



**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM OLERICULTURA**

**UTILIZAÇÃO DE NEMATICIDAS BIOLÓGICOS PARA O
CONTROLE DE NEMATOIDE DE GALHAS NA
CULTURA DA ALFACE**

ADELINO CARDOSO DE PAULA FILHO

MORRINHOS – GOIÁS
2022

ADELINO CARDOSO DE PAULA FILHO

**UTILIZAÇÃO DE NEMATICIDAS BIOLÓGICOS PARA O CONTROLE DE
NEMATOIDE DE GALHAS NA CULTURA DA ALFACE**

Orientador: Prof: Dr. RODRIGO VIEIRA DA SILVA

Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM OLERICULTURA, no Programa de Pós-Graduação em Olericultura do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Morrinhos - Área de Concentração Olericultura.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/IF Goiano Campus Morrinhos

P324u Paula Filho, Adelino Cardoso de.

Utilização de nematicidas biológicos para o controle de nematoide de galhas na cultura da alface. / Adelino Cardoso de Paula Filho. – Morrinhos, GO: IF Goiano, 2022.

52 f. : il. color.

Orientador: Dr. Rodrigo Vieira da Silva

Dissertação (mestrado) – Instituto Federal Goiano Campus Morrinhos, Programa de Pós-Graduação Mestrado Profissional em Olericultura, 2022.

1. Alface. 2. Pragas agrícolas - Controle biológico. 3. Meloidogyne incognita. I. Silva, Rodrigo Vieira da. II. Instituto Federal Goiano. III. Título.

CDU 635.52

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR PRODUÇÕES TÉCNICO-CIENTÍFICAS NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DO IF GOIANO

Com base no disposto na Lei Federal nº 9.610, de 19 de fevereiro de 1998, AUTORIZO o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano a disponibilizar gratuitamente o documento em formato digital no Repositório Institucional do IF Goiano (RIIF Goiano), sem ressarcimento de direitos autorais, conforme permissão assinada abaixo, para fins de leitura, download e impressão, a título de divulgação da produção técnico-científica no IF Goiano.

IDENTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA

- Tese (doutorado)
 Dissertação (mestrado)
Monografia (especialização)
TCC (graduação)

- Artigo científico
Capítulo de livro
Livro
Trabalho apresentado em evento

Produto técnico e educacional - Tipo:

Nome completo do autor: *Adelino Cardoso de Paula Filho* Matrícula: *2019104330410012*

Título do trabalho: *Utilização de nematocidas biológicos para o controle de nematoide de galhos na cultura da alface*

RESTRICÇÕES DE ACESSO AO DOCUMENTO

Documento confidencial: Não Sim, justifique:

Informe a data que poderá ser disponibilizado no RIIIF Goiano: *20/05/2022*

O documento está sujeito a registro de patente? Sim Não

O documento pode vir a ser publicado como livro? Sim Não

DECLARAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO NÃO-EXCLUSIVA

O(a) referido(a) autor(a) declara:

- Que o documento é seu trabalho original, detém os direitos autorais da produção técnico-científica e não infringe os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade;
- Que obteve autorização de quaisquer materiais inclusos no documento do qual não detém os direitos de autoria, para conceder ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano os direitos requeridos e que este material cujos direitos autorais são de terceiros, estão claramente identificados e reconhecidos no texto ou conteúdo do documento entregue;
- Que cumpriu quaisquer obrigações exigidas por contrato ou acordo, caso o documento entregue seja baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano.

Porto Franco MA *06/05/2022*
Local Data

Adelino Cardoso de Paula Filho
Assinatura do autor e/ou detentor dos direitos autorais

Ciente e de acordo:

RODRIGO VIEIRA DA SILVA:02950589600 Assinado de forma digital por RODRIGO VIEIRA DA SILVA:02950589600
DN: c=BR, o=ICP-Brasil, ou=AC SOLUTI Multipla v5, ou=09461647000195, ou=Videoconferencia, ou=Certificado PF A3, cn=RODRIGO VIEIRA DA SILVA:02950589600
Data: 2022.05.09 18:30:34 -0300
Versão do Adobe Acrobat Reader: 2022.001.20117

Assinatura do(a) orientador(a)

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM OLERICULTURA

UTILIZAÇÃO DE NEMATICIDAS BIOLÓGICOS PARA O CONTROLE DE NEMATOIDE DE GALHAS NA CULTURA DA ALFACE

Autor: Adelino Cardoso de Paula Filho
Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Vieira da Silva

TITULAÇÃO: Mestre em Olericultura - Área de Concentração em Manejo
Fitossanitário em Olerícolas.

Aprovada em 15 de Junho de 2021.

.....
Prof. Dr. Rodrigo Vieira da Silva
Presidente da Banca

.....
Prof. Dr. Cícero José da Silva
Avaliador interno
Instituto Federal Goiano - Campus Morrinhos

.....
Prof. Dr. Leonardo de Castro Santos
Avaliador externo
Instituto Federal Goiano - Campus Iporá

Documento assinado eletronicamente por:

- Cicero Jose da Silva, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO, em 15/07/2021 16:28:40. Leonardo de Castro Santos, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO, em 15/07/2021 14:20:29. Rodrigo Vieira da Silva, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO, em 15/07/2021 13:21:45.

Este documento foi emitido pelo SUAP em 07/07/2021. Para comprovar sua autenticidade, faça a leitura do QRCode ao lado ou acesse <https://suap.ifgoiano.edu.br/autenticar-documento/> e forneça os dados abaixo:

Código Verificador: 288207
Código de Autenticação: 808a9f5345



AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder uma vida abençoada, me dar calma, saúde, gratidão, alegria, além de proporcionar-me tranquilidade, força e sabedoria nos momentos turbulentos e de dificuldades enfrentados nesta caminhada, permitindo a realização deste meu trabalho.

À minha família. Meus pais, Adelino Cardoso (*in memoriam*) e Divina Eterna. Aos meus irmãos, Claudio, Jubia, Elizia e Gracielle. Amo todos vocês e sempre os terei em minhas lembranças.

Ao meu orientador, professor Dr. Rodrigo, pela confiança, acolhimento, exemplo de superação, conselhos e ensinamentos. Sua orientação foi decisiva para que eu pudesse realizar este trabalho, realizando apontamentos e sugestões necessárias para o desenvolvimento desta pesquisa, que se resume também na realização de um sonho.

Aos Professores do Instituto Federal Goiano – Campus Morrinhos e demais Instituições parceiras deste programa de Mestrado, na pessoa da Coordenadora do Programa de Pós-Graduação, professora Dr^a. Clarice Aparecida Megguer, meus cumprimentos e agradecimento pelos ensinamentos e dedicação com a formação de novos pesquisadores.

A minha filha, Ana Esther, que é presente com o qual Deus nos agraciou, sendo a melhor realização de nossas vidas.

A minha esposa Josiane, pela força, determinação, apoio e zelo com a nossa filha. Companheira em absolutamente todos os percursos de nossa jornada. Pelo suporte sempre presente em forma de apoio, carinho, conselhos, paciência, dedicação, esforços incansáveis, compartilhados nos bons e maus momentos e por seu amor incondicional. Obrigado por fazer parte da minha vida.

Por fim, agradeço aos membros da banca examinadora pelas contribuições e ensinamentos, e a todos aqueles que de alguma forma me apoiaram e incentivaram nesta jornada de estudos e muito trabalho.

Muito obrigado!

BIOGRAFIA DO AUTOR

Adelino Cardoso de Paula Filho, filho de Divina Eterna de Freitas e Adelino Cardoso de Paula, nascido em 05 de janeiro de 1989, na cidade de Goiatuba, Estado de Goiás. Em Dezembro de 2013 graduou-se em Agronomia pela Fundação de Ensino Superior de Goiatuba-Faculdade de Filosofia e Ciências Humanas de Goiatuba – FESG-FAFICH, atualmente Unicerrado, obtendo o título de Engenheiro Agrônomo. Em março de 2019 iniciou o curso de Mestrado Profissional em Olericultura no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Morrinhos, sob a orientação do professor Dr. Rodrigo Vieira da Silva, que culminou em uma dissertação, defendida em 15 de Junho de 2021.

RESUMO

DE PAULA FILHO, ADELINO CARDOSO. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano - Campus Morrinhos, Julho de 2021. **Utilização de nematicidas biológicos para o controle de nematoide de galhas na cultura da alface.** Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Vieira da Silva.

A alface destaca-se como a hortaliça folhosa mais presente na alimentação dos brasileiros. Dentre os principais fatores que afetam a produtividade da alface, merece atenção especial os nematoides de galhas. A espécie *Meloidogyne incognita* é a mais comum em condições de cultivo tropical, em que o seu parasitismo reduz a absorção de água e nutrientes, comprometendo os processos fisiológicos da cultura. Essa condição resulta em menor desenvolvimento da alface, inviabilizando a qualidade do produto. Neste sentido este trabalho objetivou avaliar a influência de nematicidas biológicos no controle de *M. incognita* na cultura de alface e a sua interferência no desenvolvimento da planta. No capítulo I, em casa de vegetação, as sementes de Alface cultivar Blue seeds BS AC0063 foram tratadas com os seguintes biológicos e as respectivas concentrações: T1: *Bacillus methylotrophicus* a 2,5 - 3,0 - 3,5 - 4,0 - 4,5 mL kg⁻¹ de semente; T2: *B. subtilis* a 1,5 - 2,0 - 2,5 - 3,0 - 3,5 mL kg⁻¹ de semente; T3: *B. amyloliquefaciens* a 3 - 3,5 - 4,0 - 4,5 - 5,0 g kg⁻¹ de semente; T4: *Trichoderma harzianum* 3 - 3,5 - 4,0 - 4,5 - 5,0 g kg⁻¹ de semente; T5: *T. asperellum* a 5 - 5,5 - 6,0 - 6,5 - 7,0 mL kg⁻¹ de semente, e controle. A seguir foram semeadas em bandejas e após 16 dias foram transplantadas em vasos de 3 L, contendo solo + areia + substrato na proporção de 2:1:1, previamente autoclavado (120 °C, 2 h). Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado 5X5 (5 produtos biológicos x 5 concentrações) e seis repetições. No 3º dia após transplante foram inoculados 5.000 ovos de *M. incognita* por planta. No capítulo II, em canteiros onde previamente detectou-se a presença de *M. incognita*, quantificou-se a população inicial, e, posteriormente, realizou-se o tratamento de sementes com os isolados e as concentrações iniciais utilizadas no capítulo I. Utilizou-se delineamento de blocos casualizados, 4 blocos, 6 parcelas por bloco, com unidade experimental de 8 plantas, retirando-se 4 para serem submetidas às avaliações. No 55º dia após a inoculação foram realizadas as avaliações das seguintes variáveis: massa fresca da parte aérea (MFPA), massa fresca da raiz (MFR), comprimento de raiz (C.R), diâmetro do caule (D.C) e fator de reprodução (FR). No ensaio em casa de vegetação os isolados *B. methylotrophicus*, nas concentração 2,5 mL kg⁻¹, melhoraram o desenvolvimento vegetativo da alface, 58,90 e 60,25%, MFPA e C.R,

respectivamente. Já a concentração 4,0 mL kg⁻¹ proporcionou MFR de 44,82% superior aos outros isolados. *B. subtilis* nas concentrações 3,0, 1,5 e 2,5 mL kg⁻¹ apresentou aditamento em MFPA, D.C e C.R de 60,54, 165,90 e 68,65% respectivamente. *B. methylotrophicus* na concentração 4,5 mL kg⁻¹ e *B. subtilis* na concentração 1,5 mL kg⁻¹, reduziram a reprodução de *M. incognita* em 48,44 e 53,98%, respectivamente. No capítulo II, *T. harzianum* promoveu incremento na MFPA em 25,14%, D.C em 195,18%, C.R em 58,91%, massa fresca da raiz - 21,14%, em relação ao controle. *B. amyloliquefaciens* promoveu incremento na MFPA em 25,09%, D.C em 144,57%, C.R em 74,25%, MFR de -7,22%. Houve redução do FR de *M. incognita* nos tratamentos com os isolados *B. amyloliquefaciens* e *T. harzianum* em 37,60 e 28,86%, respectivamente. Com base nos resultados, concluiu-se que *B. methylotrophicus*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* e *T. harzianum* incrementaram o desenvolvimento vegetativo da cultura da alface. *B. methylotrophicus* e *B. subtilis* nas respectivas concentrações 4,5 mL kg⁻¹ e 1,5 mL kg⁻¹, possibilitaram a redução na população de *M. incognita* em alface sob condições de cultivo protegido. *B. amyloliquefaciens* e *T. harzianum* proporcionaram as maiores reduções da reprodução de *M. incognita* em sistema de cultivo de campo.

Palavras-chave: Controle biológico, Bionematicidas, *Meloidogyne incognita*, *Lactuca sativa*.

ABSTRACT

DE PAULA FILHO, ADELINO CARDOSO. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano - Campus Morrinhos, July 2021. **Use of biological nematicides to control root-knot nematodes in lettuce crops.** Advisor: Dr. Rodrigo Vieira da Silva.

Lettuce stands out as the most present leafy vegetable in the Brazilian diet. Among the main factors affecting the productivity of lettuce, the gall nematodes deserve special attention. The species *Meloidogyne incognita* is the most common in tropical growing conditions, in which its parasitism reduces the uptake of water and nutrients and compromises physiological processes of the culture. This condition results in lower lettuce development, making the quality of the product unfeasible. In this sense this work aimed to evaluate the influence of biological nematicides in the control of *M. incognita* in lettuce culture, and its interference in plant development. In chapter I, in the greenhouse, lettuce seeds cultivar Blue seeds BS AC0063 were treated with the following biologicals and their respective concentrations: T1: *Bacillus methylotrophicus* at 2.5 - 3.0 - 3.5 - 4.0 - 4.5 mL kg⁻¹ of seed; T2: *B. subtilis* at 1.5 - 2.0 - 2.5 - 3.0 - 3.5 ml kg⁻¹ of seed; T3: *B. amyloliquefaciens* at 3 - 3.5 - 4.0 - 4.5 - 5.0 g kg⁻¹ of seed; T4: *Trichoderma harzianum* 3 - 3.5 - 4.0 - 4.5 - 5.0 g kg⁻¹ of seed; T5: *T. asperellum* at 5 - 5.5 - 6.0 - 6.5 - 7.0 mL kg⁻¹ of seed, and control. Then they were sown in trays and after 16 days were transplanted into 3 L pots containing soil + sand + substrate in the ratio of 2:1:1, previously autoclaved (120 °C, 2 h). A 5X5 (5 biological products x 5 concentrations) completely randomized design with six repetitions was used. On the 3rd day after transplanting, 5,000 *M. incognita* eggs per plant were inoculated. In chapter II, in beds where the presence of *M. incognita* had been previously detected, the initial population was quantified, and subsequently seed treatment was performed with the isolates and initial concentrations used in chapter I. A randomized block design was used, 4 blocks, 6 plots per block, with an experimental unit of 8 plants, removing 4 to be submitted to the evaluations. On the 55th day after inoculation, the following variables were evaluated: aboveground fresh mass (MFPA), root fresh mass (MFR), root length (C.R), stem diameter (D.C) and reproduction factor (FR). In the greenhouse test, the isolates *B. methylotrophicus* at concentration 2.5 mL kg⁻¹ improved the vegetative development of lettuce, 58.90 and 60.25%, MFPA and C.R, respectively, and at concentration 4.0 mL kg⁻¹ provided MFR of 44.82% higher than the other isolates. *B. subtilis* at concentrations 3.0, 1.5 and 2.5 mL kg⁻¹ showed addition in MFPA, D.C and C.R of 60.54, 165.90 and 68.65%

respectively. *B. methylotrophicus* at concentration 4.5 mL kg⁻¹ and *B. subtilis* at concentration 1.5 mL kg⁻¹, reduced *M. incognita* reproduction by 48.44 and 53.98%, respectively. In chapter II, *T. harzianum* promoted increment in MFPA by 25.14%, D.C by 195.18%, C.R by 58.91%, root fresh mass -21.14%, relative to control. *B. amyloliquefaciens* increased MFPA by 25.09%, D.C by 144.57%, C.R by 74.25%, MFR by -7.22%. There was a reduction in the FR of *M. incognita* in treatments with isolates *B. amyloliquefaciens* and *T. harzianum* by 37.60% and 28.86%, respectively. Based on the results, it was concluded that *B. methylotrophicus*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* and *T. harzianum* enhance the vegetative development of lettuce crop. *B. methylotrophicus* and *B. subtilis* at respective concentrations 4.5 mL kg⁻¹ 1.5 mL kg⁻¹, enable reduction in *M. incognita* population in lettuce under protected cultivation conditions. *B. amyloliquefaciens* and *T. harzianum* provided the greatest reduction in the reproduction of *M. incognita* under field culture system.

Keywords: Biological control, Bionematicides, *Meloidogyne incognita*, *Lactuca sativa*.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Esquema do ciclo de vida de <i>Meloidogyne</i> spp.....	5

3 CAPÍTULO I

Figura 3.1 - Comparação dos tratamentos com os isolados e controle 55 dias após inoculação com 5000 ovos de <i>Meloidogyne incognita</i> . (A) <i>Bacillus amiloliquefaciens</i> , (B) <i>B. subtilis</i> , (C) <i>B. methylotrophicus</i> , (D) <i>Trichoderma harzianum</i> , (E) <i>T. Asperellum</i> . Estreito, Estado do Maranhão (MA), Brasil (2021).....	16
--	----

4 CAPÍTULO II

Figura 4.1 - Raízes de alface 55 dias após transplante exibindo galhas induzidas por <i>Meloidogyne incognita</i> .. Estreito, Estado do Maranhão (MA), Brasil (2021).....	29
--	----

LISTA DE TABELAS

Página

3 CAPÍTULO I

- Tabela 3.1 - Valores médios das variáveis: massa fresca da parte aérea (MFPA), massa fresca da raiz (MFR), diâmetro do caule (D.C) e comprimento das raízes (C.R) de alface 55 dias após a inoculação com 5000 ovos de *Meloidogyne incognita*. Estreito, Estado do Maranhão (MA), Brasil (2021).....18
- Tabela 3.2 - Valores médios das variáveis: número de ovos (NO), fator de reprodução (FR), percentagem de redução de ovos (PRO) nas raízes de alface 55 dias após a inoculação com 5000 ovos de *Meloidogyne incognita*. Estreito, Estado do Maranhão (MA), Brasil (2021).....20

4 CAPÍTULO II

- Tabela 4.1 - Valores médios das variáveis massa fresca da parte aérea (MFPA), diâmetro do caule (D. C.), massa fresca da raiz (MFRA) e comprimento de raiz (C. R.) de alface 55 dias após transplante. Estreito, Estado do Maranhão (MA), Brasil (2021).....30
- Tabela 4.2 - Valores médios das variáveis: número de ovos (NO), fator de reprodução (FR), percentagem de redução de ovos (PRO) nas raízes de alface 55 dias após transplante. Estreito, Estado do Maranhão (MA), Brasil (2021).....32

ÍNDICE

	Página
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Alface: características botânicas e importância econômica.....	3
2.2 Fitonematoides.....	3
2.3 <i>Meloidogyne</i> spp.e sua importância na agricultura.....	4
2.4 Manejo de <i>Meloidogyne</i> spp.	5
2.4.1 Controle biológico.....	6
2.5 Referências.....	8
3. CAPÍTULO I	12
3.1 INTRODUÇÃO.....	14
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	15
3.2.1 Experimento em casa de vegetação.....	15
3.2.2 Preparo do inóculo e inoculação das plantas com <i>M. Incognita</i>	15
3.2.3 Avaliações	16
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
3.4 CONCLUSÕES.....	22
3.5 REFERÊNCIAS.....	22
4. CAPÍTULO II.....	25
4.1 INTRODUÇÃO.....	26
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	28
4.2.1 Experimento em campo	28
4.2.2 Avaliações	28
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
4.4 CONCLUSÕES.....	33
4.5 LITERATURA CITADA	33
5. CONCLUSÃO GERAL	36

1. INTRODUÇÃO GERAL

A alface (*Lactuca sativa* L.) destaca-se como a hortaliça folhosa mais presente na alimentação dos brasileiros. O Brasil possui uma área cultivada com alface de 85.000 ha, gerando uma produção de 1,5 milhão de toneladas por ano (EXAME, 2021). Problemas fisiológicos de desenvolvimento da planta e ocorrência de pragas e doenças tornam-se comuns em condições de monocultivo. Dentre as principais doenças da cultura, os fitonematoides representam um importante fator de redução de produtividade (PINHEIRO, 2017). Danos causados pelos nematoides de galhas, gênero *Meloidogyne*, em cultivares de alface ocorrem com frequência elevada em todo território nacional (FERREIRA *et al.*, 2013). As principais consequências de seu parasitismo são as deformidades anatômicas nas raízes, as famosas galhas, reduzindo a qualidade e quantidade da produção de alface, ocorrendo em muitos casos de inviabilizar o cultivo em determinadas áreas altamente infestadas pelo nematoide (EMBRAPA, 2013).

Para obter sucesso no manejo de nematoides, faz-se necessário utilizar simultaneamente diferentes estratégias de controle, a saber: revolvimento do solo, irrigação após revolvimento, pousio, solarização, inundação, adubação verde, rotação de cultura (CAPRONI *et al.*, 2012). O método tradicional é o uso do controle químico. Todavia, nem sempre o tratamento promove um nível de redução populacional satisfatório, e pode causar danos ambientais, em razão do alto poder residual, podendo permanecer ativo na planta até o final do ciclo e comprometer a qualidade sanitária do produto comercializado. Por todas essas características, a utilização de nematicidas químicos vem sofrendo restrições, de modo que na última década intensificou-se estudos com agentes de controle biológicos.

Os fitonematoides têm uma diversidade de inimigos naturais, a saber: ácaros, fungos, bactérias, nematoides predadores, dentre outros. Entre esses, os fungos e as bactérias têm se destacado como agentes potenciais para o controle biológico (LARRIBA *et al.*, 2014)). Os fungos nematófagos exercem relações antagônicas com nematoides, constituindo várias relações interespecíficas no solo, produzindo diferentes tipos de mecanismos de armadilhas, órgãos especializados no parasitismo (HUSSAIN; ZOUHAR; RYSANEK, 2017). Pesquisas relacionadas à supressão de *Meloidogyne* com a utilização de bactérias também aumentou

expressivamente nos últimos anos. Os estudos com as rizobactérias vêm apresentando resultados significativos e positivos, principalmente aqueles realizados com *Bacillus* spp. e *Pseudomonas* spp. (ZHOU *et al.*, 2016). Estas bactérias produzem substâncias, a exemplo das proteases, responsáveis pela degradação da cutícula do nematoide, confirmando a ação nematicida por *Bacillus* spp. (NIU *et al.*, 2006).

Visando o desenvolvimento de um manejo mais sustentável, o controle biológico contribui para a redução dos danos provocados pelos nematoides de maneira mais equilibrada. Bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* são analisadas constantemente em tomateiro por promover a supressão de *Meloidogyne* spp., além de contribuir para o aumento da produção da planta. Um dos modos de ação que reduz a reprodução do nematoide é a produção de endotoxinas por *B. subtilis* (CARVALHO, 2017).

A utilização de produtos à base de microrganismos vem aumentando cada dia mais. Porém, ainda na cultura da alface existem poucos trabalhos com a utilização de biológicos para o controle de nematoides de galhas, especialmente em condições naturais de campo. Em razão das inúmeras vantagens da utilização do controle biológico em relação ao controle químico, estudos dessa natureza são necessários (SOARES, 2006).

Diante da necessidade de aumentar a produtividade da cultura da alface, é indispensável melhorar o manejo de fitonematoides de modo que é preciso realizar pesquisas, buscando métodos com eficiência e com baixa toxicidade para o controle deste fitonematoides. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo a busca de agentes biológicos para selecionar novas estratégias de controle para um manejo mais sustentável de nematoides de galhas na cultura da alface.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Alface: características botânicas e importância econômica

A alface (*Lactuca sativa* L.) é uma planta da família Asteraceae, considerada a principal hortaliça folhosa na alimentação do brasileiro, o que assegura a essa cultura uma relevante importância econômica (CARVALHO *et al.*, 2005).

Mota *et al.* (2012) ressalta em seu trabalho a importância nutricional da cultura da alface, em razão de ser fonte de vitaminas e de sais minerais, de ter baixo teor de calorias e de ser de fácil digestão, além de ser recomendada para dietas alimentares ricas em fibras. O Brasil possui uma área cultivada com alface de 85.000 ha, gerando uma produção de 1,5 milhão de t ano⁻¹. O cultivo é mais importante nas regiões Sul e Sudeste, onde se destacam os estados de São Paulo (137.000 t), Paraná (53.972 t) e Minas gerais (17.756 t). Já a região Nordeste participa com 38.953 t, produzidas em 11.559 propriedades, das quais 1.414 no estado do Maranhão, gerando 2.286 t provenientes principalmente de pequenas propriedades rurais, nas quais predomina a mão de obra familiar (IBGE, 2019).

No cultivo da alface a temperatura se destaca por ser um fator de extrema importância, uma vez que a planta se desenvolve preferencialmente na faixa de 18 a 25 °C. Temperaturas acima de 30 °C causam decréscimo na produtividade (VIEIRA *et al.*, 1999). Apesar de ser uma cultura típica de clima tropical, a alface é cultivada o ano todo no Brasil em virtude do melhoramentos genético, que permite o desenvolvimento de cultivares com tolerância a diversas condições climáticas (VIEIRA *et al.*, 2012).

2.2 Fitonematoides

Os nematoides estão entre os principais patógenos da agricultura mundial em razão dos prejuízos significativos que causam em culturas de importância econômica. Eles danificam o sistema radicular das plantas e os sintomas predominam em áreas delimitadas da lavoura, conhecidas como reboleiras. Nestes locais da área de cultivo as plantas expressam menor porte e ficam mais sensíveis ao estresse hídrico, prejudica o florescimento, provoca o amadurecimento prematuro das folhas, confundido muitas vezes com deficiência nutricional. (LOPES *et al.*, 2017).

As espécies de fitonematoides possuem em seu aparelho bucal um estilete, caracterizando a sua condição de parasita. Ao introduzir o estilete nas raízes das plantas os fitonematoides retiram substâncias nutritivas e, ao mesmo tempo, injetam substâncias tóxicas, induzindo modificações no vegetal que acarretam redução do seu desenvolvimento vegetativo e da sua produção. As plantas, ao sofrer ataques por nematoides, além de enfraquecidas têm seus sistemas radiculares mais suscetíveis a infecções secundárias por bactérias e fungos (CHARCHAR, 1999).

2.3 *Meloidogyne* spp. e sua importância na agricultura

No Brasil, existem dezenas de espécies de fitonematoides e muitas delas estão associadas às hortaliças. Todavia, os fitonematoides pertencentes ao gênero *Meloidogyne* são os mais importantes economicamente no país. As razões são a elevada capacidade reprodutiva, a ampla disseminação e distribuição, além da elevada gama de hospedeiros, que incluem a maioria das plantas cultivadas de valor econômico, com destaque para as hortaliças (OLIVEIRA, 2016).

Em áreas destinadas à produção de hortaliças, os maiores problemas nematológicos são atribuídos aos nematoides de galhas, *Meloidogyne* spp., devido ao grande poder destrutivo e à ampla distribuição geográfica. No Brasil, os maiores danos são provocados pelas espécies *M. incognita* e *M. javanica*, devido à frequência com que ocorrem nas regiões produtoras (ROSA *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2006, PINHEIRO, 2017).

O ciclo de vida do *Meloidogyne* spp. tem início com o ovo e no seu interior é formado o juvenil, a partir do desenvolvimento embrionário denominado juvenil de primeiro estágio (J1). Neste momento o sistema reprodutivo não está formado ainda. O J1 sofre a primeira ecdise no interior do ovo, durante a qual é trocada a cutícula. Posteriormente, ao término da ecdise, é formado o juvenil de segundo estágio (J2), que eclode do ovo perfurando a casca com o seu estilete, estrutura essencial no parasitismo. Este se movimenta no solo à procura da planta hospedeira e, quando a encontra, o nematoide penetra a raiz, estabelece um sítio de alimentação, liberando substâncias produzidas por suas glândulas esofagianas que promovem a formação de células gigantes ao redor deste sítio a hipertrofia das células, seguida da hiperplasia, multiplicação desordenada das células. Paralelamente ocorre a formação das galhas nas raízes, que são sintomas característicos da infecção por nematoides do gênero *Meloidogyne*. Posteriormente, o J2 passa por mais duas ecdises, formando juvenis de terceiro (J3) e quarto (J4) estádios,

respectivamente. Por fim, o J4 sofre sua última ecdise tornando-se adulto macho ou fêmea, com aparelho reprodutor maduro (Figura 1). As fêmeas sedentárias, na forma de uma pera, continuam no interior das raízes, enquanto o macho vermiforme migra para o solo. A duração do ciclo de vida varia de quatro a oito semanas, dependendo das condições ambientais. Em temperaturas superiores a 40 °C e/ou inferiores a 5 °C, a maioria das espécies de nematoides diminui ou paralisa por completo as suas atividades vitais (FERRAZ, 2001; FERRAZ *et al.*, 2010).

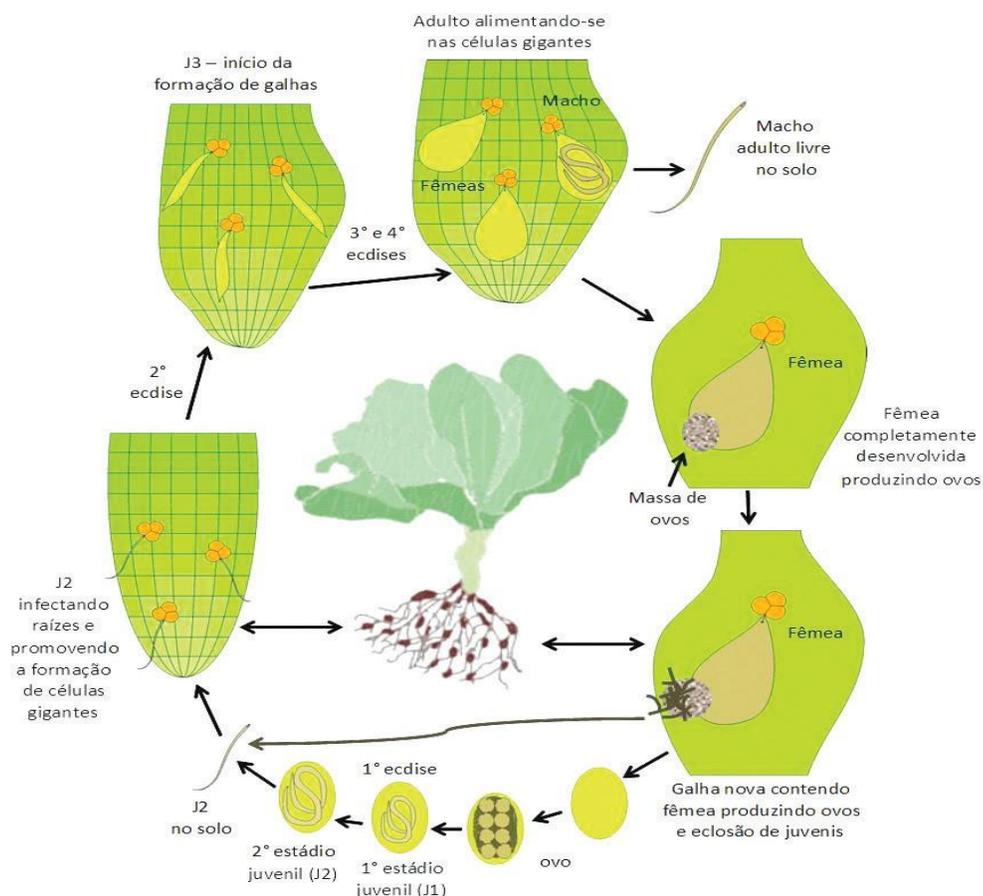


Figura 1. Esquema do ciclo de vida de *Meloidogyne* spp. Fonte: Circular Técnica Embrapa Hortaliças. 2013.

2.4 Manejo de *Meloidogyne* spp.

A eficiência do controle de nematoides depende da integração de diferentes estratégias de manejo: cultivares resistentes, aumento da matéria orgânica, rotação de culturas, controle biológico e controle químico (PINHEIRO *et al.*, 2010).

O controle da umidade em locais que têm altas temperaturas, saturando o solo por um curto período de tempo, reduz a mobilidade no solo tornando os fitonematoides menos

infecciosos (DUTRA; CAMPOS, 2003). O uso de cultivares resistentes sempre é a melhor opção no manejo de doenças, porém não é uma prática fácil devido à necessidade de se ter genótipos disponíveis para serem utilizados e que apresentem características de resistência combinadas com qualidades agronômicas exigidas para comercialização e de adaptação desejáveis (NEVES *et al.*, 2011). Portanto, o método de controle biológico, cultural, a resistência genética e a manipulação de agroquímicos apresentam-se como alternativas importantes para o controle de fitonematoides.

2.4.1 Controle biológico

O controle biológico pode ocorrer de forma natural, envolvendo uma grande quantidade de microrganismos promotores da redução populacional de fitonematoides, ou interventor de hábitos alimentares e redutor de danos ocasionados por estes patógenos em plantas (BAKER; COOK, 1974).

Mais de 200 inimigos naturais de fitonematoides já foram reportados na literatura, tais como nematoides predadores, bactérias, fungos e ácaros, sendo as bactérias e os fungos os que apresentam maior potencial como agentes de controle biológico (STIRLING, 1991).

No processo de colonização da rizosfera das plantas hospedeiras, microrganismos antagonistas produzem secreções e liberam enzimas hidrolíticas que atuam na parede celular do nematoide degradando-a. Durante a competição/predação, ocorre disputa de nutrientes e de espaço pelo antagonista ou ainda os microrganismos se alimentam do conteúdo pseudocelomático do patogênico, inibindo o processo de infecção da planta. (CARVALHO *et al.*, 2014).

As bactérias possuem a capacidade de produzir mais de 60 tipos de antibióticos, além de muitos polipeptídeos e endotoxinas que conferem a capacidade de interferir no ciclo reprodutivo dos nematoides, em caráter especial na oviposição e na eclosão dos juvenis. Há evidências da atuação de *Bacillus* spp. na promoção do crescimento de plantas e da competição por nutrientes, induzindo-a à resistência. (TIAN *et al.*, 2007).

As rizobactérias do gênero *Bacillus* podem transformar exsudatos radiculares em subprodutos, que atuam interferindo no processo de reconhecimento nematoide-planta, sintetizando metabólitos secundários que interferem no ciclo reprodutivo do nematoide (ARAÚJO, 2018). Espécies de *Bacillus* também podem atuar por meio da supressão direta nos nematoides, além de contribuir para o crescimento de plantas, favorecendo a colonização de

antagonistas microbianos e aumentando a atividade na rizosfera.

Para a realização de manejo visando diminuir os prejuízos ocasionados por fitonematoides, os estudos relatam que as bactérias *Bacillus subtilis* promovem ação antagônica às espécies de *Meloidogyne*. Elas atuam no ciclo reprodutivo além de produzir as endotoxinas, promover a redução da oviposição e interferir na eclosão dos J2 (LI *et al.*, 2005). Estudos realizados com isolados de *B. subtilis* apresentam resultados significativos no controle de *M. incognita*, *M. javanica*, *M. hapla* e *M. arenaria*, potencializando seu uso no controle biológico. Há relatos da ação bacteriana na transformação de compostos minerais em orgânicos que estavam indisponíveis, favorecendo o desenvolvimento da planta, além de inibir a ação de patógenos, contribuindo diretamente para um incremento na produção (XIA *et al.*, 2011).

Alguns fungos promovem a degradação de algumas estruturas, tanto de ovos quanto de juvenis, através da liberação de exoenzimas, que penetram ocasionando dissolução enzimática. Fungos podem ser produtores de micotoxinas, que têm sua penetração nos ovos facilitada pela ação das izoenzimas, impedindo a eclosão dos juvenis (MANZANILLA-LÓPEZ *et al.*, 2013). Os fungos do gênero *Trichoderma* spp. produzem metabólitos tóxicos aos nematoides, podendo atuar como parasitas de outros fungos, vivendo em simbiose com plantas. Seus metabólitos exercem efeito na capacidade de penetração, eclosão e mobilidade dos nematoides. Além de produzir enzimas presentes no processo de degradação da parede celular de fitopatógenos, os fungos penetram em cistos e ovos, provocando a morte de juvenis (HARMAN *et al.*, 2004; KHAN; SAXENA, 1997; HJELJORD *et al.*, 2001). Enzimas responsáveis pela degradação da parede celular são produzidas pelo fungo *Trichoderma* quando se desenvolvem em temperaturas favoráveis, em torno de 25 °C. Esse fungo, ao estabelecer sua colonização nos sistemas radiculares da planta, pode auxiliar como um indutor de resistência, favorecendo seu crescimento, e, conseqüentemente, aumentando a produtividade (HARMAN *et al.*, 2004).

De acordo com Ferraz *et al.* (2010), na escolha de organismos para serem utilizados no controle de nematoides, deve-se observar se estes parasitam várias espécies de fitonematoides, se sobrevivem no solo mesmo sofrendo variações, se não promovem danos a animais e a seres humanos, se não ocasionam danos às plantas de interesse econômico e se possuem alto poder de redução populacional de fitonematoides.

2.5 Referências

ARAÚJO, F.V. Novas moléculas e produtos biológicos no manejo de fitonematoides em soja. **Trabalho apresentado no XXXV Congresso Brasileiro de Nematologia**. Bento Gonçalves, RS. Embrapa Brasília, DF. 239. p. 2018.

BAKER, K.F.; COOK, R.J. **Biological control of plant pathogens**. WH Freeman & Company, San Francisco, 1974.

CAPRONI, C. M. SOUZA, A. G.; FERREIRA, S.; FAQUIN, V.; SOUZA, A. A. Resposta às aplicações de Trichoderma, óleo de Nim e Vertimec no controle de nematoide na cultura do morango. **Revista Agrogeoambiental** v. 4, n. 3, 2012.

CARVALHO, P. H. Controle biológico e alternativo de *Meloidogyne incognita* e *M. javanica* em tomateiro. Brasília, DF : **Dissertação**, 98 p. 2017.

CARVALHO, J. E.; ZANELLA, F.; MOTA, J. H.; LIMA, A. L. S. Cobertura morcot do solo no cultivo de alface Cv. Regina 2000, em Ji-Paraná/RO. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n. 5, p. 935-939, 2005.

CARVALHO, D.D.C.; LOBO JUNIOR, M.; MARTINS, I.; INGLIS, P.W.; MELLO, S.C.M Biological control of *Fusarium oxysporum* f.sp. *Phaseoli* by *Trichoderma harzianum* and its use for common bean seed treatment. **Tropical Plant Pathology**, v. 39 n. 5, p. 384-391. 2014.

CHARCHAR, J. M.; HUANG, C. S. Sobrevivência de *Pratylenchus brachyurus* em fragmentos de raízes de capim gordura (*Melinis minutiflora* Beauv.). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 16, n.1, p. 22-25, 1999.

DUTRA, M.R. & CAMPOS, V.P. Efeito do manejo de solo e da irrigação como nova tática de controle de *Meloidogyne incognita* em feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, 608-614. 2003.

EMBRAPA – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Manejo do nematoide-das-galhas (*Meloidogyne* spp.) em cultivos de cenoura na região de Irecê - BA. Brasília: **Circular Técnica**, 77. Embrapa hortaliças, Nov. 2010.

EMBRAPA – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Diagnose e controle alternativo de doenças em tomate, pimentão, cucurbitáceas e Cenoura. Brasília: **Circular Técnica**, 121. Embrapa hortaliças, 2013.

EXAME. **Mercado de alface cresce continuamente no Brasil**. 2021. Disponível em: <https://exame.abril.com.br/negocios/dino/mercado-de-alface-cresce-continuamente-no-brasilshhtml/>. Acesso em: 10 Jun. 2021.

FERRAZ, L. C. C. B. As meloidoginoses da soja: passado, presente e futuro. In. SILVA, J. F. V.; MAZAFFERA, P.; CARNEIRO, R. G.; ASMUS, G. L. & FERRAZ, L. C. C. B. Relações parasito-hospedeiro nas meloidoginoses da soja. Londrina, Embrapa Soja: **Sociedade de**

Nematologia, p.127, 2001.

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

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia** (UFLA), v. 35, p. 1039-1042, 2011.

FERREIRA, S; GOMES, L. A. A; GASPARINO, C. F; CARVALHO FILHO, J. L. S; MALUF, W. R. Caracterização de famílias F2:3 de alface para resistência ao nematoide de galhas. **Revista Agrogeoambiental**, v. 5, p. 35-42, 2013.

HARMAN, G. E.; HOWELL, C. R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* spp. – opportunistic virulent plant symbionts. **Nature Microbiology Reviews**, v.2, p.43–56, 2004.

HJELJORD, L.G.; STENSVAND, A.; TRONSMO, A. Antagonism of nutrientactivated conidia of *Trichoderma harzianum* (atroviride) P1 against *Botrytis cinerea*. **Phytopathology**, v. 91, n. 12, p.1172-1180, 2001.

HUSSAIN, M.; ZOUHAR, M.; RYSANEK, P. Potential of Some Nematophagous Fungi against *Meloidogyne hapla* Infection in Czech Republic. 1 ed. Pakistan. **Zoological Society of Pakistan**, v. 49, P. 35-43, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.17582/journal.pjz/2017.49.1.35.43>

IBGE. **Censo Agropecuário: Brasil, 2019**. Disponível em:< <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp>> . Acesso em: 11 Jan. 2021.

KHAN, T.A.; SAXENA, S.K. Integrated management of root knot nematode *Meloidogyne javanica* infecting tomato using organic materials and *Paecilomyces lilacinus*. **Bioresource Technology**, v. 61, n. 3, p. 247-250. 1997.

LARRIBA, E.; JAIME, M. D.; CARBONELL-CABALLERO, J.; CONESA, A.; DOPAZO, J.; NISLOW, C.; LOPEZ-LLORCA, L. V. Sequencing and functional analysis of the genome of a nematode egg-parasitic fungus, *Pochonia chlamydosporia*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 65, p. 69-80, 2014.

MANZANILLA-LÓPEZ R.H.; ESTEVES, I.; FINETTI-SIALER, M.M.; HIRSCH, P.R.; WARD, E.; DEVONSHIRE, J.; HIDALGO-DÍAZ, L. *Pochonia chlamydosporia*: advances and challenges to improve its performance as a biological control agent of sedentary endo-parasitic nematodes. **Journal of Nematology**, v. 45, p.1–7, 2013.

MOTA, W. F.; PEREIRA, R. D.; SANTOS, G. S.; VIEIRA, J. C. B. **Agronomic and economic viability of intercropping onion and lettuce**. Horticultura Brasileira, Brasília, v. 30, n. 2, p. 349-354, 2012.

NEVES, W.S.; LOPES, E.A.; FERNANDES, R.H.; DALLEMOLE-GIARETTA, R.; PARREIRA, D.F. Nematoides na cultura da cenoura: sintomas, disseminação e principais métodos de controle. **Circular Técnica 133**. Minas Gerais, MG. EPAMIG 2011.

NIU, Q.H.; HUANG, X.W.; ZHANG, L.; YANG, J.K.; ZHANG, K.Q. A neutral protease from *Bacillus nematocida*, another potential virulence factor in the infection against nematodes. **Archives Microbiology**, v. 185, p. 439-448, 2006.

OLIVEIRA, J. O. Levantamento de fitonematoides e caracterização bioquímica de populações de *Meloidogyne* spp. Em áreas cultivadas com hortaliças na região sul do estado de Goiás. Morrinhos, GO. **Dissertação**, p. 49, 2016.

OOSTENBRINK, M. Major characteristics of the relation between nematodes and plants. **Mededeelingen der Landbouw-Hoogeschool**, n.66, p.1- 46, 1966.

Pinheiro J. B. Nematoides em Hortaliças. **Embrapa Hortaliças**, Brasília, DF, p.194. 2017.

PINHEIRO, J.B.; CARVALHO, A.D.F.; VIEIRA, J.V. Manejo do nematoide das galhas (*Meloidogyne* spp.) em cultivos de cenoura na região de Irecê – BA. **Comunicado Técnico 77**. Brasília, DF. Embrapa Hortaliças, 2010.

ROSA, J. M. O.; WESTERICH, J. N.; WILCKEN, S. R. S. Nematoides das galhas em áreas de cultivo de olerícolas no estado de São Paulo. **Nematologia Brasileira**, v. 37, n. 1-2, p. 15-19, 2013.

SILVA, M. G.; SHARMA, R. D.; JUNQUEIRA, A. M. R.; OLIVEIRA, C. M. Efeito da solarização, adubação química e orgânica no controle de nematoides em alface sob cultivo protegido. **Horticultura Brasileira**, v. 24, n.4, p. 489-494. 2006.

SOARES, P. L. M. Estudo do controle biológico de fitonematoides com fungos nematófagos. **Tese (Doutorado em Agronomia: Entomologia Agrícola)**- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, p. 252, 2006.

STIRLING, G.R. Biological control of plant parasitic nematodes. **CABI Publishing, Wallingford, UK**. 282 p. 1991.

TIAN, B.Y.; YANG, J.K.; LIAN, L.H.; WANG, C.Y.; ZHANG, K.Q. Role of neutral protein from *Brevibacillus laterosporus* in pathogenesis of nematode. **Microbiology and biotechnology**, v. 74, n. 2 p. 372-380. 2007.

VIEIRA, J.V.; PESSOA, H.B.S.V.; MAKISHIMA, N. A cultura da cenoura. Embrapa Hortaliças. **Coleção Plantar 43**. Brasília. 77p. 1999.

VIEIRA, J.V.; SILVA, G.O.; CHARCHAR, J.M.; FONSECA, M.E.N.; SILVA, J.B.C.; LANA, M.M.; NASCIMENTO, W.M.; BOITEUX, L.S., PINHEIRO, J.B.; REIS, A.; RESENDE, F.V.; CARVALHO, A.D.F. BRS Planalto: Cultivar de cenoura de polinização aberta para cultivo de verão. **Horticultura Brasileira**, v. 30, 359-363, 2012.

XIA, Y.; XIE, S.; MA, X.; WU, H.; WANG, X.; GAO, X. The *purL* gene of *Bacillus subtilis* is associated with nematicidal activity. **FEMS, Microbiology Letters**, v.322, p. 99-107, 2011.

ZHOU, L.; YUEN, G.; WANG, Y.; WEI, L.; JI, G. Evaluation of bacterial biological control agents for control of root-knot nematode disease on tomato. **Crop Protection**, v.84, n.2, p.8-13, 2016.

3. CAPÍTULO I

(Normas de acordo com a revista Ciência Agronômica)

Utilização de nematicidas biológicos para o controle de *Meloidogyne incognita* na cultura de alface em cultivo protegido

Use of biological nematicides for the control of root-knot nematodes in the lettuce crop in protected cultivation

Resumo: A utilização de nematicidas biológicos apresenta o potencial para o controle de nematoide de galhas na cultura da alface em cultivo protegido. O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência de nematicidas biológicos no controle de *Meloidogyne incognita* na cultura da alface e sua relação com desenvolvimento da cultura. Em condições de casa de vegetação, sementes de Alface cultivar Blue seeds BS AC0063 foram tratadas com os seguintes biológicos e as respectivas concentrações: T1: *Bacillus methylotrophicus* a 2,5 - 3,0 - 3,5 - 4,0 - 4,5 mL kg⁻¹ de semente; T2: *B. subtilis* a 1,5 - 2,0 - 2,5 - 3,0 - 3,5 mL kg⁻¹ de semente; T3: *B. amyloliquefaciens* a 3 - 3,5 - 4,0 - 4,5 - 5,0 g kg⁻¹ de semente; T4: *Trichoderma harzianum* 3 - 3,5 - 4,0 - 4,5 - 5,0 g kg⁻¹ de semente; T5: *T. asperellum* a 5 - 5,5 - 6,0 - 6,5 - 7,0 mL kg⁻¹ de semente, e controle. Após 16 dias do semeio, as mudas de alface foram transplantadas para vasos de 3 L contendo solo + areia + substrato na proporção de 2:1:1, previamente autoclavado (120 °C, 2 h). Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado 5X5 (5 produtos biológicos x 5 concentrações) e seis repetições. No 3º dia após transplante, foram inoculados 5.000 ovos de *M. incognita* por planta. No 55º dia após a inoculação, foram realizadas as avaliações vegetativas e nematológicas. *B. methylotrophicus*, nas concentrações 2,5 mL kg⁻¹, apresentou acréscimo no desenvolvimento vegetativo da alface, 58,90 e 60,25%, massa fresca da parte aérea (MFPA) e comprimento de raiz (C.R), respectivamente. A concentração de 4,0 mL kg⁻¹ resultou massa fresca das raízes (MFR) 44,82% superior ao controle. *B. subtilis* nas concentrações 3,0; 1,5; 2,5 mL kg⁻¹ apresentou MFPA, D.C e C.R de 60,54, 165,90 e 68,65% superior ao controle. *B. methylotrophicus* na concentração 4,5 mL kg⁻¹ e *B. subtilis* na concentração 1,5 mL kg⁻¹ provocaram redução na reprodução de *M. incognita* de 48,44% e 53,98%, respectivamente. Com base nos resultados, concluiu-se que *B. methylotrophicus* e *B. subtilis* incrementam no desenvolvimento vegetativo da cultura da alface, nas respectivas concentrações 4,5 mL kg⁻¹

1,5 mL kg⁻¹, sendo os microrganismos mais eficientes na redução na população de *M. incognita* em alface sob condições de cultivo protegido.

Palavras-chave Controle, nematoide de galhas, Bionematicidas, *Lactuca sativa*, Cultivo Protegido.

Abstract: The use of biological nematicides presents the potential for the control of root-knot nematode in lettuce in protected cultivation. The objective of this work was to evaluate the efficiency of biological nematicides in the control of *Meloidogyne incognita* in the lettuce crop, and its relationship with crop development. Under greenhouse conditions, lettuce seeds cultivar Blue seeds BS AC0063 were treated with the following biological agents and their respective concentrations: T1: *Bacillus methylotrophicus* at 2,5 – 3,0 – 3,5 – 4,0 – 4,5 mL kg⁻¹ of seed; T2: *B. subtilis* at 1,5 – 2,0 – 2,5 – 3,0 – 3,5 ml kg⁻¹ of seed; T3: *B. amyloliquefaciens* at 3 – 3,5 – 4,0 – 4,5 – 5,0 g kg⁻¹ of seed; T4: *Trichoderma harzianum* 3 – 3,5 – 4,0 – 4,5 – 5,0 g kg⁻¹ of seed; T5: *T. asperellum* at 5 – 5,5 – 6,0 – 6,5 – 7,0 mL kg⁻¹ of seed, and control. After 16 days of sowing, the lettuce seedlings were transplanted to 3 L pots containing soil + sand + substrate in the proportion of 2:1:1, previously autoclaved (120 °C, 2 h). A completely randomized design 5X5 (5 biological products x 5 concentrations) and six replications was made. On the 3rd day after transplantation, 5,000 *M. incognita* eggs were inoculated per plant. On the 55th day after inoculation, vegetative and nematological evaluations were performed. *B. methylotrophicus* at concentrations of 2.5 mL kg⁻¹ showed an increase in the vegetative development of lettuce, 58.90 and 60.25%, shoot fresh mass (MFPA) and root length (C.R), respectively. The concentration of 4.0 mL kg⁻¹ resulted in root fresh mass (MFR) 44.82% higher than the control. *B. subtilis* at concentrations 3.0; 1.5; 2.5 mL kg⁻¹ showed MFPA, D.C and C.R of 60.54, 165.90 and 68.65% higher than the control. *B. methylotrophicus* at a concentration of 4.5 mL kg⁻¹ and *B. subtilis* at a concentration of 1.5 mL kg⁻¹ caused a reduction in the reproduction of *M. incognita* of 48.44% and 53.98%, respectively. Based on the results, it can be concluded that *B. methylotrophicus* and *B. subtilis* increase the vegetative development of the lettuce crop, in the respective concentrations 4.5 mL kg⁻¹ 1.5 mL kg⁻¹, being the microorganisms more efficient in reducing in the population of *M. incognita* on lettuce under protected cultivation conditions.

Key-words Control, root-knot nematode, Bionematicides, *Lactuca sativa*, Protected cultivation.

3.1 INTRODUÇÃO

Cultivos em ambientes protegidos são considerados essenciais por permitirem o aumento da produtividade das plantas, especialmente a alface, que apresenta decréscimo quando se utiliza métodos convencionais, pois são muito suscetíveis às adversidades climáticas (VIDA *et al.*, 2004). A alface é uma das hortaliças mais consumidas no mundo, possuindo alta qualidade nutricional por ser rica em vitaminas, minerais e fibras, comumente consumida *in natura* juntamente com outras hortaliças na forma de salada (VELASCO *et al.*, 2014). Diversas doenças podem afetar a qualidade e a produtividade em um cultivo de alface, com destaque para os fitonematoides (PINHEIRO *et al.*, 2013). Para manejar com sucesso este patógeno faz-se necessário a combinação de alguns métodos de controle para redução da população em nível abaixo do nível de dano econômico. As espécies de nematoides mais importantes na cultura da alface são *M. incognita* e *M. javanica*. A cada ano que passa a sociedade vem priorizando produtos mais saudáveis, produzidos com mínimo de danos ambientais, de modo que diversas pesquisas têm sido direcionadas para incentivar estratégias de controle de doenças de plantas que causem menos efeitos negativos ao meio ambiente (DIAS *et al.*, 2010).

Uma de várias formas de manejo estudadas é o uso do controle biológico, baseado na estratégia da utilização de um inimigo natural. Referindo-se a fitonematoides, o controle se dá principalmente pelo uso de fungos e bactérias (AGRIOS, 2005).

A utilização de *Trichoderma* spp. para controle de fitonematoides é bastante promissora e vem demonstrando eficiência em diferentes espécies de nematoides (SHARON *et al.*, 2007). Alguns trabalhos mencionam o potencial do *Trichoderma* spp. no controle biológico de fitonematoides, destacando as interações as quais atribuem a este microrganismo a capacidade de colonizar a massa de ovos gelatinosa formada por espécies de *Meloidogyne* spp. (SHARON *et al.*, 2007).

A utilização de rizobactérias apresenta-se como uma alternativa eficiente e viável no controle biológico de nematoides. Vale salientar que esta é uma estratégia ecologicamente sustentável e possui baixo risco de impacto ambiental quando comparada a outros métodos de controle utilizados na supressão de fitonematoides no solo (VAZ, 2011).

A proteção de plantas a fitonematoides com o emprego de *Bacillus* spp. ocorre em função da combinação de diversos mecanismos de ação na região da rizosfera, a saber: competição por espaço e nutrientes, antagonismo, parasitismo, antibiose, produção de enzimas e contribuição com indução de resistência da planta hospedeira. (VAZ, 2011).

Diante da necessidade de reduzir as perdas e conseguir alta produtividade na cultura da alface, faz-se necessário melhorar a manejo fitossanitário realizado na cultura, principalmente, em relação aos fitonematoides. Desse modo o manejo biológico apresenta o potencial de contribuir para a redução dos danos causados pelos nematoides no cultivo desta hortaliça.

Portanto, o presente trabalho objetivou selecionar nematicidas biológicos para o controle de *Meloidogyne incognita* em área de cultivo protegido, relacionando com crescimento vegetativo da cultura da alface.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Experimento em casa de vegetação

O experimento foi conduzido nas dependências do Instituto de Tecnologia Avançada UniBTA - Campus Luan Aguiar, município de Estreito-MA. Em casa de vegetação as sementes de alface cultivar Blue seeds BS AC0063 foram tratadas com os isolados de microrganismos, nas respectivas concentrações: T1: *Bacillus methylotrophicus* a 2,5 - 3,0 - 3,5 - 4,0 - 4,5 mL kg⁻¹ de semente; T2: *B. subtilis* a 1,5 - 2,0 - 2,5 - 3,0 - 3,5 mL kg⁻¹ de semente; T3: *B. amyloliquefaciens* a 3 - 3,5 - 4,0 - 4,5 - 5,0 g kg⁻¹ de semente; T4: *Trichoderma harzianum* 3 - 3,5 - 4,0 - 4,5 - 5,0 g kg⁻¹ de semente; T5: *T. asperellum* a 5 - 5,5 - 6,0 - 6,5 - 7,0 mL kg⁻¹ de semente, e controle. Mudanças de alface, 16 dias após o semeio, foram transplantadas para vasos de 3 L contendo solo + areia + substrato na proporção de 2:1:1, previamente autoclavado (120 °C, 2 h). Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado 5X5 (5 produtos biológicos x 5 concentrações) e seis repetições, com unidade experimental de 1 planta por vaso. No 3º dia após transplante, foram inoculados 5.000 ovos e eventuais juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita* por planta.

3.2.2 Preparo do inóculo e inoculação das plantas com *M. incognita*

A extração dos ovos do nematoide foi realizada segundo o método de Bonetti e Ferraz (1981). As raízes foram picadas em pedaços de 1 a 2 cm e trituradas em liquidificador na menor rotação com solução de hipoclorito de sódio, a 0,5% por 20 segundos. Em seguida, a suspensão resultante foi submetida a um conjunto de peneiras de 200 mesh e de 500 mesh. A suspensão aquosa retida na peneira de 500 mesh foi recolhida e a contagem e calibração do inóculo foi realizada em microscópio fotônico no aumento de 100 X, com o auxílio de uma lâmina de Peter. A inoculação foi efetuada colocando-se 5 ml da suspensão de inóculo

em 4 orifícios equidistantes do caule da planta com 3,0 cm de profundidade .

3.2.3 Avaliações

Após 55 dias da inoculação das plantas de alface com *M. Incognita* realizou-se as avaliações. As raízes foram colhidas e lavadas sob água corrente. Em seguida elas foram separadas da parte aérea e foram medidas as massas da matéria fresca (Figura 1).

As avaliações da parte aérea foram realizadas aferindo-se as seguintes variáveis: Massa fresca da parte aérea (MFPA), (g), e massa fresca da raiz (MFRA), (g), em balança analítica digital com duas casas decimais. O comprimento de raiz (C.R.) foi medido da distância da base do corte no caule até a parte apical da raiz, com auxílio de uma régua graduada expressa em (cm); O diâmetro do caule (D.C) foi obtido com auxílio de paquímetro digital expresso em (cm), e as médias foram submetidas à análise de variância e comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico Sisvar (FERREIRA 2011).

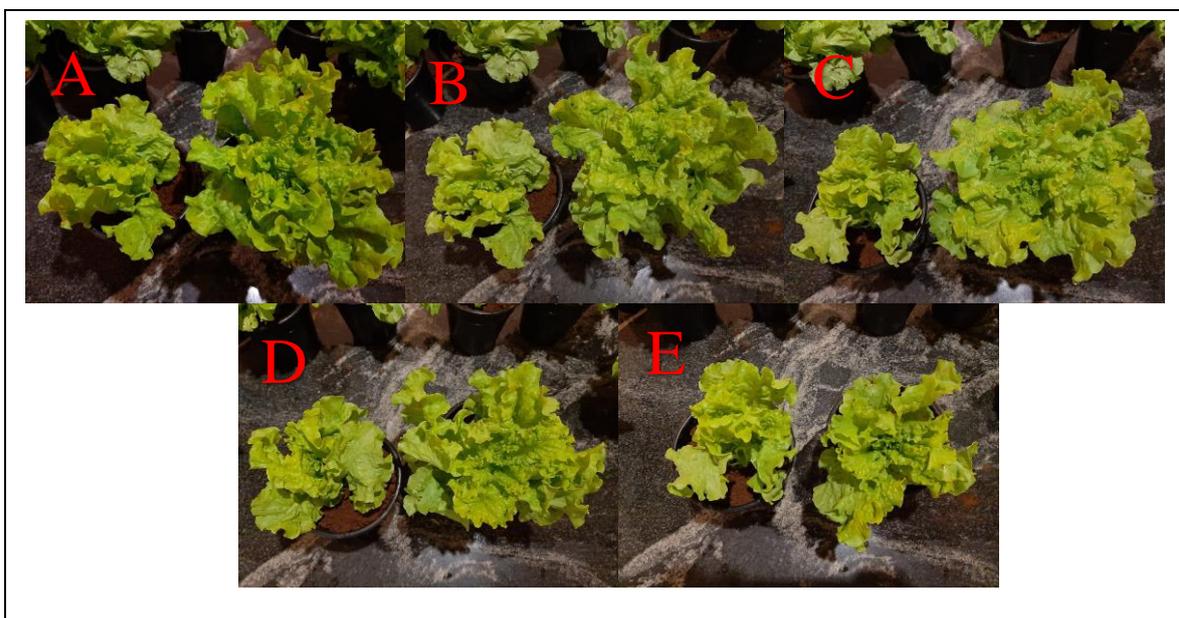


Figura 3.1: Comparação dos tratamentos com os isolados e controle 55 dias após inoculação com 5000 ovos de *Meloidogyne incognita*. (A) *Bacillus amiloliquefaciens*, (B) *B. subtilis*, (C) *B. methylotrophicus*, (D) *Trichoderma harzianum*, (E) *T. Asperellum*.

Posteriormente, a extração dos ovos do nematoide foi realizada segundo o método de Bonetti e Ferraz (1981). A determinação do número final de ovos e eventuais juvenis foi efetuada com auxílio da lâmina de Peter, sob microscópio fotônico no aumento de 100 X. Esse número final (população final) foi usado no cálculo do fator de reprodução (FR) que é

a população final do nematoide (Pf) / população inicial - número de ovos e eventuais juvenis utilizados na inoculação do nematoide (Pi), (OOSTENBRINK, 1966). Os resultados obtidos de Pf e FR foram transformados em $\sqrt{x+0,5}$, o que é recomendado para dados quantitativos; posteriormente eles foram submetidos à análise de variância, e as médias comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico Sisvar (FERREIRA 2011).

3.3 RESULTADO E DISCUSSÃO

No presente estudo, houve diferenças significativas ($P \leq 0,05$) em função das concentrações de nematicidas biológicos aplicados no tratamento de sementes da cultura da alface, analisando massa fresca da parte aérea, massa fresca da raiz, diâmetro do caule e comprimento de raiz.

Os isolados *B. subtilis* na concentração de 3,0 mL kg⁻¹ e *B. methylotrophicus* 2,5 ml kg⁻¹, resultaram em um aumento no desenvolvimento da MFPA da alface em relação ao controle de 60,64 e 58,90%, , respectivamente. Os isolados *B. amyloliquefaciens*, *T. harzianum* ambos na concentração 5,0 g kg⁻¹ e *T. asperellum* 6,5 mL kg⁻¹ apresentaram resultados positivos na MFPA em relação ao controle de 49,81%, 44,93% e 36,98%, respectivamente (Tabela 3.1). Resultado similar foi observado por Segato *et al.* (2016), avaliando a eficiência do uso de *B. subtilis*, em que este proporcionou maior desenvolvimento da MFPA em 154%, em relação ao controle em plantas de alface, apresentando eficiência também no controle de *Meloidogyne* spp. Em outro estudo, Araújo & Marchesi (2009) observaram que *B. subtilis* aumentou em 28,48% a biomassa da parte aérea e reduziu a reprodução de nematoides de galhas em raiz de tomate. Alcebíades *et al.* (2019), em ensaio com *B. methylotrophicus*, ao avaliar a MFPA em soja utilizando nematicidas biológicos para o manejo de *M. Javanica* não encontraram diferenças entre os tratamentos. Todavia, os mesmos autores observaram que os biológicos *B. methylotrophicus* e *B. subtilis* proporcionaram aumento da MFPA nas concentrações analisadas, evidenciando sua eficiência no manejo de *M. incognita* em alface conforme verifica-se na (Tabela 3.1).

Tabela 3.1. Valores médios das variáveis: massa fresca da parte aérea (MFPA), massa fresca da raiz (MFR), diâmetro do caule (D.C) e comprimento das raízes (C.R) de alface aos 55 dias após a inoculação com 5000 ovos de *Meloidogyne incognita*.

Isolados	Concentrações	MFPA	MFR	D.C	C.R
<i>B. methylotrophicus</i>	2,5 mL kg ⁻¹	196.88 A	15.24 AB	2.06 ABCD	14.52 A
<i>B. methylotrophicus</i>	3,0 mL kg ⁻¹	188.16 ABC	15.36 AB	2.22 AB	14.18 AB
<i>B. methylotrophicus</i>	3,5 mL kg ⁻¹	185.46 ABC	14.56 AB	2.26 AB	13.60 AB
<i>B. methylotrophicus</i>	4,0 mL kg ⁻¹	176.32 ABC	16.80 A	2.08 ABCD	11.64 AB
<i>B. methylotrophicus</i>	4,5 mL kg ⁻¹	182.34 ABC	15.84 AB	2.18 ABC	14.42 AB
<i>B. subtilis</i>	1,5 mL kg ⁻¹	174.16 ABC	15.02 AB	2.34 A	11.66 AB
<i>B. subtilis</i>	2,0 mL kg ⁻¹	176.14 ABC	15.92 AB	2.08 ABCD	10.48 AB
<i>B. subtilis</i>	2,5 mL kg ⁻¹	179.70 ABC	16.16 AB	1.92 ABCD	12.08 AB
<i>B. subtilis</i>	3,0 mL kg ⁻¹	199.04 A	15.74 AB	2.04 ABCD	15.28 A
<i>B. subtilis</i>	3,5 mL kg ⁻¹	190.34 AB	13.64 AB	1.90 ABCD	13.08 AB
<i>B. amyloliquefaciens</i>	3,0 g kg ⁻¹	168.62 ABC	15.36 AB	1.24 CDE	10.50 AB
<i>B. amyloliquefaciens</i>	3,5 g kg ⁻¹	171.48 ABC	15.54 AB	1.48 ABCDE	14.34 AB
<i>B. amyloliquefaciens</i>	4,0 g kg ⁻¹	172.50 ABC	15.20 AB	1.42 ABCDE	13.58 AB
<i>B. amyloliquefaciens</i>	4,5 g kg ⁻¹	173.86 ABC	14.42 AB	1.74 ABCDE	10.90 AB
<i>B. amyloliquefaciens</i>	5,0 g kg ⁻¹	185.62 ABC	13.70 AB	1.96 ABCD	13.48 AB
<i>T. harzianum</i>	3,0 g kg ⁻¹	178.00 ABC	14.40 AB	1.90 ABCD	12.44 AB
<i>T. harzianum</i>	3,5 g kg ⁻¹	175,92 ABC	15.66 AB	2.18 ABC	13.70 AB
<i>T. harzianum</i>	4,0 g kg ⁻¹	173.36 ABC	15.32 AB	2.16 ABC	12.56 AB
<i>T. harzianum</i>	4,5 g kg ⁻¹	170.22 ABC	14.80 AB	2.16 ABC	12.98 AB
<i>T. harzianum</i>	5,0 g kg ⁻¹	179.58 ABC	12.80 AB	1.88 ABCD	12.08 AB
<i>T. asperellum</i>	5,0 mL kg ⁻¹	151.62 CD	13.00 AB	1.58 ABCDE	11.98 AB
<i>T. asperellum</i>	5,5 mL kg ⁻¹	154.92 BCD	13.76 AB	1.82 ABCDE	11.96 AB
<i>T. asperellum</i>	6,0 mL kg ⁻¹	162.82 ABC	13.96 AB	1.12 DE	10.38 AB
<i>T. asperellum</i>	6,5 mL kg ⁻¹	169.72 ABC	15.22 AB	1.34 BCDE	12.78 AB
<i>T. asperellum</i>	7,0 mL kg ⁻¹	167.54 ABC	14.88 AB	1.62 ABCDE	10.00 AB
Controle	0,0 mL ou g kg ⁻¹	123.90 D	11.60 B	0.88 E	9.06 B
Média	-	174.16	14.75	1.82	12.33
C.V.(%)	-	8.84	14.32	22.23	18.12
D.M.S.	-	36,85	5,05	0,97	5,35

(*) Dados foram submetidos à análise de variância a 5% de probabilidade. Letras maiúscula diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade*

No presente trabalho, o isolado que apresentou melhor resultado para a variável massa fresca da raiz (MFR) foi *B. methylotrophicus* na concentração de 4,0 mL kg⁻¹ de semente, promovendo maior valor de MFR com incremento de 44,82% em relação ao tratamento controle. Os isolados de *B. subtilis*, *T. harzianum*, *B. amyloliquefaciens* e *T. asperellum* não diferiram do controle sem tratamento de sementes para esta variável (Tabela 3.1). Os resultados corroboram os obtidos por Montalvão (2016), que relatou o efeito de isolados à base de *B. Methylotrophicus*, que aumentaram em 25,78% a MFR de algodoeiro ('BRS 286') inoculado com *M. incognita* em casa de vegetação. Zhou *et al.* (2016) também demonstraram aumento da produção de tomateiros infectados com *M. incognita* com aplicação de *B. methylotrophicus*. Todos estes resultados evidenciam que *B. methylotrophicus*, possui mecanismos de ação que reduz a infecção de *M. incognita* nas raízes de plantas, possibilitando seu melhor desenvolvimento.

Os seguintes isolados, *B. methylotrophicus* e *T. harzianum* e *B. amyloliquefaciens* nas respectivas concentrações 3,5 mL kg⁻¹, 3,5 g kg⁻¹ e 5,0 g kg⁻¹, apresentaram resultados de D.C diferindo do controle em 156,81%, 147,72% e 122,72% respectivamente (Tabela 3.1). *S.B. subtilis* na concentração de 1,5 mL kg⁻¹ promoveu aumento do desenvolvimento de D.C em 165,90% em relação ao controle sem tratamento de sementes (FERNANDES *et al.*, 2013). Harma & Gomes (1996) relataram que as endotoxinas produzidas por *B. subtilis* no solo interferem no ciclo reprodutivo dos nematoides, principalmente na oviposição e eclosão de juvenis. Estes resultados relatam que além da redução da taxa reprodutiva de nematoides das galhas *B. methylotrophicus* causam promoção do desenvolvimento vegetal, demonstrando aumento da produção em 38% de tomateiros infectados com *M. incognita* com aplicação de *B. methylotrophicus* (ZHOU *et al.*, 2016).

Uso de isolados de bactérias no controle dos fitonematoídes vai ao encontro das demandas atuais da agricultura, tendo em vista a importância dos organismos benéficos presentes no solo, e por serem consideradas estratégias mais limpas e sustentáveis, evidencia a importância do emprego de nematicidas biológicos.

Analisando a variável comprimento de raiz (C.R), observou-se que *B. subtilis* na concentração de 2,5 mL kg⁻¹ e *B. methylotrophicus* 2,5 mL kg⁻¹ promoveram o crescimento do sistema radicular da cultura da alface em 68,65% e 60,26%, respectivamente, em relação ao controle como observa-se na Tabela 3.1. Os isolados *B. amyloliquefaciens*, *T. harzianum* e *T. asperellum* não diferiram do controle, podendo ser justificado com resultados os quais relatam que a bactéria *B. subtilis* tem a capacidade de colonizar as raízes por meio da

formação de uma camada fina sobre elas. A colonização do sistema radicular possibilita uma situação de competição com outras espécies de microrganismos (KILIAN *et al.*, 2000). Segundo Lucy, Reed e Glick (2004) as rizobactérias promotoras de crescimento de plantas proporcionam vários benefícios para as plantas, como o aumento nas taxas de germinação de sementes, crescimento de raízes e de área foliar, aumentando o teor de nutrientes. Isolados de *B. subtilis* foram relatados como antagonistas de nematoides de galhas, podendo ser utilizados no manejo de culturas econômicas, visando reduzir os efeitos deletérios do parasita (LI *et al.*, 2005). Contudo, o controle biológico tem se apresentado como alternativa mais viável para o manejo de fitonematoídeos, por minimizar o dano ambiental e ser mais vantajoso economicamente, comparado aos métodos químicos convencionais.

Houve diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre os tratamentos para as variáveis número de ovos (NO) e fator de reprodução (FR) conforme observado na Tabela 3.2. O *Bacillus methylotrophicus* apresentou resultados satisfatórios na concentração 4,5 mL kg⁻¹, reduzindo FR em 53,98%, o que indicou sua eficiência na redução da reprodução de *M. incognita* em alface, destacando-se como o isolado mais eficiente.

Tabela 3.2. Valores médios das variáveis: número de ovos (NO), fator de reprodução (FR), percentagem de redução de ovos (PRO) nas raízes de alface 55 dias após a inoculação com 5000 ovos de *Meloidogyne incognita*.

Isolados	Concentrações	NO	FR	PRO
<i>B. methylotrophicus</i>	2,5 mL kg ⁻¹	187,86 ABC	2,65 ABC	41,21%
<i>B. methylotrophicus</i>	3,0 mL kg ⁻¹	194,42 BC	2,74 BC	39,15%
<i>B. methylotrophicus</i>	3,5 mL kg ⁻¹	211,42 CD	2,99 CD	33,83%
<i>B. methylotrophicus</i>	4,0 mL kg ⁻¹	188,20 ABC	2,66 ABC	41,09%
<i>B. methylotrophicus</i>	4,5 mL kg ⁻¹	147,02 A	2,07 A	53,98%
<i>B. subtilis</i>	1,5 mL kg ⁻¹	164,72 AB	2,32 AB	48,44%
<i>B. subtilis</i>	2,0 mL kg ⁻¹	203,26 BCD	2,87 BCD	36,38%
<i>B. subtilis</i>	2,5 mL kg ⁻¹	212,10 CD	2,99 CD	33,61%
<i>B. subtilis</i>	3,0 mL kg ⁻¹	188,06 ABC	2,65 ABC	41,14%
<i>B. subtilis</i>	3,5 mL kg ⁻¹	190,76 ABC	2,69 ABC	40,29%
<i>B. amyloliquefaciens</i>	3,0 g kg ⁻¹	206,79 BCD	2,92 BCD	35,28%
<i>B. amyloliquefaciens</i>	3,5 g kg ⁻¹	210,72 CD	2,98 CD	34,05%
<i>B. amyloliquefaciens</i>	4,0 g kg ⁻¹	203,88 BCD	2,88 BCD	36,19%
<i>B. amyloliquefaciens</i>	4,5 g kg ⁻¹	223,66 CD	3,16 CD	30,00%
<i>B. amyloliquefaciens</i>	5,0 g kg ⁻¹	219,54 CD	3,10 CD	31,29%

<i>T. harzianum</i>	3,0 g kg ⁻¹	228,99 CD	3,23 CD	28,33%
<i>T. harzianum</i>	3,5 g kg ⁻¹	219,69 CD	3,10 CD	31,24%
<i>T. harzianum</i>	4,0 g kg ⁻¹	221,09 CD	3,12 CD	30,80%
<i>T. harzianum</i>	4,5 g kg ⁻¹	218,32 CD	3,08 CD	31,67%
<i>T. harzianum</i>	5,0 g kg ⁻¹	243,14 DE	3,43 DE	23,90%
<i>T. asperellum</i>	5,0 mL kg ⁻¹	281,27 EF	3,97 EF	11,02%
<i>T. asperellum</i>	5,5 mL kg ⁻¹	295,47 F	4,17 F	7,52%
<i>T. asperellum</i>	6,0 mL kg ⁻¹	300,56 F	4,25 F	5,93%
<i>T. asperellum</i>	6,5 mL kg ⁻¹	288,71 F	4,08 F	9,64%
<i>T. asperellum</i>	7,0 mL kg ⁻¹	296,40 F	4,19 F	7,23%
Controle	0,0 mL ou g kg ⁻¹	319,52 F	4,51 F	0%
Média	-	225,60	3,19	-
C.V.(%)	-	8,23	8,23	-
D.M.S.	-	44,38	0,62	-

(*) Dados foram transformados em $\sqrt{x+0,5}$, e submetidos à análise de variância a 5% de probabilidade. Letras maiúscula diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade*

As concentrações de *B. methylotrophicus* 2,5 e 4,0 mL kg⁻¹ e *B. subtilis* 1,5, 3,0 e 3,5 mL kg⁻¹ apresentaram reduções na reprodução de *M. incognita* de 41,21%, 41,09%, 48,44%, 41,14% e 40,29%, respectivamente (Tabela 3.2). Isso confirma o que foi relatado por Zhou *et al.* (2016) sobre a rizobactéria *B. methylotrophicus*, estirpe R2-2 e sua ação na redução de *M. incognita* em tomateiro. Ela promoveu reduções na reprodução de *M. Incognita*, cujos mecanismos observados para *Bacillus* spp. foram a síntese de metabólitos secundários que interferem no ciclo reprodutivo do nematoide e/ou transformam exsudados radiculares em subprodutos, interferindo no processo de reconhecimento nematoide-planta (ARAÚJO, 2018). Araújo e Marchesi (2009) observaram que *B. subtilis* (PRBS-1) reduziu 39,34% a reprodução de nematoide de galha em raízes de tomateiro, sob condições de casa de vegetação. Araújo *et al.* (2012) relatam redução significativa de nematoide das galhas, cerca de 70%, na presença de formas ativas e ovos nas raízes de soja BRS 184, susceptível ao parasita. Quando as sementes foram tratadas com *B. subtilis*, proporcionaram maior rendimento aéreo e radicular na alface. Segundo Segato (2016), *B. subtilis* se mostrou eficiente no controle de nematoide, diminuindo em até 87% os juvenis de segundo estágio nas raízes das plantas de alface em relação ao tratamento controle.

Os isolados *B. amyloliquefaciens* e *T. harzianum* nas respectivas concentrações 4,0

e 4,5 g kg⁻¹, agiram como redutor de reprodução em 36,19% e 31,67% de *M. incognita* em alface (Tabela 3.2). Estes resultados são semelhantes aos observados por Araújo e Marchesi (2009), que constataram que *B. amyloliquefaciens*, atuando na região radicular da planta, modificaram os exsudatos produzidos, impedindo que o nematoide encontrasse a planta hospedeira e parasitasse as raízes. Quanto ao fungo nematófago *T. harzianum*, Manfessoni (2018) observou que houve uma redução de 32,1% da população de *Meloidogyne* spp. nas raízes de tomate, em relação ao controle.

Com a finalidade de diminuir os prejuízos causados pelos nematoides, o controle biológico se destaca como uma alternativa de controle viável. Ele possui, ainda, as vantagens de não ter efeito danoso sobre o ambiente e não deixar resíduos nos produtos colhidos. O controle biológico também apresenta o potencial de uso nos cultivos protegidos, hortas e agricultura orgânica. Ele consiste na redução da população do nematoide pela ação de outro organismo vivo, que ocorre naturalmente no solo por meio da manipulação do ambiente, incluindo a introdução de organismos antagonistas, melhorando relação custo/benefício quando comparada a alguns agrotóxicos convencionais.

3.4 CONCLUSÕES

Bacillus methylophilicus na concentração de 2,5 mL kg⁻¹ proporcionou um acréscimo no desenvolvimento vegetativo da alface de 58,90 e 60,25%, MFPA e C.R, respectivamente. A concentração de 4,0 mL kg⁻¹ apresentou MFR 44,82% superior aos outros isolados.

B. subtilis nas concentrações 3,0; 1,5 e 2,5 mL kg⁻¹ apresentou MFPA da parte aérea, D.C e C.R 60,54, 165,90 e 68,65% superior aos outros isolados.

B. methylophilicus na concentração 4,5 mL kg⁻¹ foi o isolado mais eficiente no controle de *M. incognita* com redução do FR em 53,98%.

B. subtilis nas concentrações 1,5; 3,0 e 3,5 mL kg⁻¹, reduziu em 48,44%, 41,14% e 40,29%, respectivamente, a reprodução de *M. incognita*.

Ambos isolados nas respectivas concentrações apresentaram melhor eficiência na redução de reprodutiva de *M. incognita*, em relação aos demais isolados biológicos testados.

3.5 REFERÊNCIAS

AGRIOS, G. N. chapter six—How Plants Defend Themselves against Pathogens. **Plant Pathology**. 5th ed. Academic Press; Cambridge, MA, USA, p. 207-248, 2005.

ALCEBÍADES, M. L.; GALDINO L. G.; CNOSSEN, E. J. N.; FILHO J. S.; ALVES, G. C.

S. Utilização de método químico e biológico no manejo de *Meloidogyne javanica* na cultura de soja sob cultivo protegido. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.16 n.30; p. 630, 2019.

ARAÚJO, F. F; BRAGANTE, R. J; BRAGANTE, C. E; Controle genético, químico e biológico de *Meloidogyne* na cultura da soja. **Pesquisa Agropecuária**. V.42, n.2, p.220-224, 2012.

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

BONETTI, J. I; FERRAZ S. 1981. Modificações do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne* exígua em raízes de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 6, n. 3, p. 552. 1981.

DIAS, W. P.; ASMUS , G. L.; SILVA, J. F. V.; GARCIA, A.; CARNEIRO, G. E. S. Nematoides. In: ALMEIDA, A.M.R.; SEIXAS, C.D.S. (Ed.) Soja: doenças radiculares e de hastes e inter-relações com o manejo do solo e da cultura. Londrina: **Embrapa Soja**, p. 173-206. 2010.

FERNANDES, R. H.; LOPES, E. A.; VIEIRA, B. S. & BONTEMPO, A. F. Controle de *Meloidogyne javanica* na cultura do feijoeiro com isolados de *Bacillus* spp. Revista Trópica: **Ciências Agrárias e Biológicas**, v.7, p.76-81, 2013.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia (UFLA)**, v. 35, p. 1039-1042, 2011.

KILIAN, M.; STEINER, U.; KREBS, B.; JUNGE, H.; SCHMIEDEKNECHT, G.; HAIN, R. FZB24® *Bacillus subtilis*—mode of action of a microbial agent enhancing plant vitality. **Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer**, v. 1, n. 0, p. 72-93, 2000.

LUCY, M.; REED, E.; GLICK, B. R. Applications of free-living plant growth-promoting rhizobacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 86, n. 1, p. 1-25, 2004. <http://dx.doi.org/10.1023/B:ANTO.0000024903.10757.6e> PMID:15103234

MAFESSONI, A. B. Manejo biológico de *Meloidogyne* spp. no cultivo de tomate em ambiente protegido em solo autoclavado e contaminado, (**Dissertação-Mestrado em Agronomia, Área de Concentração em Fitotecnia**). 54 p. 2018.

MONTALVÃO, S. C. L.; Uso de *Bacillus* spp. para o controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e *Meloidogyne incognita* no algodoeiro (*Gossypium hirsutum*). **Tese**. p. 185, 2016.

OOSTENBRINK, M. Characteristics of the relation between nematodes and plants. **Med. Landbouwhogeschool**, Wageningen, 66:3-46, 1966.

PINHEIRO J. B . Manejo de nematoides na cultura da alface. Embrapa Hortaliças. **Circular Técnica** (INFOTECA-E), Brasília. n. 124, 2013. ISSN 1415 3033

SALA F.C; Costa C.P. Retrospectiva e tendência da alfacultura brasileira. **Horticultura**

Brasileira, v.30, n. 2, p. 187-194. 2012.

ROSA J. M; WESTERICH, J. N e WILCKEN S. R. S. Reprodução de *Meloidogyne javanica* em olerícolas e em plantas utilizadas na adubação verde. **Tropical Plant Pathology**, v.38 n. 2, p.133-141. 2013.

SEGATO, S. B.; BETTIO, D. P.; CACEFO, V.; ARAUJO, F. F.; Controle biológico de nematoides em alface com *bacillus subtilis*. **Colloquium Agrariae**, vol. 12, n. Especial, Jul–Dez, p. 23-29. 2016. ISSN: 1809-8215. DOI: 10.5747/ca.2016.v12.nesp.000166

SHARON, E.; CHET, I.; VITERBO, A. Parasitism of *Trichoderma* on *Meloidogyne javanica* and role of the gelatinous matrix. **European Journal of Plant Pathology**, v.118 n.3, p. 247-258. 2007.

SILVA, M. G. Efeito da solarização e da adubação do solo sobre artrópodes, nematoides, atributos do solo e na produtividade de alface em cultivo protegido. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, (**Dissertação de Mestrado**), 136 p, 2006.

SILVA, G.S.; SOUZA, I.M.R; CUTRIM, F.A. Efeito da incorporação de sementes trituradas de feijão de porco ao solo sobre o parasitismo de *Meloidogyne incognita* em tomateiro. **Fitopatologia Brasileira, Brasília**, v. 27, p. 412- 413, 2002.

VAZ, M. V. Controle biológico de *Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne incognita* com *Bacillus subtilis*. **Revista do Núcleo Interdisciplinar de Pesquisa e Extensão**. Patos de Minas: UNIPAM, n. 8, vol. 1, 203-212 p., jul. 2011.

VELASCO, U. P.. Parasitos intestinais em alfaces (*Lactuca sativa*, L.) das variedades crespa e lisa comercializadas em feiras livres de Niterói-RJ. **Revista de Patologia Tropical/Journal of Tropical Pathology**, v. 43, n. 2, p. 209-218, 2014.

VIDA, J. B., KUROZAWA, C., ESTRADA, K. R. F. S. & SANTOS, H.S. Manejo fitossanitário em cultivo protegido. In: Goto, R. & Tivelli, S.W. (Eds.) **Produção de hortaliças em ambiente protegido: condições subtropicais**. Botucatu. UNESP. pp.53-104, 1998.

VIDA, J. B.; ZAMBOLIM, L.; TESSMAN, D. J.; BRANDÃO FILHO, J. U. T.; VERZIGNASSI, J, R.; CAIXETA, M. P. Manejo de doenças de plantas em cultivo protegido. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, n. 4, p. 355-372, 2004.

ZHOU, L.; YUEN, G.; WANG, Y.; WEI, L.; JI, G. Evaluation of bacterial biological control agents for control of root-knot nematode disease on tomato. **Crop Protection**, v.84, p.8-13, 2016.

4. CAPÍTULO II

(Normas de acordo com a Revista Brasileira de Ciências Agrárias)

Utilização de nematicidas biológicos para o controle de *Meloidogyne incognita* na cultura de alface em condições de campo

Resumo: A alface apresenta uma cultura muito suscetível ao ataque de nematoides de galhas, gênero *Meloidogyne*, causando perdas econômicas significativas. As principais espécies que infectam a alface são *Meloidogyne incognita* e *M. javanica*. O controle biológico apresenta-se como uma importante estratégia para o manejo de fitonematoides. Objetivou-se com este trabalho avaliar a eficiência de nematicidas biológicos no controle de *M. incognita* na cultura de alface, e seu efeito no desenvolvimento da cultura. O ensaio foi conduzido em canteiros onde previamente detectou-se a presença de *M. incognita* e foi realizada a quantificação da população inicial. Sementes de alface cultivar Blue seeds BS AC0063 foram tratadas com os isolados de microrganismos nas seguintes concentrações: T1: *Bacillus methylotrophicus* a 2,5 mL kg⁻¹ de semente; T2: *B. subtilis* a 1,5 mL kg⁻¹ de semente; T3: *B. amyloliquefaciens* a 3 g kg⁻¹ de semente; T4: *Trichoderma harzianum* 3 g kg⁻¹ de semente; T5: *T. asperellum* a 5 mL kg⁻¹ de semente e controle sem tratamento de sementes. A seguir foram semeadas em bandejas e após 16 dias foram transplantadas nos canteiros. Utilizou-se delineamento de blocos casualizados, 4 blocos, 6 parcelas por bloco, com unidade experimental de 8 plantas, retirando 4 para serem submetidas às avaliações. No 55º dia após o transplante, foram realizadas as avaliações das seguintes variáveis: massa fresca da parte aérea (MFPA), massa fresca da raiz (MFR), comprimento de raiz (C.R), diâmetro do caule (D.C) e fator de reprodução (FR). Houve redução do FR de *M. incognita* nos tratamentos com os isolados *B. amyloliquefaciens* e *T. harzianum* em 37,60% e 28,86%, respectivamente, ambos isolados possibilitaram acréscimo no desenvolvimento vegetativo da alface. Concluiu-se que *B. amyloliquefaciens* e *T. harzianum* proporcionam melhor desenvolvimento vegetativo e redução na população de *M. incognita* na cultura da alface em condição natural de campo infestado.

Palavras-chave: Manejo integrado, Nematoides de galhas, Bionematicidas, *Lactuca sativa*, Campo.

Use of biological nematicides to control root-knot nematodes in field lettuce crops

Abstract: Lettuce is very susceptible to attack by root-knot nematodes, *Meloidogyne* genus, causing significant economic losses. The main nematode species in lettuce production are *Meloidogyne incognita* and *Meloidogyne javanica*. Currently, biological control is an important strategy for the control of phytonematodes. The aim of this study was to evaluate the influence of biological nematicides on the control of *Meloidogyne incognita* in lettuce crops, and their relationship with crop development. The experiment was conducted at the Institute of Advanced Technology UniBTA - Campus Luan Aguiar, municipality of Estreito-MA. The test was conducted in beds where the presence of *Meloidogyne incognita* was previously detected, the initial population was quantified, then the Lettuce seeds cultivate Blue seeds BS AC0063 were treated with the microorganism isolates, in the following concentrations: T1: *Bacillus methylotrophicus* at 2.5 mL kg⁻¹ of seed; T2: *Bacillus subtilis* at 1.5 mL kg⁻¹ seed; T3: *Bacillus amyloliquefaciens* at 3 g kg⁻¹ seed; T4: *Trichoderma harzianum* 3 g kg⁻¹ seed; T5: *Trichoderma asperellum* at 5 mL kg⁻¹ of seed, Then they were sown in trays and after 16 days they were transplanted. A randomized block design was used, 4 blocks, 6 plots per block, with an experimental unit of 8 plants, removing 4 to be submitted to the evaluations described below. On the 55th day after inoculation, the following variables were evaluated: aerial part fresh mass, root fresh mass, root length, stem diameter and reproduction factor. Results observed were a reduction of *Meloidogyne incognita* egg masses in treatments with the isolates *Bacillus amyloliquefaciens* and *Trichoderma harzianum* by 37.60% and 28.86%, respectively, both isolates functioned as growth promoters. It was concluded that *Bacillus amyloliquefaciens* and *Trichoderma harzianum* provide better vegetative development and reduction in the population of *M. incognita* in lettuce crops in a field-level cropping system.

Keywords: Control, *Meloidogyne incognita*, Bionematicides, *Lactuca sativa*, Field.

4.1 INTRODUÇÃO

A alface (*Lactuca sativa* L.) é uma hortaliça da família Asteracea com relatos da sua utilização como alimento humano desde o século VI a.C (Fonseca, 2007). Esta hortaliça é de grande aceitação e junto do tomate formam os principais ingrediente da maioria das saladas no Brasil.

Os nematoides de galhas constituem um dos principais patógenos da cultura da alface, além de causar danos em várias espécies de hortaliças no Brasil. As espécies de maior expressão são: *M. javanica*, *M. incognita*. encontradas em todo o território nacional. Os danos de nematoides mais frequentes ocorrem na raiz e podem ser quantitativos, quando ocorre a infecção da planta, promovendo decréscimo em sua produção devido à alimentação contínua dos nematoides; ou qualitativos, no caso de raízes comestíveis, bulbos e tubérculos, deformando-os, tornando-os impróprios para o consumo (CHARCHAR, 1999). As perdas na cultura da alface devido ao parasitismo dos nematoides estão estimadas entre 10 e 20%, mas pode atingir 100%. Vale destacar que o cultivo sucessivo dessa hortaliça em uma mesma área pode agravar problemas nematológicos devido à elevação dos níveis populacionais de *Meloidogyne* spp. no solo, (RABELLO, 2010).

Uma das principais formas de controle de nematoides é por meio do controle químico, entretanto os nematicidas químicos promovem elevado nível residual tóxico no solo, com alta possibilidade de matar microrganismos benéficos (ZHANG *et al.*, 2014). Neste cenário, o controle biológico apresenta uma série de vantagens em relação ao químico, pois, não desequilibra a fauna do solo, não contamina o meio ambiente, além de ser de fácil aplicação e ter baixo custo (SOUZA *et al.*, 2014). Nas últimas décadas vem se intensificando as investigações sobre o uso de microrganismos antagonistas para a utilização no controle biológico, com o intuito de manipular o ambiente para obter um solo equilibrado. O controle biológico pode exercer efeito de supressividade, pois quanto maior e mais variada a população microbiana, maiores as chances de sucesso (BORGES *et al.*, 2013).

Bactérias do gênero *Bacillus* expressam características adaptativas para habitar na rizosfera, colonizando raízes de plantas. Classificadas como agentes de controle biológico, algumas espécies do gênero possuem efeito nematicida (STURZ; NOWAK, 2000; MACHADO *et al.*, 2012). Diversos estudos relatam que as espécies de *Bacillus* que compõem a microbiota do solo, além de ação antimicrobiana, possuem capacidade de solubilização de fósforo, aumento da fixação de nitrogênio e solubilização de outros nutrientes (ARAÚJO, 2008).

Fungos do gênero *Trichoderma* apresentam atividade como promotores de crescimento de plantas e estão entre os microrganismos mais comumente estudados como agentes de biocontrole de doenças de plantas, inclusive fitonematoides (ALTMORE, *et al.*, 1999).

Portanto, o presente trabalho teve como objetivo selecionar nematicidas biológicos para o controle de *M. incognita*. em área de cultivo de alface em condições de campo e a sua

ação no crescimento vegetativo da cultura da alface.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido nas dependências do Instituto de Tecnologia Avançada UniBTA - Campus Luan Aguiar, município de Estreito-MA 6°36'54.5"S 47°20'46.9"W. Esta região possui clima tropical, com precipitação média anual aproximada de 1900 mm, temperatura média de 27 °C e 153 metros de altitude. De acordo com Köppen & Geiger a classificação do clima é Aw. Os solos da região são classificados como Latossolos Vermelhos distrófico, com teores de argila em torno de 40%.

4.2.1 Experimento em campo

O ensaio foi conduzido em canteiros onde previamente detectou-se a presença de *M. incognita*. Realizou-se a quantificação da população inicial, e posteriormente as sementes de Alface cultivar Blue seeds BS AC0063 foram tratadas com os isolados de microrganismos, nas seguintes concentrações: T1: *Bacillus methylotrophicus* a 2,5 mL kg⁻¹ de semente; T2: *B. subtilis* a 1,5 mL kg⁻¹ de semente; T3: *B. amyloliquefaciens* a 3 g kg⁻¹ de semente; T4: *T. harzianum* 3 g kg⁻¹ de semente; T5: *T. asperellum* a 5 mL kg⁻¹ de semente. A seguir foram semeadas em bandejas e após 16 dias foram transplantadas para canteiros preparados com utilização de 40g de superfosfato simples por metro, coberturas realizadas no 10 e 25 dias após transplante utilizando 50g por metro do formulado 20-00-20, em ambas as aplicações. Manejo com irrigações, realizado duas vezes ao dia utilizando fita de microaspersão que possui vazão de 60 litros por hora, durante 25 minutos.

Utilizou-se delineamento de blocos casualizados, 4 blocos, 6 parcelas por bloco, com unidade experimental de 8 plantas, retirando 4 para ser submetidas as avaliações.

4.2.2 Avaliações

Após 55 dias do transplante, as plantas foram colhidas, as raízes foram lavadas sob água corrente, e em seguida foram separadas da parte aérea, como pode-se observar na Figura 4.1. As avaliações da parte aérea foram realizadas nas seguintes variáveis: Massa fresca da parte aérea (MFPA), (g), e massa fresca da raiz (MFRA), (g), utilizando uma balança analítica digital com duas casas decimais. O comprimento de raiz (CR.), (cm), foi medido da distância da base do corte no caule até a parte apical da raiz, com auxílio de uma régua graduada expressa em (cm); O diâmetro do caule (DC.) foi obtido com auxílio de paquímetro

digital expresso em (cm), e as médias submetidas à análise de variância e as mesmas comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico Sisvar (SISVAR, 2011).

Para a quantificação dos ovos as raízes de alface foram picadas em pedaços de 1 a 2 cm e trituradas em liquidificador na menor rotação com solução de hipoclorito de sódio a 0,5% por 20 segundos. Em seguida, a suspensão resultante foi submetida a um conjunto de peneiras de 200 mesh e de 500 mesh. A suspensão aquosa retida na peneira de 500 mesh foi recolhida em becker de vidro de 200 mL com auxílio de uma piseta (BONETTI & FERRAZ, 1981).



Figura 4.1. Raízes de alface 55 dias após transplante exibindo galhas induzidas por *Meloidogyne incognita*.

A determinação do número final de ovos e eventuais juvenis foi efetuada com auxílio da lâmina de Peter, sob microscópio fotônico, na ampliação de 40 X. Esse número final (população final) foi usado no cálculo do fator de reprodução (FR) que é a população final do nematoide (Pf) / população inicial – número de ovos e eventuais juvenis utilizados na inoculação do nematoide (Pi) (OOSTENBRINK, 1966). Os resultados obtidos de Pf e o FR foram transformados em $\sqrt{x+0,5}$, o que é recomendado para dados quantitativos, e submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2011).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação à massa fresca da parte aérea (MFPA), houve diferença significativa

entre os produtos biológicos ($P \leq 0,05$), como pode-se observar na Tabela 1. O Isolado de *B. subtilis* apresentou ser 31,07% mais eficiente em relação ao tratamento controle, sem tratamento de sementes avaliando massa fresca da parte aérea. Os tratamentos *B. methylotrophicus*, *B. amyloliquefaciens*, *T. harzianum* e *T. asperellum* isolado, foram respectivamente 26,54%, 25,09%, 25,14% e 19,23% mais eficientes que o controle, sem tratamento de sementes. Resultados semelhantes foram relatados por alguns autores, os quais dizem que a ação de microrganismos promove incremento significativo de massa fresca da parte aérea. Guimarães *et al.* (2013) verificaram um incremento na massa fresca da parte aérea de 26,5% em plantas de alface quando aplicado o produto *B. amyloliquefaciens* isolado ICBB200. Trabalho realizado por Araújo & Marchesi (2009) demonstrou que *B. subtilis* (PRBS-1) aumentou a biomassa da parte aérea de plantas de tomate em 28,48%. De modo semelhante, Sousa *et al.* (2014) relataram incremento de massa fresca da parte aérea de soja em 44%. O uso de *T. harzianum* proporcionou resultados positivos com incremento de 83% na matéria fresca de plantas de maracujá (Santos *et al.*, 2010), o que evidencia o efeito positivo destes isolados biológicos para o controle de *M. incognita*, além de melhorar o desenvolvimento vegetativo, com incremento da massa fresca da parte aérea da cultura da alface. Os isolados *B. subtilis*, *T. harzianum*, *B. methylotrophicus* e *B. amyloliquefaciens* proporcionaram maior valores no D.C da alface de 195,18%, 195,18%, 161,44% e 144,57% respectivamente. Em relação ao fungo *T. asperellum*, esse tratamento foi menos efetivo ($P \leq 0,05$), apresentando 46,98% de desenvolvimento de D.C, não diferindo ($P \leq 0,05$) em relação ao controle (Tabela 4.1).

Tabela 4.1. Valores médios das variáveis massa fresca da parte aérea (MFPA), diâmetro do caule (D.C.), massa fresca da raiz (MFRA) e comprimento de raiz (CR.) de alface 55 dias após transplante.

Tratamentos	MFPA (g)	DC (cm)	MFRA (g)	CR (cm)
T1- <i>B. methylotrophicus</i>	156.56 a	2.17 a	14.06 a	13.73 a
T2- <i>B. Subtilis</i>	162.16 a	2.45 a	11.46 ab	13.35 a
T3- <i>B. amyloliquefaciens</i>	154.77 a	2.03 a	12.33 ab	14.08 a
T4- <i>T. harzianum</i>	154.83 a	2.45 a	10.48 b	12.84 a
T5- <i>T. asperellum</i>	147.52 a	1.22 b	11.89 ab	11.28 a
T6-Controle	123.72 b	0.83 b	13.29 ab	8.08 b
Média	149.93	1.86	12.25	12.22
C.V.(%)	6.95	16,13	14,13	13,86

Letras minúsculas diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade*

Segundo Taiz & Zeiger (2004), as plantas com maior diâmetro de caule apresentam maior tendência à sobrevivência, principalmente pela maior capacidade de formação e de crescimento de novas raízes. Isso pode ser atribuído à ação dos isolados, reduzindo a

infecção nematológica na cultura da alface e melhorando o desenvolvimento do caule.

Observou-se diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre os tratamentos para a variável de MFR, conforme verifica-se na Tabela 4.1. O isolado que apresentou melhor resultado foi *B. methylotrophicus*, promovendo maior MFR em 5,79%, em relação ao controle, sem tratamento de sementes. Os isolados *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* e *T. asperellum* não diferenciaram ($P > 0,05$) quando comparados ao T6 (controle sem tratamento de sementes). Segundo Pinheiro *et al.* (2014), os danos promovidos diretamente no sistema radicular são redutores de desenvolvimento, afetando a função morfológica do sistema. O parasitismo causa danos diretos no sistema radicular e, assim, diminui a absorção de água e nutrientes. Os resultados obtidos pela aplicação de *B. methylotrophicus* e *T. asperellum* em tomateiro no controle de *M. javanica* e *M. incognita* não diferiram do controle, inoculada sem tratamento biológico (CARVALHO, 2017). O melhor desenvolvimento da MFR provavelmente está relacionado com a ação bionemática de *B. methylotrophicus*, melhorando o desenvolvimento vegetativo da alface.

Os tratamentos com os isolados *B. methylotrophicus*, *B. subtilis*, 69,92%, 65,22%, *B. amyloliquefaciens*, *T. harzianum* e *T. asperellum* mostraram resultados de 74,25%, 58,91% e 39,60%, respectivamente. Estes não diferiram ($P > 0,05$) do controle, analisando C.R da alface (Tabela 4.1). Resultados contrários foram obtidos por Xia *et al.* (2011), como o isolado de *B. Subtilis*, o qual sugere que atuam no crescimento da planta a partir do efeito inibidor contra patógenos, produzindo substâncias biologicamente ativas ou transformando compostos minerais e orgânicos indisponíveis em formas disponíveis para a planta (BROADBENT *et al.*, 1977). Além disso, entende-se que há um incremento da produção da planta a partir do uso dessa bactéria como fator de crescimento (MERRIMAN *et al.*, 1974; TURNER & BACKMAN, 1986).

Os isolados *B. methylotrophicus*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *Trichoderma harzianum* apresentaram resultados melhores de comprimento da raiz, confirmando que o uso deles auxilia no desenvolvimento vegetativo da alface.

No presente estudo, para o fator de reprodução (FR) e número de ovos (NO) houve diferenças significativas ($P \leq 0,05$) em função dos tratamentos analisados. *Bacillus amyloliquefaciens*, *Trichoderma harzianum* apresentaram menores fatores de reprodução: FR= 0,82 e 0,75, respectivamente. O número de ovos de *M. incognita* reduziu 37,60% e 28,86% em relação ao controle, evidenciando que os isolados promovem redução na reprodução de *M. incognita*. Os isolados de *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus subtilis* e *Trichoderma asperellum* apresentaram fatores de reprodução semelhantes ao controle,

respectivamente 0,85, 0,88, 1,01, correspondendo à redução do número de ovos na devida ordem de 27,97%, 32,64% e 14,28%, respectivamente (Tabela 4.2).

Tabela 4.2 Valores médios das variáveis: número de ovos (NO), fator de reprodução (FR), percentagem de redução de ovos (PRO) nas raízes de alface 55 dias após transplante.

Tratamentos	NO	FR	PRO
T1- <i>B. methylotrophicus</i>	9,73 a	0,85 ab	27,97%
T2- <i>B. subtilis</i>	9,10 a	0,88 ab	32,64%
T3- <i>B. amyloliquefaciens</i>	8,43 a	0,82 a	37,60%
T4- <i>T. harzianum</i>	9,61 a	0,75 a	28,86%
T5- <i>T. asperellum</i>	11,58 ab	1,01 ab	14,28%
T6-Controle	13,51 b	1,22 b	0%
Média	10,33(*)	0,92 (*)	-
C.V.(%)	17,91	23,74	-
DMS	3,25	0,38	-

(*) Dados foram transformados em $\sqrt{x+0,5}$, e submetidos à análise de variância a 5% de probabilidade. Letras minúsculas diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade*

Segundo Ferreira (2015), *B. amyloliquefaciens* apresentaram ação nematicida com 68% de mortalidade dos juvenis e ação ovicida sobre *M. incognita* com 73% de redução na eclosão dos juvenis de segundo estágio (J2). De maneira semelhante, Alves *et al.* (2011) observaram que *B. amyloliquefaciens* demonstrou alto potencial como agente do controle de J2 de *M. javanica*. As bactérias do gênero *Bacillus* são rizobactérias que podem sintetizar metabólitos secundários que interferem no ciclo reprodutivo do nematoide e/ou transformam exsudados radiculares em subprodutos, interferindo no processo de reconhecimento nematoide-planta (ARAÚJO, 2018).

No presente trabalho o isolado de *B. subtilis* não diferiu do tratamento controle. Resultados diferentes dos obtidos por Araújo & Marchesi (2009), ao avaliarem o efeito de *B. subtilis* (PRBS-1) como promotor de crescimento e agente de controle de nematoides formadores de galha, *Meloidogyne* spp., no cultivo de tomateiro.

A utilização de fungos nematófagos apresenta resultados satisfatórios, evidenciando o potencial uso no controle de *M. incognita* em alface, corroborando os resultados em que se utilizou *Trichoderma* para o controle de *M. incognita* em feijoeiro, onde houve uma redução do número de J2 de *Meloidogyne* spp. em 43% após a aplicação do fungo ao solo (Borges *et al* 2013).

A aplicação de nematicidas biológicos *T. Harzianum* e *Bacillus amyloliquefaciens* apresenta resultados satisfatórios, contribuindo na redução populacional de *M. Incógnita*, e

incrementando o desenvolvimento estrutural da cultura da alface, o que torna uma alternativa ao horticulor para o controle de nematoide.

Uso de controle biológico diminui os danos de *M. incognita* causados à cultura da alface, minimiza o uso e a quantidade de produtos químicos na lavoura de alface, proporciona a produção de alimento mais saudável e mitiga o impacto ambiental causado pela aplicação de agrotóxicos, reduzindo também a intoxicação de trabalhadores, evidenciando ser alternativa promissora para o desenvolvimento sustentável.

4.4 CONCLUSÕES

O tratamento com *T. harzianum* promoveu incremento na MFPA em 25,14%, diâmetro do caule em 195,18%, comprimento de raiz em 58,91%.

Bacillus amyloliquefaciens promoveu incremento na MFPA em 25,09%, diâmetro do caule em 144,57%, C.R em 74,25%, MFR -7,22%.

Houve redução do fator de reprodução de *M. incognita* em alface utilizando tratamentos com os isolados *B. amyloliquefaciens* e *T. harzianum* em 37,60% e 28,86%, respectivamente.

4.5 LITERATURA CITADA

ALVES, G. C. S.; SANTOS J. M.; SOARES P. L. M.; JESUS F. G.; ALMEIDA E. J.; THULER R. T. Avaliação in vitro do efeito de rizobactérias sobre *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *Pratylenchus zaeae*. **Revista Arquivos do Instituto Biológico**, v.78 p. 557-564, 2011.

ARAÚJO, F.V. Novas moléculas e produtos biológicos no manejo de fitonematoides em soja. **Trabalho apresentado no XXXV Congresso Brasileiro de Nematologia**. Bento Gonçalves, RS. Embrapa Brasília, DF. 239. p. 2018.

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

ARAIN, R. R.; SYED, R. N.; RAJPUT, A. Q.; KHANZADA, M. A.; RAJPUT, N. A.; LODHI, A. M. Comparative efficacy of *Trichoderma harzianum*, neem extract and furadan on *Meloidogyne incognita* infecting tomato plant growth. **Pakistan Journal of Nematology**, v. 33, n. 1, p. 105- 112, 2015.

BONETTI J. I.; FERRAZ S. 1981. Modificações do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne* exígua em raízes de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, pag.? 1981.

BORGES, F. G.; BATTISTUS, A. G.; MÜLLER, M. A.; MIORANZA, T.M.; KUHN, O. J. Manejo alternativo de nematoides de galha (*Meloidogyne incognita*) em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*). **Scientia Agraria Paranaensis**, v.12, suplemento, dez., p. 425- 433, 2013.

BROADBENT, P.; BAKER, K.F.M.; FRANK, S.N.; HOLLAND, J. Effect of *Bacillus* sp. on increased growth of seedlings in steamed and non-treated soil. **Phytopathology** 67:1027–1034, 1977.

CHARCHAR, J. M.; HUANG, C. S. Sobrevivência de *Pratylenchus brachyurus* em fragmentos de raízes de capim gordura (*Melinis minutiflora* Beauv.). **Fitopatologia Brasileira**, v. 16, n.1, p. 22-25, 1999.

CHARCHAR, J. M.; HUANG, C. S. Sobrevivência de *Pratylenchus brachyurus* em fragmentos de raízes de capim gordura (*Melinis minutiflora* Beauv.). **Fitopatologia Brasileira**, v. 16, n.1, p. 22-25, 1991.

CARNEIRO, R.G. Efeitos de *Meloidogyne incognita* raça 3 e *M. javanica* sobre a absorção e translocação de nitrogênio, fósforo e cálcio e sobre a partição de carbono em cultivares de soja. Piracicaba, 2000. 96p. **Tese (Doutorado em Fitopatologia)** - ESALQ/Universidade de São Paulo.

CARVALHO, Patrícia Honorato de. Controle biológico e alternativo de *Meloidogyne incognita* e *M. javanica* em tomateiro. **Dissertação**. 98p. 2017.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia** (UFLA), v. 35, p. 1039-1042, 2011.

FERREIRA, Rivanildo Júnior. Espécies de *Bacillus* no controle de *Meloidogyne incognita* e *Meloidogyne javanica* in vitro e na cana-de-açúcar. **Dissertação**. 72p. 2015.

FONSECA, J. M. O GORGULHO. **Boletim Informativo sobre Biodiversidade Agrícola. Colher para semear** – Rede Portuguesa de Variedades Tradicionais. Ano 4 . n°5 pág. 13. 2007.

GUIMARÃES, A. M.; PAZ, I. C. P.; SANTIN, R. C. M.; PAULI, G; SILVA, M. E.; SOUZA, R. V.; MATSUMURA, A. T. S.; SILVA, E. R. Utilização da rizobactéria *Bacillus amyloliquefaciens* na promoção decrescimento de alface (*Lactuca sativa* L.), em cultivo agroecológico. **Resumos do VIII Congresso Brasileiro de Agroecologia**. Cadernos de Agroecologia – ISSN 2236-7934 – v 8, n. 2, 2013.

MAKISHIMA, N. **Cultivo de Hortaliças**. Brasília: CNPq. 26 p. 1992.

MALUF, W. R. **Produção de hortaliças I**. Lavras: UFLA, 70 p. 2001.

MERRIMAN, P. R.; PRINCE, R.D.; KOLLMORGEN, J. F.; PIGGOTT T.; RIDGE, E. H. Effect of seed inoculation with *Bacillus subtilis* and *Streptomyces griseus* on the growth of cereals and carrots. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.25, p.219–226, 1974.

OOSTENBRINK, M. Major characteristics of the relation between nematodes and plants **Mededeelingen der Landbouw-Hoogeschool**, n.66, p.1- 46, 1966.

PINHEIRO, J. B.; PEREIRA, R. B.; SUINAGA, F. A. Manejo de nematoides na cultura do tomate. **Embrapa Hortaliças-Circular Técnica** (INFOTECA-E), 2014.

PINHEIRO J. B.; AMARO G. B.; PEREIRA R. B. Ocorrência e controle de nematoides em hortaliças folhosas. **EMBRAPA Circular técnica**, vol. 89, Brasília, Nov. 2010.

RABELLO, L. K. C. Quantificação de danos e perdas causados por *Meloidogyne javanica* em alface (*Lactuca sativa* L.). Universidade Federal do Espírito Santo. (**Dissertação**). 2010.

SANTOS, H. A.; MELLO, S. C. M.; PEIXOTO, J. R. Associação de isolados de *Trichoderma* spp. e ácido indol3- butírico (aib) na promoção de enraizamento de estacas e crescimento de maracujazeiro. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 26, n. 6, p. 966-972, 2010.

SHARMA, R. D.; FONSECA, C. E. L. Efeito de *Meloidogyne javanica* no crescimento da ervilha. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, p.115-120, 2000.

SILVEIRA, A. P. D. Micorrizas. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M. & NEVES, M.C.P., eds. Microbiologia do solo. Campinas, **Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**, p. 257-282, 1992.

SOUSA, N. D. L.; LIMA, W. T.; COELHO, T. V.; SOARES, A. L.; CAIXETA, L. M. S.; PEREIRA, R.C.; OLIVEIRA, C.B.; POMELLA, A.W.V. Influência de diferentes doses de Quality (*Trichoderma asperellum*) e Onix (*Bacillus methylotrophicus*) no sulco de plantio na produtividade de soja (*Glycine max* L.). **Resumo de Congresso**, 2014.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre: Artmed Editora S/A. . 438p. 2004.

TAYLOR, A. L.; SASSER, J. N. Biology, identification and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species). Raleigh: **International Meloidogyne Project**, NCSU & USAID Coop. Publ.111p. 1978.

TREVISAN, M.; LOPES, R. S.; SILVA, M. S. G.; ESSER, R.; JAYME, J. P. C.; FERRO, H.; FREIRE, E. S. Efeito de *Bacillus amyloliquefaciens* BV03 no controle de *Pratylenchus brachyurus* no cultivo de soja. Trabalho apresentado no 50º Congresso Brasileiro de Fitopatologia. **Anais do 50º Congresso Brasileiro de Fitopatologia**, Uberlândia, MG. 2017.

Turner J.T, Backman P.A Biological cultures test control. *Plant Disease* V, 1, 49 p. 1986.
VOVLAS, N. Pathogenicity of the root-knot nematode *Meloidogyne hapla* on potato. **Plant pathology**, 54: 657-664, 2005.

XIA, Y.; XIE, S.; MA, X.; WU, H.; WANG, X.; GAO, X. The purL gene of *Bacillus subtilis* is associated with nematicidal activity. **FEMS, Microbiology Letters**, v.322, p. 99-107, 2011.

ZHANG, S.; GAN, Y.; XU, B.; XUE, Y. The parasitic and lethal effects of *Trichoderma longibrachiatum* against *Heterodera avenae*. **Biological Control**, v. 72, p. 1–8, 2014.

5. CONCLUSÃO GERAL

Concluiu-se que *Bacillus methylotrophicus*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* e *T. harzianum* incrementaram o desenvolvimento vegetativo da cultura da alface.

B. methylotrophicus e *B. subtilis* nas respectivas concentrações 4,5 mL kg⁻¹ 1,5 mL kg⁻¹, possibilitaram redução na população de *M. incognita* em condições de cultivo protegido.

B. amyloliquefaciens e *T. harzianum* proporcionaram redução na população de *M. incognita* em sistema de cultivo de campo.