



Seleção de bactérias para controle biológico de *Meloidogyne incognita* em figueira

Wille, Caroline Neugebauer^{1,4}; Cesar Bauer Gomes²; Monalize Mota³

¹IFSul Campus Camaquã, Camaquã, RS, Brasil; ²Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, Brasil; ³UFPEL, Capão do Leão, Brasil; ⁴wille_carol@yahoo.com.br

Wille, Caroline Neugebauer; Cesar Bauer Gomes; Monalize Mota (2019) Seleção de bactérias para controle biológico de *Meloidogyne incognita* em figueira. Rev. Fac. Agron. Vol 118 (1): 45-54.

A inserção do controle biológico no manejo integrado de *M. incognita* constitui-se como uma estratégia importante para a cultura da figueira no Brasil, visto que não estão disponíveis nematicidas e porta-enxertos resistentes no país. Entre os biocontroladores, rizobactérias apresentam potencial, pois podem atuar promovendo o crescimento vegetal e ou inibindo os nematoides. Assim, o objetivo desse trabalho foi isolar bactérias com potencial para o biocontrole de *M. incognita* a partir de raízes de figueira e rochas de folhelhos betuminosos e selecionar isolados mais promissores através de ensaios *in vitro*. 124 isolados foram obtidos de folhelhos betuminosos e de raízes de figueira e avaliados em ensaios *in vitro* quanto ao efeito sobre ovos e juvenis de segundo estágio de *M. incognita* e produção de compostos relacionados ao controle biológico de nematoides. A partir dos resultados obtidos, 14 bactérias foram consideradas mais promissoras, produzindo pelo menos um composto relacionado ao biocontrole de fitonematoides, entre os cinco compostos testados, e altos níveis de mortalidade (78-100%) ou inibição da eclosão (73-100%) dos juvenis de segundo estágio do nematóide. A redução no número de isolados obtida no presente estudo é importante para viabilizar estudos *in vivo* confirmando o potencial destas rizobactérias para controle de *M. incognita* em figueira.

Palavras-chave: Figueira, *Meloidogyne incognita*, nematóide das galhas, rizobactérias, controle biológico.

Wille, Caroline Neugebauer; Cesar Bauer Gomes; Monalize Mota (2019) Selection of bacteria for biological control of *Meloidogyne incognita* in fig. Rev. Fac. Agron. Vol 118 (1): 45-54.

The inclusion of biological control in the integrated management of *M. incognita* was established as an important strategy for the fig tree of culture in Brazil, as they are not available nematicides and rootstocks resistant in the country. Among the biocontrol, rhizobacteria have potential because they can act to promote plant growth and inhibiting or nematodes. The objective of this work was to isolate bacteria with potential for biocontrol of *M. incognita* from fig roots and bituminous shale rocks and select the most promising isolated by *in vitro* assays. 124 isolates were obtained from bituminous shale and fig tree roots and evaluated *in vitro* tests on the effect on eggs and juveniles of second stage of *M. incognita* and production of compounds related to the biological control of nematodes. From the results obtained, 14 bacteria were considered more promising, producing at least one compound related to the biocontrol plant parasitic nematode, of the five tested compounds and high levels of mortality (78-100%) or inhibition of hatching (73-100%) of second stage juveniles of the nematode. The reduction in the number of isolates obtained in this study is important to enable *in vivo* studies confirming the potential of these rhizobacteria to control *M. incognita* in fig.

Keywords: Figueira, *Meloidogyne incognita*, root-knot nematodes, rhizobacteria, biological control.

Recibido: 04/09/2015

Aceptado: 01/10/2018

Disponibile on line: 01/07/2019

ISSN 0041-8676 - ISSN (on line) 1669-9513, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP, Argentina

INTRODUÇÃO

A ficicultura é uma atividade economicamente importante no Brasil (Leonel, 2008; ALICEWEB, 2013), principalmente no contexto da agricultura familiar, porém, a cultivar roxo de Valinhos, mais empregada no país, é extremamente sensível ao nematoide das galhas (Lima-Medina *et al.*, 2006). Além disso, técnicas de controle como a utilização de portas-enxerto resistentes (Bueno *et al.*, 2006) e agrotóxicos (AGROFIT, 2015) não estão disponíveis para a cultura. Considerando as dificuldades encontradas para o controle do nematoide das galhas na figueira, nas condições brasileiras, o manejo integrado desta praga através do uso de agentes de controle biológico deve ser considerado como estratégico para o referido patossistema.

Dentre os agentes de controle biológico, as rizobactérias estão entre os organismos antagonistas mais propícios no controle de fitonematoides (Sikora, 1988). Essas bactérias também são descritas como Rizobactérias Promotoras do Crescimento de planta ou PGPR – *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*, pois além de sua importância como biocontroladores de doenças, quando atuam no controle biológico de organismos fitopatogênicos, (Schroth & Hancock 1982), podem atuar como: biofertilizadoras, quando aumentam a disponibilidade de nutrientes para as plantas; fitoestimuladoras, quando estimulam o crescimento da planta; e rizorremediadoras, quando degradam poluentes orgânicos (Somers *et al.*, 2004).

As rizobactérias atuam no controle biológico de diversas formas, podem parasitar e/ou produzir metabólitos que interferem na reprodução, postura e eclosão de ovos, na sobrevivência dos estádios iniciais de desenvolvimento dos nematoides e/ou mortalidade de indivíduos adultos (Zuckerman & Jasson, 1984, Siddiqui & Mahmood, 1999). Esses mecanismos estão relacionados à produção de enzimas como lipases (Santin, 2008) proteases (Dunne *et al.*, 2013) e quitinases (Zhang & Yuen, 2000), as quais podem estar envolvidas na degradação dos ovos, e/ou produção de compostos tóxicos (Oka *et al.*, 1993; Arduim, 2006) que atuam como nematicidas ou nematostáticos.

Em virtude dessas características, a maioria dos trabalhos envolvendo seleção de bactérias para controle biológico, utiliza micro-organismos oriundos do solo e rizosfera (Freitas *et al.*, 2005; Fabry *et al.*, 2007; Alves *et al.*, 2011), existindo poucos relatos quanto à utilização de isolados oriundos de outros habitats (Ashoub & Amara, 2010).

Contudo, ambientes como as rochas compreendem formas de vida com potencial que apresentam diversas características desejáveis como resistência à condições adversas, que fazem desses micro-organismos, especialistas em sobrevivência (Hirsch *et al.*, 2004). As bactérias encontradas nesses ambientes possuem também, um papel importante na deterioração de rochas e disponibilização de nutrientes essenciais para as plantas (Gorbushina, 2007).

Além disso, o efeito nematicida não é restrito às bactérias isoladas de raízes. Ashoub e Amara (2010) observaram que bactérias isoladas de outros ambientes como solos poluídos com hidrocarbonetos e água do

mar vermelho, também podem apresentar efeito tóxico aos nematoides.

MATERIAL E MÉTODOS

Origem dos isolados bacterianos

Os micro-organismos testados quanto ao potencial para controle do nematoide das galhas, em figueira, foram isolados da rizosfera e rizoplano de figueira e de rochas de folhelhos pirobetuminosos. As bactérias fazem parte da coleção de micro-organismos do laboratório de Fitopatologia da Embrapa Clima Temperado.

Isolados da rizosfera e rizoplano de figueira foram isolados de raízes de plantas saudáveis coletadas na Estação Experimental Cascata da Embrapa Clima Temperado, Pelotas/RS.

Amostras de 10 gramas de solo rizosférico, considerado o solo associado às raízes, foram cuidadosamente coletadas, sob condições assépticas, nas raízes de figueira. As amostras de solo rizosférico foram misturadas a 90mL de solução salina (NaCl 0,85%) estéril e agitadas em liquidificador na velocidade máxima durante um minuto.

Para obtenção de isolados do rizoplano, segmentos de 1g de raiz de figueira, submetidos a lavagem contínua com água corrente, durante um minuto, foram transferidos para tubos de ensaio com 9mL de solução salina e submetidos a ultra-sonificação por 30 segundos a 10.5mm.

As suspensões da rizosfera e rizoplano foram então diluídas, em solução salina e alíquotas de 100µl das suspensões, nas diluições 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} , foram semeadas em triplicatas, por espalhamento em placas de Petri contendo meio 523 de Kado; Heskett (1970) e incubadas em estufa bacteriológica à 25°C por 72 horas. Após a incubação, as colônias de bactérias com características morfológicas distintas foram repicadas individualmente, por esgotamento, para obtenção de culturas puras, e identificadas com um código numérico.

As bactérias de rochas de folhelhos pirobetuminosos foram obtidas a partir de quinze amostras de rochas coletadas no Município de São Mateus do Sul (PR). Cada amostra foi triturada e peneirada individualmente. A seguir, 10 g de cada amostra foi suspensa em 90mL de solução salina estéril e agitada por 30 minutos a 10°C. As suspensões obtidas foram diluídas em solução salina e alíquotas de 100µL das suspensões, nas diluições 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} , foram semeadas em triplicatas, por espalhamento em placas de Petri contendo meio 523 de Kado; Heskett (1970) e incubadas a 28°C por 48horas.

Preparo de suspensões bacterianas

Para obtenção de suspensões bacterianas, utilizadas nos ensaios de mortalidade e inibição de eclosão, os isolados em culturas puras, foram repicados para meio 523 de Kado; Heskett (1970) e incubados a 25°C por 24 a 48 h. Para actinomicetos, os mesmos foram cultivados em meio Amido Caseína Agar - ACA durante 96 h. As células bacterianas crescidas no meio de cultura foram raspadas com alças de Drigalski estéreis e transferidas para solução salina estéril. As suspensões obtidas foram padronizadas (OD=0,5) em

espectrofotômetro a partir da leitura da absorbância no comprimento de onda de 540 nm.

Origem e manutenção de inóculo de *M. incognita*

O inóculo de *M. incognita* foi obtido de um pomar de figueiras infestado no município de Pelotas-RS, multiplicado em mudas de tomate, (*Solanum lycopersicon* L.) cv. Santa Cruz, e submetido à eletroforese (Carneiro & Almeida, 2001) para confirmação da pureza da população pelo perfil de esterase. Após confirmação dos resultados, as massas de ovos correspondentes foram transferidas para vasos contendo solo autoclavado e uma muda de tomateiro cv. Santa Cruz.

Para realização do ensaio de inibição da eclosão, massas de ovos presentes nas raízes de tomateiro infectadas foram retiradas com um estilete e colocadas em tubo com 5mL de água. A seguir, as massas de ovos foram transferidas para um erlenmeyer contendo solução de NaClO a 0,5% sendo esta agitada manualmente durante e vertida em peneira de 500 Mesh, onde os ovos retidos foram lavados diversas vezes com água destilada e recolhidos em placa de Petri com aproximadamente 10mL de água destilada (Hussey & Barker, 1973).

Os juvenis de segundo estágio (J2) de *M. incognita*, utilizados no ensaio de mortalidade, foram obtidos de raízes de tomateiro infectadas com o nematoide, trituradas em liquidificador com solução de hipoclorito 0,1% e vertidas em peneira de 100 meshes acoplada à peneira de 500 Mesh. A seguir, o conteúdo retido na peneira de 500 Mesh foi lavado diversas vezes com água destilada e transferido para funil de Baermann modificado (Christie & Perry, 1951). Após 24h de incubação, no escuro a 25°C, os J2 foram recolhidos do funil em uma placa de Petri.

Avaliação dos isolados bacterianos quanto à produção *in vitro* de compostos relacionados ao biocontrole de nematoides

A produção de diferentes compostos relacionadas ao biocontrole de fitonematoides foi avaliada *in vitro* através de técnicas qualitativas.

Avaliou-se a produção de quitinases de acordo com a técnica descrita por Cattelan (1999). Os isolados foram repicados para meio de cultura contendo quitina como fonte exclusiva de carbono, e incubados a 25°C por quinze dias, após este período, a degradação da quitina foi constatada pela presença de um halo claro ao redor das colônias.

Para determinar a produção de lipases, os isolados foram repicados para meio de cultura de Tween 80 a 1% e pH 7,4 (Fahy & Persley, 1983) e incubados a 25°C por cinco dias. Após esse período, a produção de lipases foi observada pela formação de precipitados ao redor das colônias.

A produção de proteases foi avaliada através de duas metodologias. Na primeira, os isolados foram repicados para tubos de ensaio contendo 5mL de meio de cultura leite de Litmus, a seguir foram incubados a 25°C por cinco dias, e após o período de incubação, a produção de proteases foi verificada pela peptonização da caseína a qual foi observada, presente, pela redução da turvação do meio de cultura (Schaad *et al.*, 2001).

Como testemunha foi utilizado um tubo contendo o meio estéril não inoculado.

Na segunda metodologia, os isolados foram repicados para tubos contendo meio de cultura de gelatina 12%, e, a seguir, foram incubados a 25°C por cinco dias e colocados em geladeira durante 2 horas. A produção de proteases de cada isolado foi avaliada pela capacidade de hidrolisar a gelatina que observada quando o meio de cultura permanecia liquefeito à 4°C (Mariano & Silveira, 2005). Como testemunha, foi utilizado um tubo contendo o meio estéril não inoculado.

Para verificar a capacidade de produzir amônia, os isolados foram repicados para tubos de ensaios contendo 10mL de meio de cultura caldo de peptona e incubados a 25°C por cinco dias. Após o período de incubação, foi acrescentado em cada tubo, 1mL de reagente de Nessler. A produção de amônia foi verificada observando-se a formação de um precipitado alaranjado característico (Mariano & Silveira, 2005). Como testemunha foi utilizado um tubo de caldo de peptona estéril não inoculado.

Avaliação dos isolados quanto ao efeito nematicida *in vitro* sobre juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita*

O ensaio foi conduzido em placas de microtitulação de 96 poços, utilizando-se cinco repetições para cada tratamento. Cada orifício da placa foi considerado uma repetição, onde foram adicionados 50µL da suspensão bacteriana e 50µL de uma suspensão de 50 juvenis de segundo estágio (J2) de *M. incognita*. As testemunhas foram compostas de J2 imersos apenas em solução salina.

A seguir, as placas foram vedadas com filme plástico e papel alumínio e mantidas em BOD a 25°C na ausência de luz. O experimento foi realizado em duplicata, sendo a percentagem de juvenis mortos avaliada após 24 e 48 horas pela adição de 10µL de NaOH (1N) em cada cavidade, onde foram considerados como mortos, os J2 que permaneceram com o corpo completamente distendido durante três minutos após a adição de NaOH (Chen & Dickson, 2000). Posteriormente, os valores de percentagem de J2 de *M. incognita* mortos, em 24 e 48h foram submetidos à análise de variância e teste de agrupamento de Scott & Knott (1974) a 5% pelo programa SASM Agri (Canteri *et al.*, 2001); e, o efeito do período de incubação, foi comparado pelo teste t ($p \leq 0,05$).

Avaliação dos isolados quanto à capacidade de inibir *in vitro* a eclosão de *Meloidogyne incognita*

O ensaio foi conduzido em placas de microtitulação de 96 poços, foram utilizadas utilizando-se cinco repetições para cada tratamento. Cada orifício da placa foi considerado uma repetição no qual foram adicionados 50µL da suspensão bacteriana e 50µL de uma suspensão de 50 ovos imaturos de *M. incognita*. As testemunhas foram compostas de ovos imersos apenas em solução salina.

Logo após, as placas foram vedadas com filme plástico e papel alumínio e mantidas em BOD a 25°C na ausência de luz. A percentagem de J2 eclodidos foi avaliada após 15 dias de incubação. Posteriormente, os valores de percentagem de J2 de *M. incognita*

eclodidos foram transformados em arco seno $\sqrt{x/100}$ e, a seguir, submetidos à análise de variância e teste de agrupamento de Scott & Knott (1974) a 5% pelo programa SASM Agri (Canteri et al., 2001).

Identificação dos isolados através de sequenciamento de DNA

Para extração de DNA, os isolados selecionados para controle biológico de *M. incognita* foram cultivados em frascos com 50mL de caldo nutriente, a 25°C durante 48h. Após a incubação, o DNA das bactérias foi extraído utilizando o Kit de extração Wizard® genomic (PROMEGA). A amplificação da região 16S do gene rRNA, por reação em cadeia de polimerase (PCR), foi realizada em termociclador “Eppendorf Mastercycler”, utilizando-se os nucleotídeos iniciadores universais correspondentes às posições 27f (5'-AGAGTTTGATCTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-TACGGTACCTTGTTACGACTT-3') de *Escherichia coli*. Para reação de PCR, foram utilizados 6,25µL de GoTaq® Green Master Mix (PROMEGA) 1,25µL do primer 27f (10µM), 1,25 µL do primer 1492r (10µM), 1µL de DNA genômico e 2,75 µL de água livre de nuclease. A reação de amplificação foi conduzida em 35 ciclos de PCR (desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos; desnaturação subsequente de 95°C por 5 minutos; temperatura de anelamento de 56°C por 1 minuto; temperatura de extensão de 72°C por 1 minuto e extensão final de 72°C por 10 minutos). Os produtos obtidos no PCR foram analisados em gel de agarose 2% e purificados utilizando o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (PROMEGA). O produto purificado foi quantificado em eletroforese em gel de agarose 1% utilizando-se o marcador Low DNA Mass Ladder (INVITROGEN).

O sequenciamento das amostras foi realizado utilizando o sequenciador automático ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer. Os DNA-moldes foram marcados utilizando-se 2,5 pmol do primer 27f e 3 µL do reagente BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100 (Applied Biosystems) em um volume final de 10 µL. As reações de marcação foram realizadas em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) com uma etapa de desnaturação inicial a 96 °C por 3 minutos seguida de 25 ciclos de 96 °C por 10 segundos, 55 °C por 5 segundos e 60 °C por 4 minutos. Uma vez marcadas, as amostras foram purificadas pela precipitação com isopropanol a 75% e lavagem com etanol a 60%. Os produtos precipitados foram diluídos em 10 µL de formamida Hi-Fi (Applied Biosystems), desnaturados a 95 °C por 5 minutos, resfriados em gelo por 5 minutos e eletroinjetados no sequenciador automático. Os dados de sequenciamento foram coletados utilizando-se o programa Data Collection v 1.0.1 (Applied Biosystems).

A homologia das sequências bacterianas foi obtida através do programa BLAST.

RESULTADOS

Desenvolvimento do micélio fúngico sobre diferentes meios de cultura

Foram obtidos 33 isolados do rizoplaneo e 45 isolados da rizosfera, a partir das amostras de raízes de figueira. Além disso, também foram recuperados 46 isolados de bactérias promotoras de crescimento, de rochas de folhelhos pirobetuminosos (Tabela 1).

Dos isolados obtidos (Tabela 1), sete isolados foram considerados promissores, quanto à produção de substâncias relacionadas ao biocontrole de fitonematóides, pois foram capazes de produzir quatro dos cinco compostos avaliados (Tabela 2): lípases; proteases em caseína e gelatina; e amônia. Nenhum dos isolados foi capaz de produzir todos os cinco compostos testados e apenas o isolado F83 foi capaz de degradar a quitina (Tabela 2). Apenas 15% dos isolados de figueira e 26% dos isolados de rochas não produziram nenhum tipo de composto relacionado ao biocontrole de fitonematóides.

Em relação à atividade nematicida dos isolados sobre os J2 de *M. incognita*, somente 18, (14%), demonstraram algum efeito após 24 h de incubação, sendo que, 10 desses isolados, apresentaram índices de mortalidades de J2, superiores a 70%, sendo considerados potenciais biocontroladores, com destaque para o isolado F76 que atingiu 100% de mortalidade em 24 horas, e os isolados FB39, F64, F78, F75, FB34 percentagens de mortalidades superiores a 95% (Tabela 2).

Após 48 horas de incubação, a maioria dos isolados bacterianos, manteve o mesmo índice de mortalidade do nematóide ($P>0,05$) observado em 24 h de incubação. No entanto, alguns isolados apresentaram um aumento significativo na mortalidade dos J2 de *M. incognita* após 48 h de incubação (Tabela 2).

Quanto ao efeito das bactérias sobre os ovos de *M. incognita*, 28 isolados (22% das bactérias testadas) reduziram em 50% ou mais a eclosão em relação à testemunha, sendo cinco desses (F08, F25, F75, FB68 e FB59) reduzindo a eclosão de J2 em mais de 70%, em relação à testemunha. Contudo, alguns isolados apresentaram efeito benéfico a *M. incognita*, incrementando em até 9% o percentual de J2 eclodidos (Tabela 2).

De acordo com os resultados encontrados (Tabela 2), 14 isolados foram considerados mais promissores para biocontrole de *M. incognita* em figueira, os isolados foram identificados por análise de homologia da região 16S rRNA, sendo cinco identificados a nível de gênero, sete identificados a nível de espécie e apenas dois não identificados através dessa técnica (Tabela 3).

DISCUSSÃO

No presente trabalho foram avaliados 124 isolados bacterianos, entre estes, observou-se atividade antagonica aos nematóides, seja pela produção de

compostos capazes de interferir no desenvolvimento dos nematóides seja pelo percentual de mortalidade de J2 ou inibição da eclosão de *M. incognita*, tanto em isolados oriundos da rizosfera e rizoplano de figueira como em isolados de folhelhos betuminosos.

A obtenção de numerosos isolados é importante para obtenção de agentes de controle biológico, visto que poucos isolados serão eficientes nos ensaios *in vivo*. Contudo, a avaliação de um número amplo de isolados diretamente através de testes *in vivo* é inviável,

principalmente se tratando de uma planta perene, devido a sua laboriosidade, assim testes *in vitro* são importantes para selecionar candidatos mais promissores (Barra et al., 2008), permitindo a redução de candidatos e seleção de organismos mais promissores para controle biológico de *M. incognita*. Nessa etapa várias características desejáveis como produção de enzimas relacionadas à degradação de ovos como quitinases, proteases e lípases são investigadas.

Tabela 1. Isolados bacterianos utilizados para os testes *in vitro* e suas respectivas origens.

| Isolados bacterianos | Origem |
|--|-------------------------------------|
| F01; F02; F03; F04; F05; F06; F07; F08; F09; F10; F11; F12; F13; F14; F15; F16; F17; F18; F19; F20; F21; F22; F23; F24; F25; F26; F27; F28; F29; F30; F31; F33; F34 | Rizoplano de figueira |
| F36; F37; F38; F39; F40; F41; F42; F43; F45; F46; F47; F49; F50; F52; F53; F56; F57; F58; F59; F60; F61; F62; F63; F64; F65; F66; F67; F68; F69; F70; F71; F72; F73; F74; F75; F76; F78; F79; F80; F81; F82; F83; F84; F85; F86 | Rizosfera de figueira |
| FB02; FB04; FB07; FB10; FB11; FB12; FB14; FB15; FB16; FB17; FB18; FB19; FB20; FB21; FB23; FB24; FB25; FB26; FB27; FB28; FB29; FB30; FB31; FB32; FB33; FB34; FB35; FB36; FB37; FB38; FB39; FB40; FB41; FB42; FB43; FB44; FB45; FB46; FB50; FB59; FB60; FB62; FB64; FB66; FB67; FB68 | Rochas de folhelhos pirobetuminosos |

Tabela 2. Potencial de bactérias isoladas de raízes de figueira e rochas de folhelhos pirobetuminosos para biocontrole de *M. incognita* baseado em testes de mortalidade, inibição da eclosão e capacidade de produzir compostos relacionados ao biocontrole.

| Trat. | Q | L | G | T | A | Nº comp. Prod. | Mort. 24h (%) | Mort. 48h (%) | Eclosão (%**) | Inibição eclosão (%) |
|--------|---|---|---|---|---|----------------|---------------|---------------------|---------------|----------------------|
| Salina | | | | | | | 0,00j* | 0,00m ¹ | 55,66f | 0,00 |
| F01 | - | - | - | + | - | 1 | 12,29h | 9,29j ¹ | 39,50d | 29,03 |
| F02 | - | + | + | - | + | 3 | 2,00j | 1,00m ¹ | 34,48c | 38,05 |
| F03 | - | + | - | - | + | 2 | 14,13h | 13,74i ¹ | 43,35d | 22,11 |
| F04 | - | - | - | + | - | 1 | 7,47i | 5,49m ¹ | 49,37e | 11,30 |
| F05 | - | + | + | - | + | 3 | 0,00j | 0,00m ¹ | 34,48c | 38,05 |
| F06 | - | + | + | - | + | 3 | 0,00j | 0,00m ¹ | 39,16c | 29,63 |
| F07 | - | - | - | - | + | 1 | 0,00j | 0,00m ¹ | 46,38e | 16,67 |
| F08 | - | + | + | + | + | 4 | 0,00j | 0,00m ¹ | 13,63a | 75,50 |
| F09 | - | + | + | - | + | 3 | 0,00j | 0,00m ¹ | 46,50e | 16,46 |
| F10 | - | + | + | - | - | 2 | 0,00j | 0,00m ¹ | 31,90c | 42,68 |
| F11 | - | + | + | - | + | 3 | 0,00j | 0,00m ¹ | 29,65c | 46,72 |
| F12 | - | - | - | + | + | 2 | 0,00j | 0,00m ¹ | 34,17c | 38,60 |
| F13 | - | + | + | + | + | 4 | 0,00j | 15,67i ² | 19,77b | 64,47 |
| F14 | - | - | - | - | - | 0 | 0,00j | 0,00m ¹ | 23,53b | 57,71 |
| F15 | - | + | + | - | + | 3 | 0,00j | 0,00m ¹ | 20,88b | 62,47 |
| F16 | - | + | + | - | + | 3 | 0,00j | 0,00m ¹ | 27,71c | 50,21 |
| F17 | - | + | - | - | + | 2 | 0,00j | 0,00m ¹ | 18,33b | 67,06 |
| F18 | - | - | - | - | - | 0 | 0,00j | 0,00m ¹ | 30,21c | 45,71 |
| F19 | - | + | + | + | + | 4 | 8,76i | 11,54j ¹ | 36,57c | 34,29 |
| F20 | - | + | + | - | + | 3 | 0,00j | 0,00m ¹ | 28,38c | 49,01 |
| F21 | - | - | + | - | + | 2 | 0,00j | 0,00m ¹ | 30,91c | 44,45 |
| F22 | - | - | - | + | - | 1 | 8,77i | 9,84j ¹ | 37,28c | 33,01 |
| F23 | - | - | - | + | + | 2 | 10,38i | 10,76j ¹ | 37,00c | 33,52 |
| F24 | - | - | - | - | - | 0 | 0,00j | 18,83h ² | 31,39c | 43,60 |
| F25 | - | + | + | + | + | 4 | 4,09j | 15,20i ² | 14,57a | 73,81 |
| F26 | - | - | - | - | - | 0 | 56,93e | 90,72c ² | 20,60b | 62,98 |
| F27 | - | + | + | + | - | 3 | 0,00j | 0,00m ¹ | 35,64c | 35,96 |

Tabela 2 (continuação). Potencial de bactérias isoladas de raízes de figueira e rochas de folhelhos pirobetuminosos para biocontrole de *M. incognita* baseado em testes de mortalidade, inibição da eclosão e capacidade de produzir compostos relacionados ao biocontrole.

| Trat. | Q | L | G | T | A | Nº comp. Prod. | Mort. 24h (%) | Mort. 48h (%) | Eclosão (%**) | Inibição eclosão (%) |
|-------|---|---|---|---|---|----------------|---------------|---------------------|---------------|----------------------|
| F28 | - | + | + | - | + | 3 | 0,00j | 0,00m ¹ | 47,97e | 13,81 |
| F29 | - | + | + | - | - | 3 | 0,00j | 0,00m ¹ | 55,50f | 0,29 |
| F30 | - | + | + | - | + | 3 | 0,00j | 0,00m ¹ | 17,88b | 67,86 |
| F31 | - | - | + | - | + | 2 | 0,00j | 0,00m ¹ | 45,20d | 18,78 |
| F33 | - | - | - | - | - | 0 | 0,00j | 0,00m ¹ | 43,58d | 21,69 |
| F34 | - | - | - | - | - | 0 | 0,00j | 10,39j ² | 25,57b | 54,06 |
| F36 | - | - | - | - | + | 1 | 0,00j | 0,00m ¹ | 37,79c | 32,10 |
| F37 | - | - | - | + | - | 1 | 0,00j | 0,00m ¹ | 42,07d | 24,41 |
| F38 | - | + | - | - | + | 2 | 0,00j | 0,00m ¹ | 37,83c | 32,03 |
| F39 | - | + | - | - | + | 2 | 0,00j | 0,00m ¹ | 22,20b | 60,11 |
| F40 | - | + | - | - | + | 2 | 0,00j | 0,00m ¹ | 47,94e | 13,86 |
| F41 | - | - | - | - | - | 0 | 2,00j | 12,51j ² | 40,00d | 28,14 |
| F42 | - | - | - | - | + | 1 | 56,75e | 72,02d ² | 32,06c | 42,40 |
| F43 | - | - | - | - | - | 0 | 0,00j | 0,00m ¹ | 40,90d | 26,51 |
| F45 | - | - | - | - | + | 1 | 0,00j | 0,00m ¹ | 30,58c | 45,04 |
| F46 | - | - | - | - | + | 1 | 0,00j | 0,00m ¹ | 48,82e | 12,29 |
| F47 | - | + | + | - | + | 3 | 59,6e | 66,93e ¹ | 44,99d | 19,16 |
| F49 | - | - | - | - | - | 0 | 0,00je | 0,00m ¹ | 36,21c | 34,94 |
| F50 | - | - | - | - | + | 1 | 0,00j | 0,00m ¹ | 30,20c | 45,73 |
| F52 | - | - | + | - | - | 1 | 0,00j | 0,00m ¹ | 60,50f | -8,70 |
| F56 | - | - | - | - | - | 0 | 0,00j | 0,00m ¹ | 19,11b | 65,67 |
| F57 | - | - | - | + | - | 1 | 0,00j | 0,00m ¹ | 32,04c | 42,42 |
| F58 | - | - | - | + | - | 1 | 0,00j | 0,00m ¹ | 33,89c | 39,11 |
| F59 | - | + | + | + | + | 4 | 0,00j | 0,00m ¹ | 24,41b | 56,13 |
| F60 | - | - | + | + | + | 3 | 0,00j | 0,00m ¹ | 33,87c | 39,13 |
| F61 | - | - | - | - | - | 0 | 0,00j | 0,00m ¹ | 33,53c | 39,75 |
| F63 | - | - | + | - | - | 1 | 0,00j | 0,00m ¹ | 48,14e | 13,51 |
| F64 | - | - | - | + | + | 2 | 98,92a | 98,87a ¹ | 29,50c | 47,00 |
| F65 | - | + | - | - | + | 2 | 0,00j | 0,00m ¹ | 24,63b | 55,73 |
| F66 | - | - | - | - | - | 0 | 0,00j | 0,00m ¹ | 46,24e | 16,91 |
| F67 | - | - | - | - | + | 1 | 0,00j | 0,00m ¹ | 55,86f | -0,37 |
| F68 | - | + | - | - | + | 2 | 0,00j | 0,00m ¹ | 47,61e | 14,45 |
| F69 | - | - | - | - | - | 0 | 0,00j | 0,00m ¹ | 42,83d | 23,05 |
| F70 | - | - | + | - | - | 1 | 0,00j | 0,00m ¹ | 28,38c | 49,01 |
| F71 | - | + | + | - | + | 3 | 78,07d | 86,82c ¹ | 38,71c | 30,45 |
| F72 | - | - | - | - | + | 1 | 0,00j | 0,00m ¹ | 33,42c | 39,94 |
| F73 | - | - | - | - | + | 1 | 0,00j | 0,00m ¹ | 60,77f | -9,19 |
| F74 | - | + | + | - | + | 3 | 0,00j | 0,00m ¹ | 47,65e | 14,38 |
| F75 | - | - | - | + | - | 1 | 96,58b | 99,0a ¹ | 7,55a | 86,53 |
| F76 | - | + | + | + | - | 3 | 100,00a | 100a ¹ | 23,35b | 58,04 |
| F77 | - | + | - | + | - | 2 | 0,00j | 0,00m ¹ | 19,69b | 64,62 |
| F78 | - | - | - | + | - | 1 | 97,33b | 99,99a ¹ | 0,00a | 100,00 |
| F79 | - | - | - | + | + | 2 | 0,00j | 0,00m ¹ | 25,59b | 54,01 |
| F80 | - | - | - | - | - | 0 | 0,00j | 0,00m ¹ | 47,14e | 15,30 |
| F81 | - | + | + | + | + | 4 | 0,00j | 0,00m ¹ | 38,28c | 31,22 |
| F82 | - | - | - | - | - | 0 | 0,00j | 0,00m ¹ | 49,07e | 11,84 |
| F83 | + | - | - | - | - | 1 | 0,00j | 0,00m ¹ | 49,46e | 11,14 |
| F84 | - | - | - | - | - | 0 | 0,00j | 0,00m ¹ | 54,94f | 1,28 |
| F85 | - | + | - | - | + | 2 | 0,00j | 0,00m ¹ | 40,21d | 27,75 |
| F86 | - | - | - | - | - | 0 | 0,00j | 0,00m ¹ | 26,14b | 53,02 |
| FB02 | - | + | - | + | + | 3 | 0,00j | 0,00m ¹ | 26,00b | 53,29 |
| FB04 | - | - | - | - | - | 0 | 0,00j | 0,00m ¹ | 31,32c | 43,73 |
| FB07 | - | - | - | + | - | 1 | 0,00j | 0,00m ¹ | 47,44e | 14,75 |
| FB10 | - | - | - | - | - | 0 | 0,00j | 0,00m ¹ | 41,28d | 25,83 |
| FB11 | - | + | - | - | - | 1 | 0,00j | 0,67m ¹ | 42,19d | 24,18 |
| FB12 | - | - | - | + | + | 2 | 0,00j | 0,00m ¹ | 46,05e | 17,26 |

Tabela 2 (continuação). Potencial de bactérias isoladas de raízes de figueira e rochas de folhelhos pirobetuminosos para biocontrole de *M. incognita* baseado em testes de mortalidade, inibição da eclosão e capacidade de produzir compostos relacionados ao biocontrole. Referências: Q- Produção de quitinases, PL-Produção de proteases em leite de litmus, PG- produção de proteases em gelatina, L- produção de lipases em Tween 80 e A- produção de amônia. *Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste Skott-Knott a 5 % de probabilidade; ** valores originais transformados em arc sen ; 1 e 2, não significativo e significativo, respectivamente, pelo teste de t (P≤0,05), comparando os períodos de incubação.

| Trat. | Q | PL | PG | L | A | Nº comp. Prod. | Mort. 24h (%) | Mort. 48h (%) | Eclosão (%**) | Inibição eclosão (%) |
|-------|---|----|----|---|---|----------------|---------------|---------------------|---------------|----------------------|
| FB14 | - | - | - | + | + | 2 | 1,53j | 2,61m ¹ | 34,81c | 37,44 |
| FB15 | - | - | - | + | + | 2 | 0,00j | 0,00m ¹ | 44,65d | 19,76 |
| FB16 | - | - | - | + | + | 2 | 0,00j | 0,00m ¹ | 37,47c | 32,67 |
| FB17 | - | - | - | - | + | 1 | 0,00j | 0,00m ¹ | 26,42b | 52,53 |
| FB18 | - | - | - | + | + | 2 | 0,00j | 0,00m ¹ | 49,55e | 11,07 |
| FB19 | - | - | - | - | + | 1 | 1,00j | 4,53m ¹ | 49,50e | 11,07 |
| FB21 | - | - | - | - | - | 0 | 0,00j | 1,59m ¹ | 42,50d | 23,64 |
| FB23 | - | - | - | - | + | 1 | 0,00j | 0,00m ¹ | 29,73c | 46,57 |
| FB24 | - | - | + | + | + | 3 | 29,66g | 30,67g ¹ | 46,61e | 16,26 |
| FB25 | - | - | - | - | + | 1 | 1,52j | 0,00m ¹ | 27,21b | 51,11 |
| FB26 | - | + | + | + | + | 4 | 0,00j | 0,00m ¹ | 50,00e | 10,17 |
| FB27 | - | + | + | - | + | 3 | 81,88c | 85,84c ¹ | 24,03b | 56,82 |
| FB28 | - | - | + | + | + | 3 | 0,00j | 10,31j ² | 54,76f | 1,62 |
| FB30 | - | - | - | - | - | 0 | 0,00j | 0,00m ¹ | 50,40e | 9,44 |
| FB31 | - | - | - | - | + | 1 | 0,00j | 0,00m ¹ | 50,86e | 8,62 |
| FB32 | - | - | - | - | - | 0 | 0,00j | 0,00m ¹ | 40,82d | 26,66 |
| FB33 | - | - | - | - | - | 0 | 0,00j | 0,00m ¹ | 44,17d | 20,64 |
| FB34 | - | - | - | - | + | 1 | 95,5b | 97,35b ¹ | 58,89f | -5,81 |
| FB35 | - | - | - | - | + | 1 | 3,05j | 3,94m ¹ | 30,35c | 45,46 |
| FB36 | - | - | - | - | + | 1 | 0,00j | 0,00m ¹ | 46,91e | 15,72 |
| FB37 | - | + | - | + | + | 3 | 0,00j | 0,00m ¹ | 45,77e | 17,76 |
| FB38 | - | - | - | - | + | 1 | 1,00j | 1,51m ¹ | 44,00d | 20,95 |
| FB39 | - | - | - | - | + | 1 | 99,44a | 97,90b ¹ | 51,76e | 7,00 |
| FB40 | - | - | + | - | + | 2 | 1,55j | 2,70m ¹ | 44,14d | 20,70 |
| FB41 | - | - | - | - | - | 0 | 0,00j | 5,00m ² | 41,84d | 24,82 |
| FB42 | - | - | - | - | - | 0 | 5,09j | 9,54j ¹ | 47,13e | 15,32 |
| FB43 | - | - | - | - | - | 0 | 0,00j | 0,00m ¹ | 48,22e | 13,36 |
| FB44 | - | - | - | - | - | 0 | 36,02f | 38,35f ¹ | 40,57d | 27,11 |
| FB45 | - | - | - | - | - | 0 | 0,00j | 0,00m ¹ | 19,69b | 64,62 |
| FB50 | - | - | - | - | - | 0 | 0,55j | 0,00m ¹ | 43,87d | 21,18 |
| FB59 | - | - | - | - | + | 1 | 0,00j | 0,00m ¹ | 15,90a | 71,43 |
| FB60 | - | - | + | + | - | 2 | 83,84c | 96,00b ² | 28,66c | 48,50 |
| FB62 | - | - | - | + | + | 2 | 86,2c | 96,88b ² | 21,00b | 62,27 |
| FB64 | - | - | - | - | + | 2 | 0,00j | 0,00m ¹ | 27,03b | 51,44 |
| FB66 | - | - | - | - | - | 0 | 0,00j | 0,00m ¹ | 27,61c | 50,39 |
| FB67 | - | - | - | - | - | 0 | 0,00j | 9,00j ¹ | 44,45d | 20,13 |
| FB68 | - | - | + | - | - | 1 | 0,00j | 0,00m ¹ | 13,62a | 75,52 |
| C.V.% | | | | | | | 25,24 | 15,08 | 5,34 | |

Nesse sentido, 85% dos isolados de figueira e 74% dos isolados de folhelhos betuminosos apresentaram capacidade de produzir algum composto relacionado ao antagonismo a *M. incognita*. A produção de enzimas lífticas por rizobactérias está associada, principalmente, a inição da eclosão dos nematoides, pois atua nos componentes estruturais dos ovos que são vitais para o desenvolvimento do embrião.

O tegumento da casca dos ovos de *Meloidogyne* sp. funciona como uma barreira que protege os embriões de agentes químicos e biológicos e é composta por três camadas: a mais externa chamada camada vitelínica, a camada quitinosa média formada por matriz protéica incorporado com microfibrilas de quitina e a camada

lipídica interna (BIRD & McClure, 1976). A camada lipídica é responsável por manter a impermeabilidade da casca, enquanto a camada quitinosa fornece proteção à camada lipídica e resistência estrutural; e, a camada vitelina garante a uniformidade estrutural dos ovos (Wharton, 1980). Em função de sua importância, a degradação dessas estruturas é um dos principais mecanismos de agentes biocontroladores que parasitam ovos.

A protease é uma enzima importante visto que a camada vitelina, primeira barreira de proteção do ovo, é basicamente composta de proteína e que toda estrutura da casca do ovo é composta por pelo menos 40% de proteína (Wharton, 1980). Segundo Wei e

colaboradores (2009), a produção de proteases é um excelente indicador para recrutamento de biocontroladores pois existe correlação entre a produção de proteases e o biocontrole de nematoides fitopatogênicos em ensaios *in vivo*.

Os resultados encontrados no presente trabalho (Tabela 2) demonstram que a atividade ovicida predomina entre os isolados capazes de produzir proteases e lipases, corroborando que a produção de enzimas líticas por antagonistas está relacionada à capacidade de inibir a eclosão de nematoides. Embora apenas um dos isolados tenha produzido quitinase (F83), a produção de proteases foi frequente, sendo verificada em cerca de 39% dos isolados (Tabela 2). De forma semelhante, Arduim (2006) avaliando a capacidade enzimática de isolados de raízes de figueira para o biocontrole de *M. incognita*, também constatou que esta foi a atividade enzimática mais frequente entre as bactérias deste ambiente.

Estudos têm demonstrado que a produção de proteases é uma das principais características envolvidas no sucesso de *Bacillus* sp. no controle de fitonematóides (ANN, 2013), permitindo a penetração de bactérias pela cutícula do nematóide (LIAN et al., 2006), de forma semelhante, observou-se que os isolados desse gênero, F08, F25, F71 e FB27 produziram proteases nos dois testes realizados e apresentaram elevados índices de mortalidade e inibição da eclosão de J2 de *M. incognita*.

A atividade proteolítica, também tem sido descrita como um dos principais mecanismos de antagonismo aos nematoides em *Pseudomonas* sp. (Siddiqui et al., 2005), no entanto o isolado FB59 (*Pseudomonas denitrificans*) não demonstrou atividade nos substratos avaliados.

Mas, apesar da importância das enzimas líticas, sabe-se que outros mecanismos de biocontrole podem estar presentes, justificando a importância de avaliar os isolados quanto ao efeito sobre a mortalidade e eclosão dos nematoides. Nesse sentido, a produção de amônia também é um fator importante devido ao seu efeito tóxico aos nematoides (Rodríguez-Kábana et al., 1987) e foi observada na maioria dos isolados (54%)

(Tabela 2).

Vários isolados apresentaram altas taxas de mortalidade, mesmo produzindo um reduzido número de compostos relacionados ao biocontrole (Tabela 2) indicando a presença de outras estratégias para biocontrole diferentes daquelas aqui estudadas. Ruanpanun e colaboradores (2011) demonstraram o efeito de diversos compostos obtidos a partir de estreptomicetos sobre a eclosão e mortalidade de juvenis de *M. incognita*, ressaltando a eficiência de substâncias nematicidas produzidas por biocontroladores como a fervulina.

Em trabalho semelhante, Arduim (2006), obteve diversos isolados de raízes de figueira, que resultaram em até 86% de mortalidade de e 77% de inibição da eclosão de J2 de *M. incognita*, sendo esses valores atribuídos, principalmente, à produção de enzimas; porém, alguns isolados não produziram nenhum tipo de enzima e foram promissores quanto à inibição da eclosão de *M. incognita in vitro*.

De forma semelhante, alguns isolados que apresentaram efeito ovicida significativo, não foram capazes de produzir a maioria dos compostos testados. Assim, o isolado F78 que inibiu 100% a eclosão dos juvenis, porém produziu apenas lipases. Corroborando a importância de outros mecanismos de controle como compostos tóxicos aos nematoides (Sun et al., 2006).

Em bactérias do gênero *Streptomyces* sp., como os isolados F76 e F78, consideradas importantes antagonistas a nematoides fitopatogênicos (Elnagdi & Youssef, 1994; Samac & Kindel, 2001) o controle de fitonematoides está relacionada principalmente a produção de compostos tóxicos aos nematoides (Dicklow et al. 1993; Mishra et al. 1987; Sun et al. 2006). Semelhantemente, o isolado F78 apresentou elevados índices de mortalidade e inibição da eclosão, embora não produza proteases, quitinases ou amônia. De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, 14 bactérias foram consideradas mais promissoras entre 124 isolados avaliados, pois produziram pelo menos um composto relacionado ao biocontrole de fitonematoides e altos níveis de mortalidade ou redução da eclosão (Tabela 2).

Tabela 3. Identificação de bactérias selecionadas *in vitro* para controle de *Meloidogyne incognita* por seqüenciamento de região conservada de 16S rRNA. NS- Fragmentos não significativos para identificação.

| Isolado | Tamanho da seqüência obtida | Descrição | % de identidade |
|---------|-----------------------------|--|-----------------|
| F08 | 746 | <i>Bacillus</i> sp. | 99 |
| F25 | 765 | <i>Bacillus</i> sp. | 99 |
| F64 | 309 | <i>Microbacterium trichothecenolyticum</i> | 90 |
| F71 | 500 | <i>Bacillus</i> sp. | 99 |
| F75 | NS | - | - |
| F76 | 572 | <i>Streptomyces</i> sp. | 97 |
| F78 | 468 | <i>Streptomyces</i> sp. | 97 |
| FB27 | 636 | <i>Bacillus megaterium</i> | 98 |
| FB34 | 707 | <i>Arthrobacter oxydans</i> | 94 |
| FB39 | 785 | <i>Micrococcus luteus</i> | 98 |
| FB59 | 351 | <i>Pseudomonas denitrificans</i> | 96 |
| FB60 | NS | - | - |
| FB62 | 633 | <i>Janibacter terrae</i> | 99 |
| FB68 | 740 | <i>Gordonia westfalica</i> | 99 |

Através da caracterização dos isolados, selecionadas *in vitro* quanto ao efeito nematicida e ovicida sobre *M. incognita*, constatou-se que as bactérias selecionadas, são predominantemente Firmicutes, sendo apenas um isolado de Proteobacterias (Tabela 3).

Entre os isolados selecionados como potenciais biocontroladores de *M. incognita* predominaram bactérias Gram positivas, porém não existem relatos na literatura que evidenciem uma prevalência de biocontroladores nesse grupo específico, contudo, verifica-se que quanto ao gênero, *Pasteuria* spp., *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp., *Pseudomonas* spp. e *Serratia* spp., são as rizobactérias biocontroladoras relatadas com mais frequência (Siddiqui & Mahmood, 1999; Silveira & Freitas, 2007).

Entre as bactérias selecionadas predominam gêneros cujo papel como biocontroladores tem sido frequentemente relatado, como *Bacillus* sp. e *Streptomyces* sp.

Diversos estudos consideram bactérias do gênero *Bacillus* sp. como os isolados F08, F25, F71 e FB27 biocontroladores promissores, devido a características altamente desejáveis como capacidade de colonizar raízes, atividade contra diferentes nematóides fitopatogênicos e capacidade de esporular (Siddiqui & Mahmood, 1999; Radnedge et al., 2003).

O gênero *Streptomyces* sp. também é bastante estudado em virtude da produção de diversos metabólitos ativos contra nematóides (Dicklow et al., 1993; Inbar et al., 2005; Ruanpanun et al., 2011).

Apesar da importância dos resultados encontrados no presente estudo, reduzindo o número de candidatos para avaliação em ensaios *in vivo*, a eficácia dos isolados selecionados para controle de *M. incognita* deve ser comprovada em plantas de figueira, visto que a atividade desses organismos depende também da sua capacidade de se estabelecer e competir com a microbiota presente no solo (Zhang & Yuen 2000) entre outros fatores.

REFERÊNCIAS

AGROFIT (Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários)

2003 - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Coordenação-Geral de Agrotóxicos e Afins/DFIA/DAS. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: jul. 2015.

ALICE WEB. Sistema de Análise das Informações de Comércio Exterior. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. Disponível em: <<http://aliceweb2.mdic.gov.br/menu/index/item/aliceweb>>. Acesso em: 10 maio 2013.

Alves, G.C.S., J. M. Santos, P. L. M. Soares, F. G. Jesus, E. J. Almeida & R. T. Thuler. 2011. Avaliação *in vitro* do efeito de rizobactérias sobre *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *Pratylenchus zaei*. Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo, 78(4):557-564.

Ann, Y.C. 2013. Screening for Nematicidal Activities of Bacillus Species Against Root Knot Nematode (*Meloidogyne incognita*). American Journal of Experimental Agriculture, 3(4):794-805.

Arduim, G. S. 2006. Controle biológico de *Meloidogyne incognita* raça 2 e promoção de crescimento de figueira

por rizobactérias. 2006. 50 f. Mestrado em Fitossanidade. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas.

Ashoub, A. H. & M. T. Amara. 2010. Biocontrol Activity of Some Bacterial Genera Against Root-Knot nematode, *Meloidogyne incognita*. Journal of American Science, 6(10)

Barra, V. R., R. Da Silva, H. G. M. Ferraz, D. Macagnan, H. S. A. Silva, A. B. Moura, B. De A. Halfeld-Vieira, H. L. Mendonça & J. R. Vieira Júnior. 2008. Potencialidade antagonística detectada em alguns procariotas agentes de biocontrole de enfermidades de Plantas. Summa Phytopathologica, 34(2):121-126.

Bird, A. F. & M. A. McClure. 1976. The tylenchid (Nematoda) egg shell: structure, composition and permeability. Parasitology, 72:19-28.

Bueno, P. R. R., F. A. P. Gonçalves & F. Ascêncio. 2006. Avaliação da distribuição espacial e de níveis de infestação de nematóides na área de figueira (*Ficus carica*). Do campo experimental "Coração da terra" FAEF Garça – SP. Revista científica eletrônica de agronomia, a.V, n.10.

Canteri, M. G., R. A. Althaus, J. S. Virgens Filho, E. A. Giglioti & C. V. Godoy. 2001. SASM - Agri: Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scoft - Knott, Tukey e Duncan. Revista Brasileira de Agrocomputação, 1(2):18-24.

Carneiro, R. M. D. G. & M. R. A. Almeida. 2001. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematóides das galhas para identificação de espécies. Nematologia Brasileira, 25(1):35-44.

Cattelan, A. J. 1999. Métodos quantitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras do crescimento vegetal. Londrina: Embrapa soja, 36p.

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

Christie, J. R. & V. G. Perry. 1951. Removing nematodes from the soil. Proceedings of the Washington Helminthological Society, 18:106-108.

Dicklow, M. B., N. Acosta & B. M. Zuckerman 1993. A novel *Streptomyces* species for controlling plant-parasitic nematodes. J Chem Ecol, 19:159-173.

Dunne, C., I. Delany, A. Fenton & F. O'gara. 2013. Mechanisms involved in biocontrol by microbial inoculants. Agronomie, 16:721-729.

El-Nagdi, W. M. A. & M. M. A. Youssef. 1994. Soaking faba bean seed in some bio-agents as prophylactic treatment for controlling *Meloidogyne incognita* root-knot nematode infection. 2004. J Pest Sci, 77:75-78.

Fabry, C. F. S., L. G. Freitas, W. S. Neves, M. M. Coutinho, M. R. Tótola, J. R. Oliveira, R. D. Giarretta & S. Ferraz. 2007. Obtenção de Bactérias para a Biocontrole de *Meloidogyne javanica* por Meio de Aquecimento de Solo e Tratamento com Filtrado de Raízes de Plantas Antagonistas a Fitonematóides. Fitopatologia Brasileira, 32(1).

Fahy, P. C. & G. J. Persley. 1983. Plant Bacterial Diseases. Academic Press Australia, p.393.

Freitas, L. G., W. S. Neves, C.F.S. Fabry, B. M. Marra, M. M. Coutinho, R.S. Romeiro & S. Ferraz. 2005. Isolamento e seleção de rizobactérias para controle de nematóides formadores de galhas (*Meloidogyne* spp.)

- na cultura do tomateiro. *Nematologia Brasileira*, 29(2):215-220.
- Gorbushina, A. A.** 2007. Life on the rocks-minireview. *Environ Microbiol*, 9(7):1613-1631.
- Hirsch, P., U. Mevs, R. Kroppenstedt, P. Schumann & E. Stackebrandt** 2004. Cryptoendolithic actinomycetes from Antarctic sandstone rock samples: *Micromonospora endolithica* sp. nov. and two isolates related to *Micromonospora coerulea* Jensen 1932. *Syst Appl Microbiol*, 27:166-174.
- Hussey, R. S. & K. R. Barker.** 1973. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. *Plant Disease Reporter*, St Paul, 57:1025-1028.
- Inbar, E., S.J. Green, Y. Hadar & D. Minz.** 2005. Competing factors of compost concentration and proximity to root affect the distribution of streptomycetes. *Microbial Ecology*, 50:73-81.
- Kado, C. I. & M. G. Heskett.** 1970. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology*, 60:969-976.
- Leonel, S. & A. Figueira.** 2008. Revista brasileira de fruticultura, 30(3):577-856.
- Lian, L.H., B.Y. Tian, R. Xiong, M.Z. Zhu, J. Xu & K.Q. Zhang.** 2006. Protease from *Bacillus*: a new insight into the mechanism of action for rhizobacteria suppression of nematode population. *Letters in Applied Microbiology*. Doi:10.1111/j.1472-765x.2007.02181.x.
- Lima Medina, I., C.B. Gomes, C.E. Rossi & R.M.G. Carneiro.** 2006. Caracterização e identificação de populações de nematoides de galhas provenientes de figueiras (*Ficus carica* L.) do Rio Grande do Sul e de São Paulo. *Nematologia Brasileira*, 30(2):179-187.
- Mariano, R. & E. B. Silveira.** 2005. Manual de práticas em fitobacteriologia. 2. ed. Recife: UFRP, 2005, 184p.
- Mishra, S. K., J. E. Keller, J. R. Miller, R. M. Heisey, M. G. Nair & A. R. Putnam.** 1987. Insecticidal and nematocidal properties of microbial metabolites. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2:267-276.
- Oka, Y., I. Chet & Y. Spiegel.** 1993. Control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Bacillus cereus*. *Biological Science and Technology*, 3:115-126.
- Radnedge, L., P.G. Agron, K.K. Hill, P.J. Jackson, L.O. Ticknor, P. Keim & G.L. Andersen.** 2003. Genome differences that distinguish *Bacillus anthracis* from *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:2755-2764.
- Rodríguez-Kábana, R., G. Morgan-Jones & I. Chet.** 1987. Biological control of nematodes: Soil amendments and microbial antagonists. *Plant and Soil*, 100:237-247.
- Ruanpanun, P., H. Laatsch, N. Tangchitsomkid & S. Lumyong.** 2011. Nematocidal activity of ferverulin isolated from a nematocidal actinomycete, *Streptomyces* sp. CMU-MH021, on *Meloidogyne incognita*. *World J Microbiol Biotechnol*, 27(6):1373-1380.
- Samac, D. A. & L. L. Kindel.** 2001. Suppression of the root-lesion nematode (*Pratylenchus penetrans*) in alfalfa (*Medicago sativa*) by *Streptomyces* spp. *Plant Soil*, 235:35-44.
- Santin, R. C. M.** 2008. Potencial do uso dos fungos *Trichoderma* spp e *Paecilomyces lilacinus* no biocontrole de *Meloidogyne incognita* em *Phaseolus vulgaris*. 92p. Tese de Doutorado. Porto Alegre, RS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Schaad, N. W., J. B. Jones & W. Chun.** 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3 ed. St. Paul: The American Phytopathology Society, 373p.
- Schroth, M. N. & J. G. Hancock.** 1982. Disease-suppressive soil and root-colonizing bacteria. *Science*, 216:1376-1381.
- Scott, A. J. & M. A. Knott.** 1974. Cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. *Biometrics*, 30: 507-512.
- Siddiqui, Z. A. & I. Mahmood.** 1999. Role of rhizobacteria in the management of plant-parasitic nematodes: A review. *Bioresource Technology*, 69:167-179.
- Siddiqui, I. A., D. Haas & S. Heeb.** 2005. Extracellular Protease of *Pseudomonas fluorescens* CHA0, a biocontrol factor with activity against the Root-Knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Applied and environmental microbiology*. 71(9):5646-5649.
- Sikora, R.A.** 1988. Interrelationship between plant health promoting rhizobacteria, plant parasitic nematodes and soil microorganisms. *Medicine Facuteit Landbouwwettenschapelipke Rijksuniversiteit Gent*, 53(2b):867-878.
- Silveira, A. P. & S. S. Freitas.** 2007. Microbiota do solo e qualidade ambiental. Campinas, SP: Instituto Agrônômico, 312p.
- Somers, E., J. Vanderleyden & M. Srinivasan.** 2004. Rhizosphere bacterial signaling: a love parade beneath our feet. *Critical Review Microbiology*, 30:205-240.
- Sun, M. H., L. Gao, Y. X. Shi, B. J. Li & X. Z. Liu.** 2006. Fungi and actinomycetes associated with *Meloidogyne* spp. eggs and females in China and their biocontrol potential. *J Invertebr Pathol*, 93:22-28.
- Wei, B. Q., Q. Y. Xue, L. H. Wei, D. D. Niu, H. X. Liu, L. F. Chen & J. H. Guo.** 2009. A novel screening strategy to identify biocontrol fungi using protease production or chitinase activity against *Meloidogyne* root-knot nematodes. *Biocontrol Science and Technology*, 19(8):859-870.
- Wharton, D.** 1980. Nematode egg-shells. *Parasitology*, 81:447-463.
- Zhang, Z. & G. Y. Yuen.** 2000. The role of chitinase production by *Stenotrophomonas maltophilia* strain C3 in biological control of *Bipolaris sorokiniana*. *Phytopathology*, 90:384-389.
- Zuckerman, B. M. & H. B. Jasson.** 1984. Nematode chemotaxis and possible mechanisms of host/prey recognition. *Annual Review Phytopathology*, 22:95-113.