



REGIANE ALVES BELIZARIO

**APLICAÇÃO DE *Bacillus subtilis* NA CULTURA DO
CAFEEIRO PARA O CONTROLE DE *Meloidogyne
paranaensis***

Lavras-MG

2022

REGIANE ALVES BELIZARIO

**APLICAÇÃO DE *Bacillus subtilis* NA CULTURA DO CAFEIEIRO PARA O
CONTROLE DE *Meloidogyne paranaensis***

Relatório de TCC apresentado à
Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do Curso
de Agronomia, para obtenção do
título de Bacharel.

Prof^a. Dr^a. Dalysse Toledo Castanheira

Orientadora

Prof^a. Dr^a. Joyce Dória Rodrigues

Coorientadora

Lavras-MG

2022

REGIANE ALVES BELIZARIO

**APLICAÇÃO DE *Bacillus subtilis* NA CULTURA DO CAFEIEIRO PARA O
CONTROLE DE *Meloidogyne paranaensis***

Relatório de TCC apresentado á
Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do Curso
de Agronomia, para obtenção do
título de Bacharel.

APROVADA em

Prof^ª. Dr^ª. Dalys Toledo Castanheira

Orientadora

Prof^ª. Dr^ª. Joyce Dória Rodrigues

Coorientadora

Lavras-MG

2022

A minha mãe, Valdelucia, mulher com força e fé incomparáveis. Minha
inspiração, minha motivação.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me dado forças, discernimento e sabedoria em todos os momentos, me sustentando até aqui.

Aos meus pais, Valdelucia Alves de Sousa Belizario e Marcio Exedito Belizario, pela educação e criação que me deram. Por não medirem esforços para que eu realizasse esse sonho, que estiveram sempre ao meu lado, lutando, sofrendo e sorrindo comigo. Devo tudo a vocês.

À Universidade Federal de Lavras, local que foi minha segunda casa durante esses anos, onde tanto aprendi e cresci. A todos os profissionais que foram excepcionais e fundamentais na minha formação.

À Dr^a. Vytória Piscitelli Cavalcanti, pela amizade, por ter acreditado em mim, me ensinado tanto, me orientado e me inspirado a dar sempre o meu melhor.

À minha orientadora, Dr^a. Dalysse Toledo Castanheira pela oportunidade e por toda a ajuda, orientação e dedicação.

À minha co-orientadora, Dr^a. Joyce Dória Rodrigues, pela ajuda durante a minha caminhada na graduação.

À Jéssica de Castro pela oportunidade, confiança e trocas de conhecimento.

À Dr^a. Michele Carla Nadal, pela grande amizade e ajuda desde o início de minha graduação.

A toda equipe do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais pelo apoio e amizade ao longo desses anos.

Aos meus amigos Madelyne Jara, Kamilly Fernandes, Clerio Rodrigues, Pedro Henrique, Mallu Paiva, Brenda Miriam, Sansão Augusto, Carla Carvalho e Celso por toda ajuda, amizade e apoio.

A minha Avó, Maria Aparecida Barbosa Belizario que me acolheu e sempre acreditou em mim.

Aos meus irmãos Cristiane Aparecida Belizario e Marcelo Henrique Belizario e, ao meu noivo, Wellington Junio Amâncio Santos, que foram bases para mim durante toda a graduação e que me deram todo tipo de apoio.

A pesquisadora, Dr^a. Sônia Maria de Lima Salgado pelo suporte e orientação que foram essenciais para a realização deste trabalho.

Ao técnico, Mauro pelo suporte técnico e acompanhamento.

À AgroCp[®], pela parceria no desenvolvimento deste trabalho.

À FAPEMIG, por todo suporte durante a realização do projeto.

A todos os envolvidos para que eu chegasse até aqui, colegas, amigos e familiares, minha gratidão por toda palavra e mão amiga e por todo apoio, sem vocês eu não seria capaz.

RESUMO

O café é uma das principais commodities brasileira. No entanto, entre os fatores limitantes à produção cafeeira destaca-se a ocorrência do nematoide-das-galhas (*Meloidogyne* spp.), o qual pode provocar perdas de até 20% na produção. O *M. paranaensis* causa galhas e rachaduras no sistema radicular das plantas, e isso prejudica a absorção de água e nutrientes e, conseqüentemente, afeta seu crescimento e desenvolvimento. Além disso, há grande dificuldade na detecção e controle desse nematoide, sendo necessário fazer o manejo integrado, adotando estratégias como uso de mudas sadias, solarização do solo e aplicação de nematicidas. Considerando os impactos ambientais causados por produtos químicos, os produtos biológicos tornaram-se importantes aliados no controle de fitonematoides. Sendo assim, o objetivo do trabalho foi avaliar o efeito de dois isolados de *Bacillus subtilis* no controle de *M. paranaensis* no cafeeiro. Experimentos *in vitro* foram realizados para avaliar o efeito das bactérias na eclosão dos ovos, motilidade e mortalidade de juvenis de segundo estágio (J2), utilizando cinco concentrações (0, 15, 30, 45 e 60%) com sete repetições no teste de eclosão e dez repetições nos testes de motilidade e mortalidade. Já os testes *in vivo* foram realizados em casa de vegetação com a variedade Catuaí vermelho 99. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), com cinco tratamentos e dez repetições. Os tratamentos foram constituídos pela aplicação do isolado 09, isolado 15 e mistura dos dois isolados, todos em solo infestado com *M. paranaensis*, e dois controles sem aplicação, um com *M. paranaensis* e outro sem o nematoide. Para infestação do solo com *M. paranaensis*, foram adicionados 2 a 3 ovos/cm³ de solo em vasos de 1,7 L. Após 15 dias, 5 mL da suspensão das bactérias foram pulverizadas no solo. Aos 185 dias após a inoculação (DAI), foram avaliados número de ovos nas raízes, assim como parâmetros de crescimento e desenvolvimento das plantas. Aumento na mortalidade e no número de J2s imóveis, bem como diminuição na eclosão dos ovos com o aumento da concentração dos metabólitos da bactéria foram observados. Diferença significativa não foi observada para número de ovos por planta, massa fresca de ramos e folhas, comprimento da raiz, número de ramos, clorofila *b* e clorofila total. Já a massa fresca de raiz apresentou melhor resultado para plantas tratadas com *B. subtilis*. Dessa forma, conclui-se que os isolados de *B. subtilis* apresentaram propriedades nematicidas e antagonismo a *M. paranaensis*. Contudo, novos estudos são necessários visando a definição da melhor forma de aplicação dos isolados.

Palavras-chave: Café. Controle biológico. Nematoide-das-galhas.

ABSTRACT

Coffee is one of the main Brazilian commodities. However, among the limiting factors to coffee production, the occurrence of the root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.) stands out, which can cause losses of up to 20% in production. *M. paranaensis* causes galls and cracks in the root system of plants, and this impairs the absorption of water and nutrients and, consequently, affects their growth and development. In addition, there is great difficulty in detecting and controlling this nematode, and it is necessary to carry out an integrated management, adopting strategies such as the use of healthy seedlings, soil solarization and application of nematicides. Considering the environmental impacts caused by chemicals, biological products have become important allies in the control of phytonematodes. Therefore, the objective of this work was to evaluate the effect of two *Bacillus subtilis* isolates on the control of *M. paranaensis* in coffee. *In vitro* experiments were carried out to evaluate the effect of bacteria on egg hatching, motility and mortality of second instar juveniles (J2), using five concentrations (0, 15, 30, 45 and 60%) with seven replications in the hatching test and ten repetitions in the tests of motility and mortality. The *in vivo* tests were carried out in a greenhouse with the variety Catuaí Vermelho 99. The experimental design was completely randomized (DIC), with five treatments and ten replications. The treatments consisted of the application of isolate 09, isolate 15 and a mixture of the two isolates, all in soil infested with *M. paranaensis*, and two controls without application, one with *M. paranaensis* and the other without the nematode. For soil infestation with *M. paranaensis*, 2 to 3 eggs/cm³ of soil were added in 1.7 L pots. After 15 days, 5 mL of the bacteria suspension were sprayed onto the soil. At 185 days after inoculation (DAI), the number of eggs in the roots, as well as plant growth and development parameters were evaluated. An increase in mortality and in the number of immobile J2s, as well as a decrease in egg hatching with increasing concentration of bacterial metabolites were observed. No significant difference was observed for number of eggs per plant, fresh mass of branches and leaves, root length, number of branches, chlorophyll b and total chlorophyll. The fresh root mass showed better results for plants treated with *B. subtilis*. Thus, it is concluded that the isolates of *B. subtilis* showed nematicidal properties and antagonism to *M. paranaensis*. However, further studies are needed to define the best way to apply the isolates.

Keywords: Coffee. Biological control. Root-knot nematode.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Galhas presentes nas plantas utilizadas para extração.	18
Figura 2- Extração dos ovos de nematoides.	18
Figura 3- Isolados das bactérias de <i>B. subtilis</i>	19
Figura 4- Obtenção dos metabólitos dos isolados de <i>B. subtilis</i>	20
Figura 5- Câmara de eclosão.	22
Figura 6- Cultivo das mudas de café em casa de vegetação.	23
Figura 7- Inoculação dos ovos de nematoide.	24
Figura 8 - Modelos de regressão apresentando o efeito da concentração dos metabólitos dos isolados de <i>B. subtilis</i> (09, 15 e 09+15) na eclosão dos ovos de <i>M. paranaensis</i>	30
Figura 9- Modelos de regressão apresentando o efeito da concentração dos metabólitos dos isolados de <i>B. subtilis</i> (09, 15 e 09+15) na mortalidade dos J2 de <i>M. paranaensis</i>	31
Figura 10 - Modelos de regressão apresentando o efeito da concentração dos metabólitos dos isolados de <i>B. subtilis</i> (09, 15 e 09+15) na motilidade dos J2 de <i>M. paranaensis</i>	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Descrição dos tratamentos in vitro	21
Tabela 2- Descrição dos tratamentos in vivo	24
Tabela 3- Média do número de ramos e comprimento da raiz por tratamento	26
Tabela 4 - Média da massa fresca das raízes, folhas e ramos por tratamento.	27
Tabela 5 - Média do número de ovos por planta.	28
Tabela 6 - Média dos índices de clorofila a, b e total por tratamento.....	28
Tabela 7 - Valores de IC50 dos isolados de <i>B. subtilis</i> para eclosão dos ovos e motilidade e mortalidade dos J2s de <i>M. paranaensis</i>	29

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	12
2.	OBJETIVOS	13
2.2	Objetivos Específicos	13
3.	REFERENCIAL TEÓRICO	13
4.	MATERIAL E MÉTODOS	17
4.3	Experimento <i>in vitro</i>	19
4.3.2	Teste de eclosão	20
4.3.3	Teste de motilidade e mortalidade	21
4.4	Experimento <i>in vivo</i>	22
4.7	Avaliação do crescimento das plantas	25
4.8	Número de Ovos	25
4.9	Análises estatísticas	26
5.	RESULTADOS	26
5.2	Número de ovos por planta	27
5.3	Índice de clorofila	28
5.4	Eclosão, Mortalidade e Motilidade	28
6.	DISCUSSÃO	34
7.	CONCLUSÕES	36
8.	REFERENCIAS	37

1. INTRODUÇÃO

Diante do crescente aumento populacional, a produção de alimentos para sustentar bilhões de pessoas é um dos grandes desafios da atualidade. Segundo as projeções das Nações Unidas, apesar da população estar crescendo em ritmo mais lento desde 1950, há expectativa de chegar aos 9,7 bilhões de pessoas no ano de 2050 (ONU, 2022). O Brasil é um grande produtor e exportador de commodities agrícolas. O levantamento da safra publicado pela CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento) aponta que a produção de grãos no país deve alcançar 272,5 milhões de toneladas no ciclo 2021/22 (CONAB, 2022). Outro importante produto de exportação é o café. Em 2021 foram cerca de 42,4 milhões de sacas de 60 kg de café verde exportados, mantendo a primeira colocação no ranking mundial (CONAB, 2021).

Um dos grandes problemas enfrentados pelos cafeicultores é a suscetibilidade do cafeeiro a várias doenças que podem ocorrer tanto na fase de viveiro quanto no campo. A incidência dessas doenças na cultura é um dos fatores que contribuem para a redução da produtividade e da qualidade do café, além de aumentar o custo de produção (CARVALHO et al., 2012). Um exemplo de patógeno que acomete a cultura do cafeeiro, trazendo grandes prejuízos, são os nematoides parasitas de plantas, organismos que habitam os mais diferentes habitats, na maioria das vezes microscópicos e filiformes, que podem atacar as raízes das plantas levando-as a morte (MIRANDA & MIRANDA, 2005). A fim de controlar esses patógenos e garantir a produtividade agrícola, produtos químicos são utilizados na maioria das vezes, porém, o uso inadequado ou desenfreado leva a problemas como contaminação de solo e água, intoxicação de animais e seres humanos, indução de resistência em patógenos, pragas e plantas daninhas a certos ingredientes ativos (MORANDI, 2009). No entanto, o uso de mais de um método de controle, como cultural e biológico tornam-se importantes alternativas no manejo de pragas e doenças a fim de se evitar os problemas anteriormente citados.

O controle biológico, de maneira simplificada, corresponde ao uso de organismos vivos residentes ou introduzidos no ambiente para minimizar ou eliminar os impactos negativos de organismos que reduzem a capacidade produtiva das plantas (MACHADO et al., 2012), podendo ser utilizados microrganismos como fungos, bactérias e vírus. Um exemplo de sucesso no controle biológico é uso de *Bacillus subtilis*, que é uma rizobactéria muito estudada e utilizada devido a sua capacidade de competir com os patógenos, produzir compostos tóxicos a estes, além de induzir a resistência da planta e interferir no ciclo reprodutivo do fitonematoide (BETTIOL, 1991).

Neste contexto, o presente trabalho, em parceria com a empresa de fertilizantes AgroCp[®], teve como objetivo avaliar a ação de dois isolados de *Bacillus subtilis* no manejo de *Meloidogyne paranaensis* no cafeeiro afim de desenvolver um produto biológico que atenda as necessidades do produtor.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da aplicação de *Bacillus subtilis* no controle de *Meloidogyne paranaensis* na cultura do cafeeiro, buscando o desenvolvimento futuro de um produto de base biológica que atenda às necessidades dos produtores.

2.2 Objetivos Específicos

- a) Verificar o efeito dos isolados de *B. subtilis* na eclosão dos ovos e na motilidade e mortalidade dos J2 de *M. paranaensis*.
- b) Testar a eficiência dos isolados de *B. subtilis* no controle de *M. paranaensis* em plantas de café;
- c) Avaliar o efeito da aplicação de *B. subtilis* no crescimento e desenvolvimento das plantas de café;

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 A Cultura do cafeeiro

O cafeeiro é um arbusto com dimorfismo de ramos e crescimento contínuo, podendo chegar a 4 m de altura dependendo das condições climáticas da região de cultivo (FERRAZ, 2013). Bridson e Verdcourt (1988) e Bridson (1994) reuniram o cafeeiro em dois gêneros: *Psilanthus* Hook e *Coffea* L. O gênero *Coffea* possui ainda o subgênero *Baracoffea* com sete espécies e o subgênero *Coffea*, com mais de 80 espécies, dentre elas as duas de maior importância econômica: *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* Pierre (FERRAZ, 2013).

Atualmente, a maior produção se concentra principalmente nos estados de Minas Gerais, Espírito Santo e São Paulo. Em 2021, mesmo com a bienalidade negativa e ocorrência atípica de forte geada, obteve-se produção de 47.716 mil sacas de café beneficiado, com área de 1.808,5 mil ha. Além disso, exportou-se cerca de 42,4 milhões de sacas de 60 kg de café verde (CONAB, 2021), mantendo a primeira colocação no ranking mundial de exportação da *commoditie*.

3.2 Nematoides no cafeeiro

Os nematoides são organismos geralmente microscópicos, de corpo filiforme, capazes de habitar solo e água, podendo ser de vida livre, parasitas de plantas, insetos ou animais (FERRAZ, 2016). Os nematoides parasitas de plantas, também conhecidos como fitonematoides, podem atacar folhas, flores e caules, embora as espécies mais importantes sejam aquelas que vivem no solo e parasitam raízes, bulbos e tubérculos (MIRANDA & MIRANDA, 2005). Diversas espécies de fitonematoides podem parasitar o cafeeiro, mas os gêneros *Meloidogyne* e *Pratylenchus* são os mais importantes para a cafeicultura brasileira. No gênero *Pratylenchus*, as duas espécies mais importantes para a cultura do cafeeiro são *P. brachyurus* e *P. coffeae*, e no gênero *Meloidogyne* têm-se *M. exigua*,

M. incognita, *M. coffeicola*, *M. javanica*, *M. hapla* e *M. paranaensis* como as espécies maiores causadoras de danos (SALGADO et al., 2011).

Os nematoides de importância econômica são aqueles que passam a maior parte de sua vida alimentando-se de células da raiz no mesmo local, ou seja, os endoparasitas sedentários, como é o caso do gênero *Meloidogyne*. As fêmeas deste gênero depositam seus ovos em um único local, formando uma massa típica em meio ao parênquima cortical (na face interna) ou sobre a superfície da raiz (face externa), podendo conter até 400 ovos que ficam unidos por uma secreção glandular retal excretada pela fêmea. No interior dos ovos estão os juvenis de primeiro estágio, também conhecidos como J1. Estes sofrerão a primeira ecdise, originando juvenis de segundo estágio, ou J2, que abandonarão os ovos, migrando para o solo a procura da raiz de um hospedeiro e, constituindo assim, o estágio infectante (REZENDE & FILHO, 2011).

Os fitonematoides do gênero *Meloidogyne* causam, na maioria das vezes, engrossamento das raízes infectadas, recebendo a denominação de nematoide-das-galhas. Isso se deve a hipertrofia e hiperplasia celular no cilindro vascular e no parênquima cortical, provocados pela própria planta como resposta as toxinas introduzidas por este nematoide para a formação do sítio de alimentação (AMORIM, et al., 2011).

O gênero *Meloidogyne* abriga mais de 90 espécies, das quais das quais 17 podem atacar as raízes do cafeeiro. *M. exigua* é a espécie mais predominante e disseminada em todos os estados produtores do país, seguida por *M. incognita* e *M. paranaensis*. Em 1980, no estado do Paraná, populações obtidas de cafeeiro, embora identificadas como *M. incognita*, receberam dos pesquisadores o nome de “biótipo IAPAR” por apresentarem discrepâncias frente aos padrões específicos. Alguns anos depois descobriu que se tratava de uma espécie distinta, que foi descrita como *M. paranaensis* (FERRAZ et al., 2016). A espécie causa danos, sobretudo, na raiz principal, provocando rachaduras, descortiçamentos e quebras. As plantas apresentam ainda clorose, queda de folhas, redução do crescimento e muitas vezes são levadas a morte. Além de se tratar de uma espécie agressiva, de alta persistência no solo e com grande número de hospedeiros, a grande constatação de ocorrência no estado de Minas Gerais preocupa os cafeicultores (SALGADO et al., 2011).

3.3 Controle biológico e *Bacillus subtilis*

Erradicar os fitonematoides de uma lavoura é praticamente impossível e seu manejo é dificultado devido ao fato de se encontrarem abaixo do solo (DIAS et al., 2010). Portanto, o uso de apenas uma medida de controle se faz ineficiente, devendo-se utilizar o manejo integrado, com práticas que evitem a introdução e disseminação dos fitonematoides na área produtiva. Dentre as medidas de controle, como uso de mudas idôneas, áreas isentas, rotação de culturas e uso de nematicidas, tem-se ainda o controle biológico, que é uma alternativa inteligente e sustentável no manejo de nematoides parasitas de plantas (ASMUS et al., 2011).

O principal objetivo do biocontrole é reduzir a população do patógeno para manter o equilíbrio do agrossistema, através de práticas agrícolas e interação entre hospedeiro/patógeno/antagonista (BETTIOL et al., 1991). Segundo a definição de Baker & Cook (1983), controle biológico é a redução da densidade de inóculo ou das atividades determinantes da doença provocada por um patógeno, realizada por um ou mais organismos que não o homem. Os agentes biológicos podem atuar através de antibiose, competição, parasitismo, predação, hipovirulência e indução de defesa na planta hospedeira, podendo apresentar mais de um mecanismo de interação (BETTIOL et al., 1991).

Os microrganismos mais comumente utilizados no controle de fitonematoides são fungos e bactérias. As bactérias estão associadas a cinco mecanismos de interação antagonista: parasitismo, predação, antibiose, competição e indução de defesa (BETTIOL et al., 1991). O gênero *Bacillus* é composto por mais de 145 espécies (GORDON, 1981), as quais demonstram grande variabilidade entre si (HUNGER & CLAUS, 1981). A principal característica dessa família é a produção de endósporos circulares, ovalados (elipsoides) ou cilíndricos, que são estruturas com alto índice de refração quando expostas à luz, formadas no interior da célula bacteriana e que confere extrema resistência a agressões exógenas, podendo permanecer intacto por milhões de anos e, portanto, muito importante para a sobrevivência das populações da bactéria (MELO et al., 2021). Além desta, a gama de características fisiológicas das espécies do gênero é extensa, havendo bactérias que possuem a capacidade de degradar a maioria dos substratos derivados tanto de plantas quanto de animais, isso inclui a celulose, amido, proteínas, ágar, hidrocarbonetos e outros. Temos espécies produtoras de antibióticos, heterotróficas nitrificantes, desnitrificantes, fixadoras de nitrogênio, precipitadoras de íons de ferro, capazes de oxidar o selênio, espécies oxidantes e redutoras do manganês, quimiolitotróficas facultativas, alcalófilas,

psicrófilas, termófilas e outras (CLAUS & BERKELEY, 1986).

B. subtilis é a espécie mais investigada e utilizada no controle biológico de nematoides parasitas de plantas (NPP) (TIAN et al., 2007). Trata-se de uma rizobactéria, ou seja, habitante natural do solo que se associa benéficamente com as raízes das plantas (FILHO et al., 2010). Porém, estas bactérias podem ocupar nichos ecológicos distintos em associação com plantas, estabelecendo-se na rizosfera, rizoplano, filoplano e nos tecidos internos, onde se multiplicam, sobrevivem e se protegem da ação antagonística do restante da microflora autóctone (CAMPOS SILVA et al., 2008). De forma resumida, as condições desfavoráveis do ambiente levam a bactéria a entrar em estado de letargia, crescimento lento ou fase estacionária. Assim, as células ensaiam respostas adaptativas, que vão desde o desenvolvimento de motilidade ou competência para a transformação genética por DNA exógeno, e até mesmo a produção de antibióticos ou de enzimas degradativas extracelulares (FILHO et al., 2010). Além disso, o gênero *Bacillus* sintetiza mais de 60 tipos de antibióticos além de diversos polipeptídios (MACHADO et al., 2012). Apresenta múltiplos mecanismos de interação antagonista, possuindo capacidade de colonizar as raízes das plantas e produzir compostos tóxicos aos fitonematoides, além da ação de controle por parasitismo e competição e, em alguns casos, a ação de beneficiar a planta, sendo denominadas rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCPs).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção dos ovos de *M. paranaensis*

Os nematoides foram oriundos de cinco vasos cultivados com café e inoculados com *M. Paranaensis* (Figura 1), obtidos da estação de pesquisa da EPAMIG (Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais), localizada nas dependências do campus da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

As raízes destas plantas foram lavadas, a fim de remover as impurezas, e cortadas em frações de cerca de 1,0 cm. As frações foram trituradas por 40 segundos em liquidificador de 600 W de potência com solução de água e hipoclorito de sódio à 0,5%. A suspensão obtida foi lavada com água corrente e filtrada em duas peneiras, uma de 200 Mesh e outra de 500 Mesh dispostas uma sobre a outra, respectivamente (Figura 2). O material retido na peneira de 500 Mesh foi coletado com ajuda de pisseta contendo água. Com o intuito de conseguir a quantidade de ovos ideal para infestação do solo, foi feita a quantificação

utilizando câmara de Peters em microscópio óptico (MACHADO et al., 2019).

Figura 1- Galhas presentes nas plantas utilizadas para extração.



Foto: Regiane A. Belizario (2021).

Figura 2- Extração dos ovos de nematoides.



Foto: Regiane A. Belizario (2021).

4.2 Obtenção dos isolados de *B. subtilis*

Três frascos contendo suspensão de isolados de *Bacillus subtilis* (isolado 09, isolado 15 e isolado

09+15) foram fornecidos pela empresa AgroCp[®], sediada na cidade de Três Pontas-MG. Os frascos foram armazenados sob refrigeração até o momento da inoculação nas plantas.

Figura 3- Isolados das bactérias de *B. subtilis*.



Foto: Regiane A. Belizario (2021).

4.3 Experimento *in vitro*

4.3.1 Obtenção dos metabólitos de *B. subtilis*

Para realização dos testes de eclosão dos ovos, motilidade e mortalidade dos J2s *in vitro*, foram utilizados metabólitos dos isolados de *B. subtilis*, os quais foram obtidos segundo metodologia modificada de Pinho (2011) e Junior et al. (2009). As suspensões dos isolados bacterianos foram centrifugadas a 4000 rpm por 20 min, protegidas da luz, em frascos envoltos com papel alumínio e armazenados em refrigerador com variação de temperatura entre a 1 e 3°C por 24h. Logo após, foi realizada a segunda centrifugação, e o sobrenadante pipetado cuidadosamente e transferido para outros frascos sendo novamente armazenados sob refrigeração até o momento do uso.

Figura 4- Obtenção dos metabólitos dos isolados de *B. subtilis*.

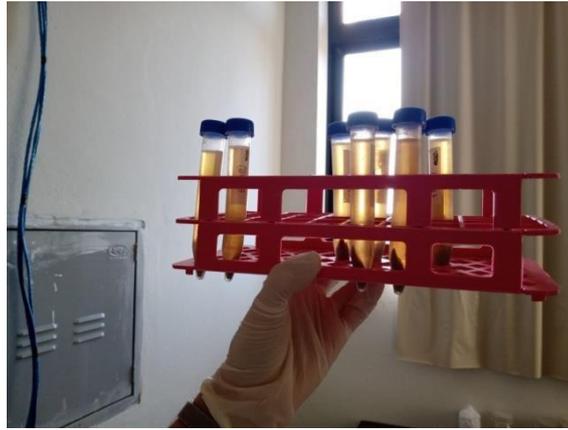


Foto: Regiane A. Belizario (2022).

Para as avaliações de eclosão, motilidade e mortalidade, foram utilizadas cinco concentrações dos metabólitos: 0%, 15%, 30%, 45% e 60%.

4.3.2 Teste de eclosão

Para o teste de eclosão, os ovos foram desinfestados de acordo com metodologia modificada descrita por Brzeski & Zuckerman (1965). Para isso, a suspensão de ovos foi adicionada a microtubos de 2 mL e centrifugados a 10.000 rpm por 5 min com a finalidade de concentrá-los. Logo após, o sobrenadante foi retirado com ajuda de pipeta e adicionado 1 mL da clorexidina, homogeneizando e deixando agir por 15 min. Depois foi centrifugado novamente por 5 min, com a mesma rotação, retirando o sobrenadante e adicionando-se 1 mL de água destilada autoclavada e deixando descansar por mais 10 min. Esse procedimento foi repetido por mais duas vezes, utilizando-se 2 mL de água destilada e autoclavada na segunda vez e, transferindo o volume de todos os microtubos para tubo cônico (15 mL) esterilizado. Foram pipetados 100 μ L da suspensão de ovos limpos em 9,9 mL de água destilada e autoclavada, preenchendo-se a câmara de Peters para quantificação do número de ovos/mL.

O teste foi constituído por treze tratamentos, sendo o T1 apenas os ovos e água destilada e autoclavada, de T2 a T5 o isolado 09 nas concentrações de 15%, 30%, 45% e 60%, de T6 a T9 o isolado 15 nas concentrações de 15%, 30%, 45% e 60% e, do T10 ao T13 o isolado 09 + 15 nas concentrações de 15%, 30%, 45% e 60% (Tabela 1). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) e foram feitas sete repetições para cada tratamento. De acordo com a metodologia modificada de Ferreira (2015) e Alves et al. (2020) foi definida a quantidade de 1.000 ovos/mL.

Tabela 1- Descrição dos tratamentos in vitro

TRATAMENTO	COMPOSIÇÃO
T1	H ₂ O + ovos
T2	09 a 15% + ovos
T3	09 a 30% + ovos
T4	09 a 45% + ovos
T5	09 a 60% + ovos
T6	15 a 15% + ovos
T7	15 a 30% + ovos
T8	15 a 45% +ovos
T9	15 a 60% + ovos
T10	09+15 a 15% +ovos
T11	09+15 a 30% +ovos
T12	09+15 a 45% +ovos
T13	09+15 a 60% +ovos

Fonte: Regiane A. Belizario (2022)

Os tubos foram mantidos em B.O.D. a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 10 dias. Posteriormente, foi realizada a contagem vertendo o conteúdo dos tubos em placa de Petri de 35 mm e, em microscópio invertido Letiz Labovert[®], foi quantificado o número de J2 eclodidos. O cálculo da concentração que inibiu 50% da eclosão (IC50) foi realizado.

4.3.3 Teste de motilidade e mortalidade

Para a realização do teste de motilidade e mortalidade foi utilizada câmara de eclosão e adaptação do funil de Baermann, com a suspensão de ovos de *M. paranaensis*. Para a montagem da câmara foi utilizada Caixa Gerbox, sendo instalado em seu interior um suporte tendo como base dois copos plásticos descartáveis filtro de papel número 103 entre eles. Sob o filtro foi adicionada a solução de ovos e, em seguida, a câmara foi transferida para B.O.D. à 26°C . Foram coletados os J2 recém eclodidos a cada 24h, reservando-os sob refrigeração em câmara fria (entre 7 e 10°C).

Figura 5- Câmara de eclosão.



Foto: Regiane A. Belizario (2022)

Cerca de 100 J2s recém eclodidos foram adicionados a microtubos de 1,5 mL, seguindo os mesmos tratamentos utilizados no teste de eclosão (Tabela 1), de acordo com metodologia de Naves et al. (2004). Após 72 horas, realizou-se a quantificação dos J2 móveis, imóveis, vivos e mortos. Para esta avaliação, pipetou-se 100 μ L do conteúdo de cada microtubo em placa de Elisa levando ao microscópio invertido. Primeiramente foi observada a quantidade de J2 no poço, quantificando o número de imóveis e móveis. Logo após, foi preparada solução de hidróxido de sódio (NaOH) diluindo 0,6 g do NaOH em 15 mL de água destilada, conforme Chen & Dickson (2000). Dessa solução, 20 μ L foram adicionados em cada poço, um por vez, de forma cuidadosa na base do poço, observando durante 5 min os J2 que estavam imóveis, para quantificar os que esboçaram algum movimento com a adição de NaOH. Assim, aqueles antes quantificados como imóveis e que após a adição de NaOH esboçaram movimento, foram quantificados como vivos e, os restantes como mortos. A concentração dos isolados (09, 15 e 09+15) capazes de reduzir 50% da motilidade e mortalidade de J2 de *M. paranaensis* (IC50) foi determinada.

4.4 Experimento *in vivo*

4.4.1 Obtenção e cultivo das mudas

O experimento foi conduzido em casa de vegetação no período de outubro de 2021 a maio de 2022, no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, localizado no Departamento de

Agricultura (DAG) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), na cidade de Lavras-MG (21°14'43'' S e 44°59'59'' W).

Inicialmente, realizou-se a correção do solo com carbonato de cálcio e magnésio, em seguida misturado com areia na proporção de 2:1.

Mudas de cafeeiro cultivar Catuaí Vermelho IAC 99 (*Coffea arabica*) utilizadas no experimento foram adquiridas na região de Nepomuceno-MG (21°13'5'' S e 45°10'50'' W).

Em seguida, as raízes foram lavadas e podadas (aproximadamente 2 cm), a fim de se observar a sanidade e evitar enovelamento, bifurcações e tortuosidades na raiz principal, também chamado de “pião torto”. Posteriormente foi feito o transplante das mudas para vasos de 1,7 L contendo o solo já corrigido. Após cinco dias, com o estabelecimento das mudas, cada vaso recebeu 1,32 g de Basacote® Mini6M (adubo de liberação lenta).

As plantas foram mantidas em casa de vegetação sob irrigação por sistema de gotejamento utilizando temporizador de irrigação automático, o qual foi programado para irrigar em média 5 a 10 min, em diferentes períodos do dia e de acordo com a necessidade das plantas.

Figura 6- Cultivo das mudas de café em casa de vegetação.



Foto: Regiane A. Belizario (2021).

O experimento foi composto por cinco tratamentos. Os controles sem inoculação dos isolados de *B. subtilis*, um mantendo as plantas de café na ausência de *M. paranaensis* (T1), e no outro as plantas foram cultivadas em solo infestado com *M. paranaensis* (T2).

Nos tratamentos em que os isolados de *B. subtilis* foram inoculados, as plantas de café foram cultivadas em solo infestado com ovos de *M. paranaensis*. Esses tratamentos foram: inoculação do isolado 09 (T3), isolado 15 (T4) e mistura dos dois isolados 09+15 (T5). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) contendo 10 repetições em cada tratamento.

Tabela 2- Descrição dos tratamentos in vivo

TRATAMENTO	COMPOSIÇÃO
T1	Plantas não infectadas e não inoculadas
T2	Plantas apenas infectadas por <i>M. paranaensis</i>
T3	Plantas infectadas e inoculadas com o isolado 09
T4	Plantas infectadas e inoculadas com o isolado 15
T5	Plantas infectadas e inoculadas com a mistura dos isolados

Fonte: Regiane A. Belizario (2022)

4.5 Infestação do solo com ovos de *M. paranaensis*

Para garantir que a planta fosse infectada pelo fitonematoide, definiu-se a necessidade de adicionar 3 ovos por cm³ de solo. Assim, 5.100 ovos foram adicionados por vaso (vaso de 1,7 L). Somente foram adicionados ovos nos vasos correspondentes aos tratamentos T2, T3, T4 e T5. Para a introdução dos ovos no solo, a suspensão com os ovos foi constantemente homogêneo e adicionada ao solo em três pequenos orifícios de aproximadamente 3 cm de profundidade formados no entorno do caule da planta. Logo após, estes orifícios foram fechados.

Figura 7- Inoculação dos ovos de nematoide.



Foto: Regiane A. Belizario (2021).

4.6 Inoculação dos isolados de *B. subtilis*

Aos 15 dias após a introdução dos ovos de *M. paranaensis* no solo, foi realizada a inoculação dos isolados de *B. subtilis*. O volume de 5 mL da suspensão de cada isolado de *B. subtilis* foi pipetado e adicionado ao béquer, sendo acoplado o borrifador. Em seguida, a suspensão foi borrifada de forma uniforme no solo ao redor de cada planta, com exceção daquelas pertencentes aos controles (T1 e T2). Para cada tratamento utilizou-se borrifadores e ponteiros diferentes para evitar contaminação.

4.7 Avaliação do crescimento das plantas

Para esta avaliação, aos 185 dias após o transplante (DAT) as plantas foram submetidas a aferições de número de ramos, comprimento da raiz, índice de clorofila e massa fresca das raízes, folhas e ramos ao final do experimento.

O índice de clorofila *a*, clorofila *b* e clorofila total, foram obtidos por método não destrutivo mediante utilização do clorofilômetro clorofiLOG Falker® CFL1030. Para tanto, as leituras foram realizadas no par de folhas do terço médio da planta, fazendo-se seis medições, três em cada folha, nas extremidades das mesmas.

Também foi realizado o corte da parte aérea pesando separadamente folhas e ramos que foram adicionadas em sacos de papel identificados e levadas à estufa com circulação forçada de ar a 70°C até atingirem peso constante, sendo avaliados a massa fresca e massa seca das folhas e ramos. Enquanto as raízes foram lavadas em água parada e em seguida tiveram sua massa fresca e seu comprimento aferidos.

4.8 Número de Ovos

Após a extração dos ovos, em microscópio óptico usando câmara de Peters foi realizada a quantificação do número de ovos por planta. A quantificação foi realizada seguindo a metodologia de Machado et al. (2019), em que se diluiu 1 mL da suspensão de ovos em 9 mL de água, pipetou-se 2 mL, completando o volume da câmara de Peters e, dentro da região quadriculada da câmara foi realizada a contagem dos ovos. Ao final, a quantidade de ovos por planta pôde ser obtida através da multiplicação do número de ovos em 1 mL pelo volume total da suspensão de ovos obtida da extração das raízes.

4.9 Análises estatísticas

A análise de variância foi realizada para verificar a existência de efeito da concentração dos metabólitos dos isolados de *B. subtilis* (09, 15 e 09+15) sobre a eclosão dos ovos, mortalidade e motilidade dos J2 de *M. paranaensis*. Foram ajustados modelos de regressão para avaliar a influência das concentrações dos metabólitos dos isolados de *B. subtilis* (09, 15 e 09+15) sobre essas variáveis.

Os dados de IC50, número de ramos, número de ovos por planta, clorofila *a*, clorofila *b* e clorofila total, comprimento da raiz, massa fresca de folhas e de ramos e massa fresca de raiz foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

5. RESULTADOS

5.1 Crescimento das plantas

Não houve diferença significativa ($p = 0,57$) no número de ramos em plantas que receberam os isolados de *B. subtilis* quando comparadas com o controle e com aquelas que tinham apenas a presença do nematoide. De igual forma, não ocorreu diferença significativa ($p = 0,17$) no comprimento da raiz quando comparada as plantas tratadas e não tratadas com a bactéria, bem como aquelas não inoculadas (Tabela 2).

Tabela 3- Média do número de ramos e comprimento da raiz por tratamento

Tratamento	Número de ramos	Comprimento da raiz (cm)
T1	5,5000 a	22,7500 a
T2	4,7778 a	20,3000 a
T3	5,4444 a	21,7778 a
T4	5,0000 a	21,6500 a
T5	5,7778 a	22,7778 a

Médias seguidas de mesma letra minúscula, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Não foram observadas diferenças significativas ($p = 0,19$ e $p = 0,34$, respectivamente) entre os tratamentos para as massas frescas de folhas e de ramos. Diferença significativa ($p = 0,014$) entre os tratamentos foi verificada para a massa fresca de raízes. Porém, não foi observada diferença entre as plantas que receberam o isolado de *B. subtilis* e plantas sem a presença de *M. paranaensis*, tendo resultados semelhantes. Já o controle com nematoide diferiu-se significativamente em relação ao controle sem o nematoide (Tabela 3).

Tabela 4 - Média da massa fresca das raízes, folhas e ramos por tratamento.

Tratamento	Massa fresca das folhas (g)	Massa fresca dos ramos (g)	Massa fresca das raízes (g)
T1	45,4286 a	14,8571 a	37,8000 a
T2	30,0000 a	9,6667 a	24,4444 b
T3	38,0000 a	13,6667 a	29,6000 ab
T4	36,5714 a	14,2857 a	29,1111 ab
T5	34,5714 a	12,0000 a	27,5556 ab

Médias seguidas de mesma letra minúscula, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

5.2 Número de ovos por planta

Não houve diferença significativa no número de ovos por planta em plantas inoculadas com os isolados de *B. subtilis* em relação à aquelas que foram inoculadas somente com onematoide ou aquelas não inoculadas (Tabela 4, $p=0,22$).

Tabela 5 - Média do número de ovos por planta.

Tratamento	Número de ovos por planta
T2	1725,250 a
T3	1258,222 a
T4	987,250 a
T5	1199,400 a

Médias seguidas de mesma letra minúscula, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

5.3 Índice de clorofila

Diferença significativa ($p = 0,0155$) foi encontrada apenas para o índice de clorofila *a*. Plantas inoculadas com os isolados 09 ou 15, assim como o controle na ausência do nematoide, obtiveram maior índice de clorofila *a* em relação ao controle com nematoidee sem aplicação da bactéria. Já para os índices de clorofila *b* e clorofila total, não houve diferença significativa ($p = 0,2883$ e $p = 0,1757$, respectivamente) entre os tratamentos (Tabela 5).

Tabela 6 - Média dos índices de clorofila a, b e total por tratamento.

Tratamento	Clorofila <i>a</i>	Clorofila <i>b</i>	Clorofila total
T1	386,1000 a	322,1778 a	702,7222 a
T2	343,4333 b	235,1667 a	578,6167 a
T3	391,5857 a	354,8857 a	746,4857 a
T4	383,6222 a	329,3222 a	712,9444 a
T5	379,8444 ab	326,8111 a	706,6556 a

Médias seguidas de mesma letra minúscula, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

5.4 Eclosão, Mortalidade e Motilidade

Não houve diferença significativa ($p = 0,15$) entre os valores de IC50 para a eclosão, sendo que a inibição de 50% da eclosão foi obtida, aproximadamente, na contração de 1,8314% de metabólitos para os dois isolados e para a sua mistura. Para os valores de IC50 no teste de mortalidade, houve diferença significativa ($p = 0,0021$) entre os dois isolados e sua mistura, com o isolado 09 e o isolado 15 causando a mortalidade de 50% dos J2 com menor concentração de metabólitos do que a mistura dos isolados (09+15). Houve diferença significativa ($p = 0,001$) entre os dois isolados e sua mistura para os

valores de IC50 no teste de motilidade. O isolado 15 foi aquele que apresentou menor concentração necessária para inibir a motilidade em 50% dos J2 de *M. paranaensis* (Tabela 6).

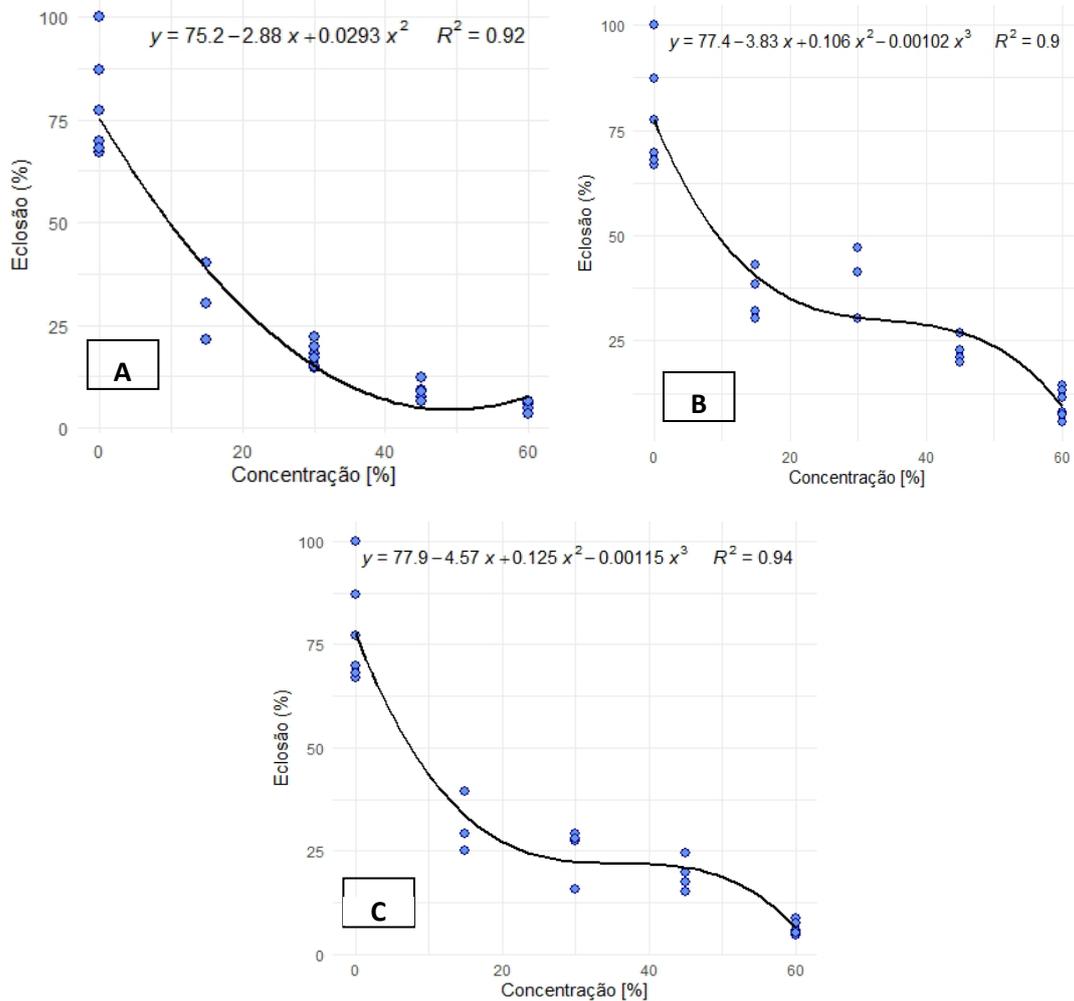
Tabela 7 - Valores de IC50 dos isolados de *B. subtilis* para eclosão dos ovos e motilidade e mortalidade dos J2s de *M. paranaensis*.

Isolado	Eclosão	Mortalidade	Motilidade
I15	1,9859 a	3,1589 b	2,7575 b
I09+15	1,8967 a	3,2123 b	1,8330 c
I09	1,6116 a	3,4683 a	3,1902 a

Médias seguidas de mesma letra minúscula, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. IC50 = concentração que inibiu 50% da eclosão, ou concentração capaz de reduzir 50% da motilidade e mortalidade dos J2s de *M. paranaensis*.

Modelos de regressão para os isolados de *B. subtilis* (09, 15 e 09+15) foram ajustados para verificar o efeito do aumento na concentração dos metabólitos destes isolados na eclosão dos ovos de *M. paranaensis*. Para o isolado 09, o modelo que melhor se ajustou foi o quadrático com R^2 de 0,92, reduzindo a eclosão dos ovos conforme aumentou a concentração dos metabólitos. Para o isolado 15 e a mistura dos dois isolados (09+15), o modelo que melhor se ajustou foi o cúbico ($R^2= 0,9$ e $R^2= 0,94$, respectivamente), também apresentando redução na eclosão dos ovos conforme aumentou a concentração dos metabólitos, porém, nas concentrações entre 15% e 30% a porcentagem de eclosão se manteve, voltando a apresentar queda na eclosão a partir da concentração de 45% dos metabólitos (Figura 8).

Figura 8 - Modelos de regressão apresentando o efeito da concentração dos metabólitos dos isolados de *B. subtilis* (09, 15 e 09+15) na eclosão dos ovos de *M. paranaensis*.



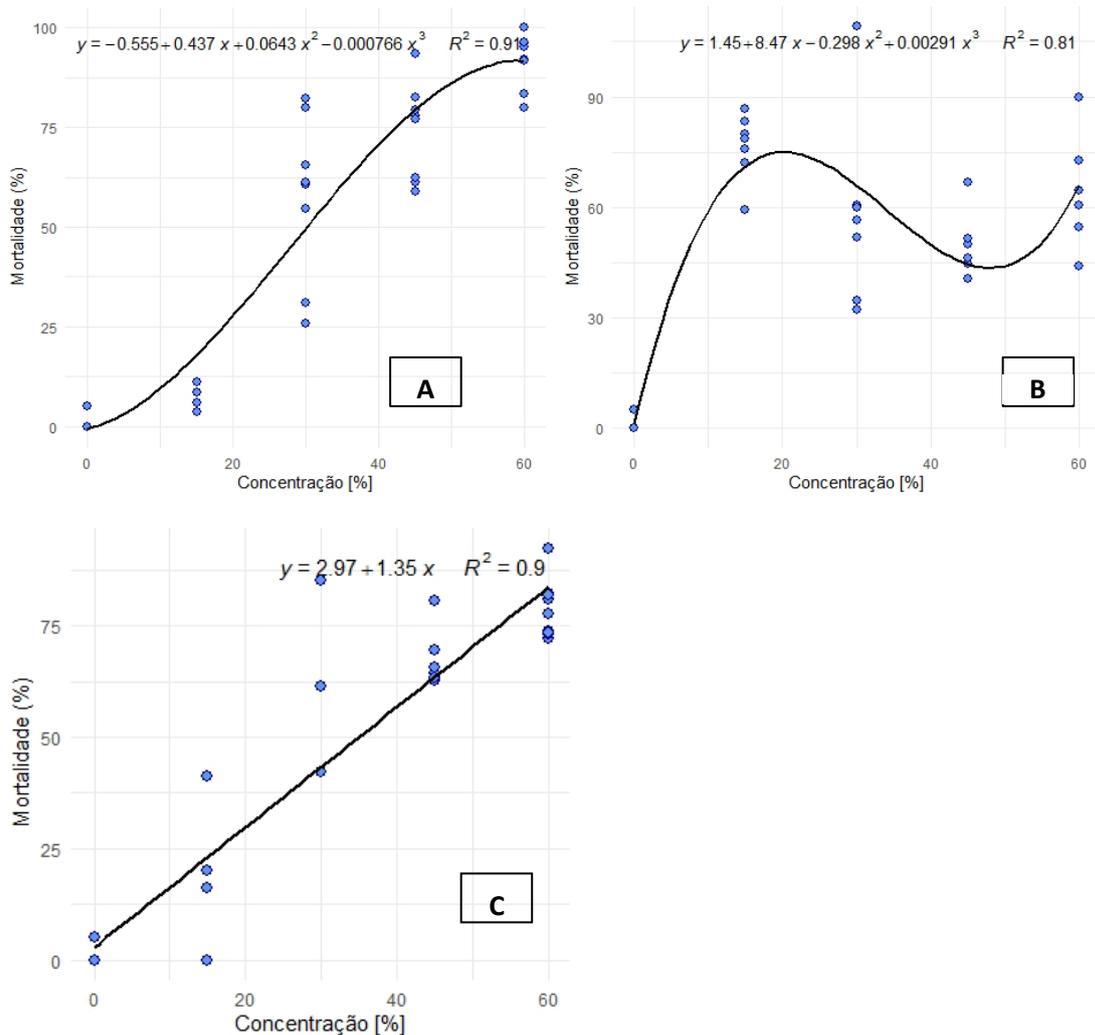
Isolado 09 (A), isolado 15 (B) e isolado 09+15 (C).

Modelos de regressão para os isolados de *B. subtilis* (09, 15 e 09+15) foram ajustados para verificar o efeito do aumento na concentração dos metabólitos destes isolados na mortalidade e motilidade dos J2s de *M. paranaensis*.

Em relação a mortalidade, o modelo que melhor se ajustou para os dois isolados foi o quadrático com $R^2=0,91$ para o isolado 09, $R^2=0,81$ para o isolado 15. Enquanto para a mistura dos dois isolados (09+15), o modelo que melhor se ajustou foi o linear com

$R^2=0,9$. Nos três tratamentos houve aumento da mortalidade dos J2s conforme aumentou a concentração dos metabólitos. Para o isolado 15 notou-se que nas concentrações entre 15% e 30% a porcentagem de mortalidade se manteve, voltando a apresentar aumento a partir da concentração de 60% dos metabólitos (Figura 9).

Figura 9- Modelos de regressão apresentando o efeito da concentração dos metabólitos dos isolados de *B. subtilis* (09, 15 e 09+15) na mortalidade dos J2 de *M. paranaensis*.

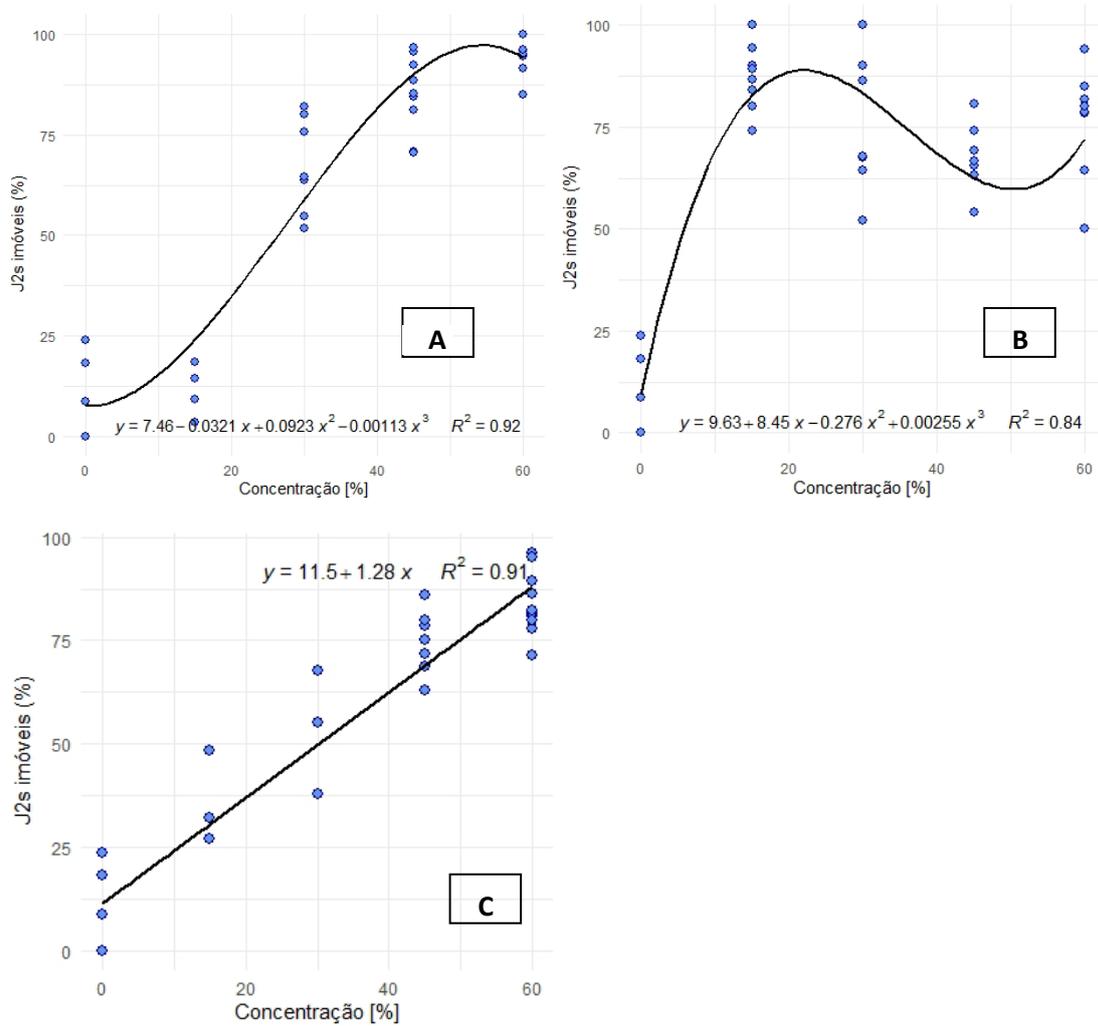


Isolado 09 (A), isolado 15 (B) e isolado 09+15 (C).

Já na motilidade, o modelo que melhor se ajustou para o isolado 09 e o isolado 15 foi o cúbico ($R^2=0,92$ e $R^2=0,84$, respectivamente). Para a mistura dos isolados 09+15, o modelo que melhor se ajustou foi o linear, $R^2=0,91$. Verifica-se que na medida em que se aumenta a concentração dos metabólitos aumenta também a porcentagem de J2 imóveis. O isolado 15 apresentou leve queda na porcentagem de J2 imóveis nas concentrações dos metabólitos entre 30% e 45%, voltando a aumentar a porcentagem de

J2 imóveis a partir da concentração de 60% de metabólitos (Figura 10).

Figura 10 - Modelos de regressão apresentando o efeito da concentração dos metabólitos dos isolados de *B. subtilis* (09, 15 e 09+15) na motilidade dos J2 de *M. paranaensis*.



Isolado 09 (A), isolado 15 (B) e isolado 09+15 (C)

6. DISCUSSÃO

O uso de *B. subtilis* não apresentou efeito na redução do número de ovos por planta de cafeeiro, demonstrando não ter afetado a reprodução de *M. paranaensis*, o que pode estar relacionado à aplicação dos isolados de *B. subtilis* ter sido feita apenas uma vez. Fatores como período da aplicação da bactéria, assim como número de aplicações e forma de aplicação podem afetar a eficiência dos isolados de *B. subtilis* no controle de *Meloidogyne* spp. Lima et al. (2018) observaram que o parcelamento da aplicação de Quartzo[®] foi mais eficiente na redução do número de nematoides em raízes de cafeeiro do que em dosagens únicas.

Os tratamentos com isolados de *B. subtilis* não apresentaram incremento no crescimento da parte aérea das plantas de cafeeiro, com resultado diferente. Higaki & Araújo (2010) observaram que o tratamento de sementes de algodoeiro com *B. subtilis* proporcionou melhor crescimento das plantas em solo infectado por *Meloidogyne* spp.. Burkett-Cadena (2008) também observou maior crescimento em plantas de café cultivar IAPAR Mundo Novo 376-4, em que tiveram ataque mais severo de nematoides do gênero *Meloidogyne*, porém apresentaram maior crescimento em altura decorrente da aplicação de ingredientes ativos do gênero *Bacillus* spp.

A aplicação dos isolados de *B. subtilis* em plantas de cafeeiro neste trabalho auxiliou na manutenção de massa fresca de raízes, observando-se resultado semelhante às plantas cultivadas na ausência de *M. paranaensis*. Com resultado semelhante a este, Fernandes et al. (2022) constataram que houve maior volume radicular em plantas tratadas com nematicida Quartzo[®] +Rugby 200[®] com diferença significativa em relação as plantas não tratadas. Esse efeito das bactérias no crescimento das plantas pode ser consequência do aumento da fixação de nitrogênio, síntese de fitormônios, melhora na absorção de nutrientes e melhorias das condições do solo (Manjula & Podile, 2005).

Em solo infestado com *M. paranaensis* foram observados maiores teores de clorofila *a* nas plantas de cafeeiro que receberam aplicação dos isolados de *B. subtilis* em relação às plantas de café sem aplicação. De maneira parecida, Rodrigues (2020), constatou que a aplicação de Abamectina[®] e Quartzo[®], B53, B18 e B266 proporcionaram estabilidade de fotoassimilados nas folhas, mesmos com alta carga de frutos nas plantas em solo infectado por *Meloidogyne* spp e *Pratylenchus* spp. Esses resultados sugerem que o tratamento com os isolados de *B. subtilis* reduziu os danos causados pelo *M. paranaensis* na atividade fotossintética.

Os isolados de *B. subtilis* testados neste trabalho demonstraram a capacidade de inibir a eclosão dos ovos, reduzir a motilidade e causar mortalidade de J2 de *M. paranaensis* de forma dependente da concentração. Esse efeito pode ser explicado pela antibiose, através de produção de compostos tóxicos, mecanismo de antagonismo observado para *B. subtilis* (BETTIOL, 1991).

7. CONCLUSÕES

Os metabólitos obtidos dos isolados 09, 15 e 09+15 de bactérias da espécie *Bacillus subtilis* apresentaram propriedade nematicida e antagonista pelos testes realizados *in vitro*. Os isolados não foram eficientes na redução da população de *M. paranaensis* na forma em que estes foram aplicados nos testes *in vivo*. Contudo, novos estudos são necessários a definição da melhor forma de aplicação dos isolados.

8. REFERENCIAS

Acompanhamento da Safra Brasileira- Café. Safra 2021 – 4º Levantamento. **Companhia Nacional de Abastecimento**, 2021. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cafe/boletim-da-safra-de-cafe>>. Acesso em: 20 de fev. de 2022.

Acompanhamento da Safra Brasileira- Café. Safra 2022 – 1º Levantamento. **Companhia Nacional de Abastecimento**, 2022. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cafe/boletim-da-safra-de-cafe>>. Acesso em: 20 de fev. de 2022.

AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. Manual de fitopatologia Volume 1: Princípios e Conceitos. 2011.

ASMUS, G. L. et al. Manejo de nematoides. 2011.

BETTIOL, W. Controle biológico de doenças de plantas. **Embrapa Meio Ambiente- Livro científico (ALICE)**, 1991.

BRZESKI, M. W.; ZUCKERMAN, B. M. Methods for the study of plant parasitic nematodes in gnotobiotic root culture. *Nematologica*, v. 11, n. 4, p. 453-466, 1965.

BURKETT-CADENA, M. et al. Supressividade de nematóides de galhas mediados por rizobactérias. *Controle biológico*, v. 47, n. 1, pág. 55-59, 2008.

CAMPOS SILVA, J.R.; SOUZA, R.M.; ZACARONE, A.B.; SILVA, L.H.C.P.; CASTRO, A.M.S. Bactérias endofíticas no controle e inibição in vitro de *Pseudomonas syringae* pv. tomato, agente da pinta bacteriana do tomateiro. *Ciência e Agrotecnologia*, v.32, p.1062-1072, 2008.

CARVALHO, V. L. de; CUNHA, R. L. da; SILVA, N. R. N. Alternativas de controle de doenças do cafeeiro. 2012.

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

CLAUS, D.R., BERKELEY, C.W. The genus *Bacillus*. SNEATH, P.H.A. (Eds.). (1986). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. v. 2. Baltimore: Williams and Wilkins

DE PINHO, R. S. C.. Efeito de metabólitos bacterianos em diferentes estádios de *Meloidogyne incognita*.

DIAS, W. P. et al. Nematóides em soja: identificação e controle. 2010.

FERNANDES, A. L. T. et al. Utilização de nematicidas nodesenvolvimento de mudas de café após o transplantio.

FERRAZ, A. Cultura do café. **Instituto Formação**, v. 2, 2013.

FERRAZ, L. C. C. B.; BROWN, D. J. F. Nematologia de plantas: fundamentos e importância. **Manaus: Norma Editora**, v. 1, 2016.

FERREIRA, R. Junior. Espécies de *Bacillus* no controle de *Meloidogyne incognita* e *Meloidogyne javanica* in vitro e na cana-de-açúcar. 2015.

GORDON, R. E. (1981). One hundred and seven years of the genus *Bacillus*. *The Aerobic Endospore Forming Bacteria*, 9-45.

HIGAKI, W. A. ARAUJO, F. F. 2010. Parasitismo de nematoides em cultivares de algodoeiro em função do tratamento de sementes com *Bacillus subtilis*. in XV

ENAPI, P. Prudente. encontro de ensino pesquisa e extensão. Presidente Prudente: Unoeste 1:1059- 1059.

HUNGER, W.; CLAUS, D. (1981). Taxonomic studies on *Bacillus megaterium* and on agarolytic *Bacillus* strains. The aerobic endospore-forming bacteria: classification and identification, 217-239.

LIMA, I. de M.; COSTA, N. S.; ARPINI, B. S. Controle de *Meloidogyne exigua* em cafeeiro arábica com uso de nematicida biológico Quartzo. 2018.

MACHADO, A. C. Z.; SILVA, A. S.; FERRAZ, L. C. C. B. Métodos em nematologia agrícola. **Piracicaba: Sociedade Brasileira de Nematologia**, 2019.

MACHADO, V. et al. Bactérias como agentes de controle biológico de fitonematóides. **Oecologia Australis**, v. 16, n. 2, p. 165-182, 2012.

MANJULA, K.; PODILE, A. R. (2005). Increase in seedling emergence and dry weight of pigeon pea in the field with chitin-supplemented formulations of *Bacillus subtilis* AF 1. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 21(6), 1057-1062.

NAVES, R. L.; CAMPOS, V. P.; SOUZA, R. M. Filtrados de culturas bacterianas endofíticas na motilidade, mortalidade e eclosão de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne javanica*. *Fitopatologia Brasileira*, v. 29, p. 384-388, 2004.

População Mundial Chegará a 8 Bilhões em Novembro de 2022. **Nações Unidas Brasil**, 2022. Disponível em: <https://brasil.un.org/pt-br/189756-populacao-mundial-chegara-8-bilhoes-em-novembro-de-2022>. Acesso em: 20 de julho de 2022.

REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. Manual de Fitopatologia, vol. 1, princípios e Conceitos. 2011.

RODRIGUES, L. da S. Manejo de fitonematoides na cultura do cafeeiro com *Bacillus* spp. em Monte Carmelo-MG. 2020.

SAKIYAMA, N. S. et al. Café arábica do plantio à colheita. **Viçosa: Editora UFV**, p. 129, 2015.

SALGADO, S. M. de L.; CARNEIRO, R. M. D. G.; PINHO, R. S. C. de. Aspectos técnicos dos nematoides parasitas do cafeeiro. **EPAMIG, Belo Horizonte**, 2011.

