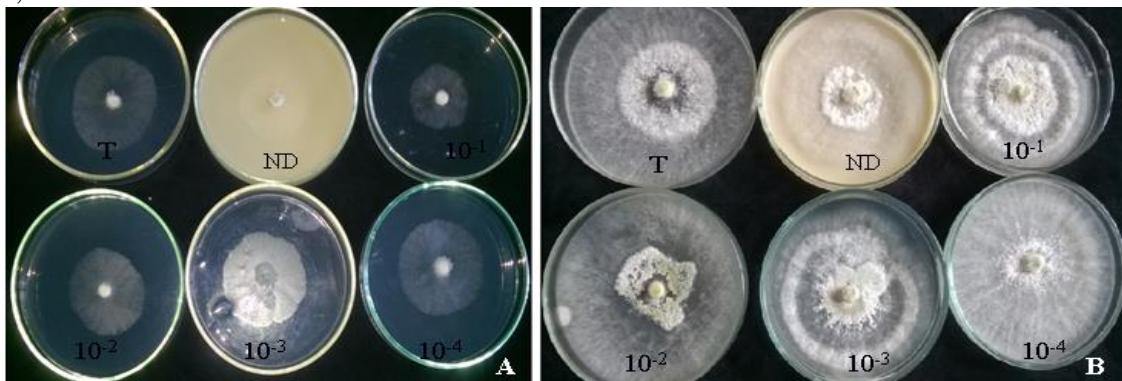
As informações geradas neste trabalho são extremamente úteis no cenário agrícola, por verificar a eficiência de produtos que estão disponíveis no mercado para controle de nematosses. Os resultados evidenciaram que, em condições de casa de vegetação, o produto LMXBIO não apresentou diminuição estatisticamente significativa de *M. incognita* e *M. javanica* em tomateiro. Porém, esse resultado não deve restringir seu uso para essa finalidade, visto que para ambos os nematoides a redução da população foi acima de 65% com utilização do produto. Além disso, foi ressaltada nos resultados a eficiência dos micro-organismos de sua composição (*B. subtilis*, *B. thuringiensis*, *Rhizobium* sp., *S. cerevisiae* e *Trichoderma* spp.), de forma isolada para cada nematoide, cujos resultados foram relevantes.

Em condições de casa de vegetação, os produtos HYT-C (quitina) e HYT-D (quitosana) também foram testados. Aplicação de quitina no solo e sua combinação com quitosana foliar reduziu a população de *M. javanica*. Apesar dos produtos não reduzirem de forma estatisticamente significativa *M. incognita*, ainda assim, devem ser considerados, pois a população do nematoide foi reduzida acima de 50% com utilização dos produtos. Os resultados obtidos sobre a influência da aplicação desses produtos na indução de resistência na planta e na população de micro-organismos quitinolíticos no solo é de extrema relevância, pois define de maneira precisa o mecanismo de ação envolvido no controle de doenças. Um fato interessante a ser destacado, visto as diferenças nos resultados encontrados para os dois nematoides, é a possibilidade de ocorrência simultânea de *M. incognita* e *M. javanica* no campo, o que justifica a utilização dos produtos testados.

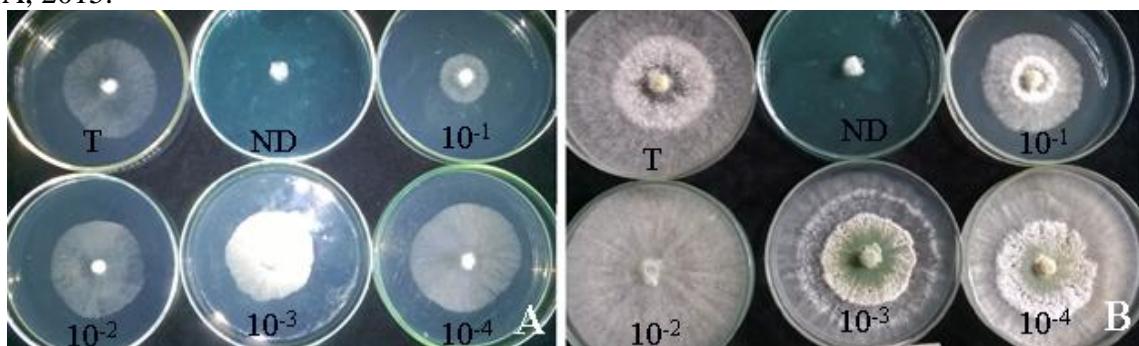
Não existe resposta definitiva para o manejo de fitonematoides, contudo, pesquisas com práticas fitossanitárias que não considerem o controle químico como única forma de controle, são de extrema importância para se estabelecer o manejo adequado. Ainda há muito a ser pesquisado, mas o manejo biológico de fitonematoides e outras formas de controle como a indução de resistência já são uma realidade que está presente no dia a dia do agricultor.

## APÊNDICE

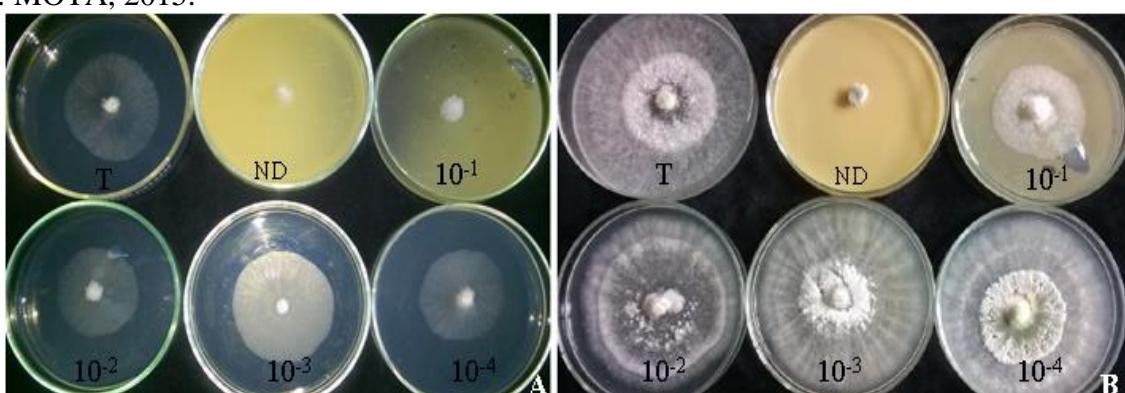
**FIGURA 11.** Crescimento de *Trichoderma* spp. em meio de cultura BDA com e sem agroquímico Imidaclorprido em diferentes concentrações. A- após 48 horas de incubação. B- após 96 horas de incubação. T- Testemunha- sem adição de produto ao meio. ND- produto não diluído. Fonte: MOTA, 2015.



**FIGURA 12.** Crescimento de *Trichoderma* spp. em meio de cultura BDA com e sem agroquímico Casugamicina em diferentes concentrações. A- após 48 horas de incubação. B- após 96 horas de incubação. T- Testemunha- sem adição de produto ao meio. ND- produto não diluído. Fonte: MOTA, 2015.



**FIGURA 13.** Crescimento de *Trichoderma* spp. em meio de cultura BDA com e sem agroquímico Benalaxil + Mancozeb em diferentes concentrações. A- após 48 horas de incubação. B- após 96 horas de incubação. T- Testemunha- sem adição de produto ao meio. ND- produto não diluído. Fonte: MOTA, 2015.



**FIGURA 14.** Crescimento de *Trichoderma* spp. em meio de cultura BDA com e sem agroquímico Metribuzim em diferentes concentrações. A- após 48 horas de incubação. B- após 96 horas de incubação. T- Testemunha- sem adição de produto ao meio. ND- produto não diluído. Fonte: MOTA, 2015.

