PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM AGRONOMIA

LORRAYNE GUIMARÃES BAVARESCO

EFEITO DE *Bacillus subtilis* APLICADO EM PRÉ OU PÓS-PLANTIO NO CONTROLE DA MELOIDOGINOSE E SOBRE ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS NO TOMATEIRO

Presidente Prudente - SP
2018

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM AGRONOMIA

LORRAYNE GUIMARÃES BAVARESCO

EFEITO DE *Bacillus subtilis* APLICADO EM PRÉ OU PÓS-PLANTIO NO CONTROLE DA MELOIDOGINOSE E SOBRE ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS NO TOMATEIRO

Dissertação apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agronomia – Área de Concentração: Produção Vegetal.

Orientador:
Prof. Dr. Fabio Fernando de Araújo

Presidente Prudente - SP
2018

635.642
B353m

Bavaresco, Lorrayne Guimarães.
Efeito de *Bacillus subtilis* aplicado em pré ou pós-plantio no controle da meloidoginose e sobre alterações fisiológicas no tomateiro/ Lorrayne Guimarães Bavaresco. – Presidente Prudente, 2018.
63f.: il.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2018.
Bibliografia.
Orientador: Prof. Dr. Fabio Fernando de Araújo

1. Rizobactérias. 2. Nematoides das galhas 3. Controle biológico I. Título.

UNIVERSIDADE DO OESTE PAULISTA
UNOESTE
PRESIDENTE PRUDENTE · SP

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Agronomia
Tel.: 18 3229 2077 / 2078
www.unoeste.br
CAMPUS II

Campus I Rua José Bongiovani, 700 · Cidade Universitária · CEP 19050 920 · Presidente Prudente SP · Tel|Fax: 18 3229 1000
Campus II Rodovia Raposo Tavares, Km 572 · Bairro Limoeiro · CEP 19067 175 · Presidente Prudente SP · Tel|Fax: 18 3229 2000

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "**EFEITO DE *Bacillus subtilis* APLICADO EM PRÉ OU PÓS-PLANTIO NO CONTROLE DA MELOIDOGINOSE E SOBRE ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS NO TOMATEIRO**"

AUTOR(A): LORRAYNE GUIMARÃES BAVARESCO

ORIENTADOR(A): FABIO FERNANDO DE ARAÚJO

Aprovado(a) como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE em AGRONOMIA

Área de Concentração PRODUÇÃO VEGETAL, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Fabio Fernando de Araújo

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista / Presidente Prudente (SP)

Profa. Dra. Rita de Cássia Lima Mazzuchelli

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista / Presidente Prudente (SP)

Dr. Waldir Pereira Dias

EMBRAPA SOJA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária / Londrina(PR)

Data da realização: Presidente Prudente, 31 de agosto de 2018.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, José Tadeu Bavaresco e Edivina Guimarães Bavaresco, que não mediram esforços para oferecer o melhor para os seus filhos, e que nos encorajam todos os dias para sermos merecedores dos nossos objetivos.

Ao meu avô e agricultor Hermando Bavaresco (*in memorian*), fonte de inspiração para os estudos e pesquisas na área agrícola.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao professor Dr. Fábio Fernando de Araújo, pela orientação, paciência e ensinamentos que contribuíram para aprimorar os meus conhecimentos, por ter me acolhido e acreditado no potencial deste trabalho.

Aos meus pais José Tadeu Bavaresco e Edivina Guimarães Bavaresco, pela educação, pelos conselhos, amizade, determinação, apoio e incentivos, durante todas as etapas da minha vida, por nunca terem desistido dos meus sonhos e duvidado da minha capacidade de poder realiza-los.

Ao meu irmão Frederico, pelo apoio e companheirismo em todos os momentos importantes nesta longa caminhada.

À minha família, pelo amor, carinho e alicerce para minha vida.

Aos meus amigos do laboratório de Microbiologia do Solo, Bruna, Eduardo, Vanessa e Mateus pelas contribuições, convivência e momentos de alegria compartilhados.

À minha amiga, Alline Mendes Alves, pelos conselhos, ajuda e companhia dentro e fora da Universidade.

Aos colegas, Pedro Henrique Gorni e Daniel Moreira Neris, pela ajuda indispensável nas análises bioquímicas.

Ao Eng. Agrônomo Vanderlei Barbosa, pela amizade, influência e fornecimento do solo e mudas para a execução do trabalho.

À Embrapa Soja, pelo fornecimento do inóculo de nematoides.

À banca examinadora de qualificação, Dra. Rita de Cássia Lima Mazzuchelli e Dra. Ana Cláudia Pacheco Santos, pelas correções, sugestões e importantes contribuições para este trabalho.

Aos funcionários e colegas dos Departamentos de Pesquisa e Análise, em especial, Amandio, Diego, Mayara, Cris e Luciana, que contribuíram fornecendo conhecimento e auxílio para a execução desta pesquisa.

À Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), pela infraestrutura, pelo apoio durante o curso e à equipe do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES), pelo apoio e concessão de Bolsa de Estudos (cod. 001).

Muito obrigada!!!

“O mundo está nas mãos daqueles que têm a coragem de sonhar e correr o risco de viver seus sonhos”. (Paulo Coelho)

RESUMO

Efeito de *Bacillus subtilis* aplicado em pré ou pós-plantio no controle da meloidoginose e sobre alterações fisiológicas no tomateiro

Dentre as formas de controle biológico, a utilização de rizobactérias tem se mostrado promissora na supressão e proteção de plantas ao ataque de fitonematoides. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da aplicação de *Bacillus subtilis* na reprodução de *Meloidogyne* spp., associado as alterações na colonização da rizosfera e no crescimento, nutrição e atividade enzimática de cultivares de tomateiro tolerante e suscetível aos nematoides-das-galhas. Os modos de aplicação estudados consistiram na inoculação do *Bacillus subtilis* (AP-3) em pré-plantio e pós-plantio do tomateiro. Foram conduzidos dois experimentos em câmara de crescimento de plantas. No primeiro experimento as plantas de tomateiro foram cultivadas em substrato esterilizado, com inoculação de 5000 ovos de *Meloidogyne incognita.* No segundo, o cultivo do tomateiro foi realizado em solo arenoso naturalmente infestado por nematoides-das-galhas. Aos 40 dias após o transplantio das mudas, foram avaliados o crescimento das plantas, a reprodução do nematoide, a colonização do solo e da rizosfera por bactérias do gênero *Bacillus* spp. e as alterações bioquímicas do tomateiro. Em ambos os modos de aplicação, o *Bacillus subtilis* foi eficiente em aumentar a massa radicular e em reduzir a reprodução do nematoide-das-galhas em tomateiro suscetível, cultivado em solo naturalmente infestado. Em substrato estéril, a inoculação de *B. subtilis* em pós-plantio promoveu redução do número de formas ativas do nematoide e ambas as aplicações promoveram a diminuição de ovos de *Meloidogyne incognita* nas raízes do tomateiro. A aplicação de *B. subtilis*, na condição de substrato estéril, induziu mudanças na absorção nutricional do tomateiro, aumentando os teores de cálcio e reduzindo o potássio foliar. A aplicação de *B. subtilis* contribuiu para redução da atividade peroxidase nas folhas do tomateiro suscetível a nematoides-das-galhas, em condição estéril. A rizobactéria, em pós-plantio, possibilitou o aumento no teor de prolina nas folhas do tomateiro, cultivado em solo naturalmente infestado com nematoides-das-galhas. As inoculações com *B. subtilis* promoveram aumento do número de *Bacillus* spp. no substrato estéril e na rizosfera do tomateiro, sendo comprovada a persistência destas bactérias aos 40 DAP.

Palavras-chave: Rizobactérias. Nematoides das galhas. Controle biológico.

ABSTRACT

Effect of *Bacillus subtilis* applied in pre or post-planting on the control of meloidoginose and on physiological changes in tomato

Among the forms of biological control, the use of rhizobacteria has shown to be promising in the suppression and protection of plants against the attack of phytonematoids. The objective of this work was to evaluate the effect of *Bacillus subtilis* on the reproduction of *Meloidogyne* spp., associated to changes in rhizosphere colonization and growth, nutrition and enzymatic activity of tomato cultivars tolerant and susceptible to root-knot nematodes. The methods of application consisted of the inoculation of *Bacillus subtilis* (AP-3) in pre-planting and post-planting of the tomato. Two experiments were conducted in a plant growth chamber. In the first experiment the tomato plants were cultivated on a sterile substrate, inoculating 5000 eggs of *Meloidogyne incognita*. In the second, tomato cultivation was carried out in sandy soil naturally infested with root-knot nematodes. The plant growth, nematode reproduction, soil and rhizosphere colonization by bacteria of the genus *Bacillus* spp., and biochemical changes were evaluated at 40 days after transplanting of the tomato. In both modes of application, the *Bacillus subtilis* was efficient in increasing root mass and in reducing the reproduction of the root-knot nematode in susceptible tomato cultivated in naturally infested soil. In sterile substrate, inoculation of *B. subtilis* in post-planting promoted reduction of the number of active forms of the nematode and both applications promoted the decrease of eggs of *Meloidogyne incognita* in the roots of the tomato. The application of *B. subtilis*, as a sterile substrate, induced changes in the nutritional uptake of tomato plants, increasing calcium levels and reducing leaf potassium. The application of *B. subtilis* contributed to the reduction of the peroxidase activity in leaves of the tomato susceptible to root-knot nematodes, in sterile condition. The rhizobacteria, after planting, allowed the increase in the proline content in the leaves of the tomato, cultivated in soil naturally infested with root-knot nematodes. Inoculations with *B. subtilis* promoted an increase in the number of *Bacillus* spp. in the sterile substratum and in the rhizosphere of the tomato, being confirmed the persistence of these bacteria at 40 DAP.

Keywords: Rhizobacteria. Root-knot nematodes. Biological control.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Análise química do solo coletado no município de Presidente Prudente – SP, com incidência natural de *Meloidogyne* spp..... 31

TABELA 2 - Resumo da análise de variância (teste F) dos componentes de crescimento vegetativo das plantas, ao parasitismo do nematoide e à colonização bacteriana, em função dos modos de aplicação de *Bacillus subtilis,* em substrato esterilizado infestado com *Meloidogyne incognita*..... 38

TABELA 3 - Influência do modo de aplicação de *Bacillus subtilis* sobre a massa fresca radicular (MFR) de cultivares de tomateiro e colonização de *Bacillus* spp. em substrato esterilizado (CBS), sob infestação de *Meloidogyne incognita*, aos 40 DAP..... 39

TABELA 4 - Influência do modo de aplicação de *Bacillus subtilis* sobre o índice de galhas (IG) e fator de reprodução (FR) de *Meloidogyne incognita,* em cultivares de tomateiro, aos 40 DAP..... 39

TABELA 5 - Valores médios de altura de plantas (AP), formas ativas do nematoide (FAN), número de ovos (NO) e colonização de *Bacillus* spp. na rizosfera (CBR) em cultivares de tomateiro, em razão da variação no modo de aplicação de *Bacillus subtilis*, em substrato esterilizado infestado com *Meloidogyne incognita*, aos 40 AP..... 40

TABELA 6 - Resumo da análise de variância (teste F) para o teor relativo de clorofila total (CT) e macronutrientes nas folhas de duas cultivares de tomateiro, em função do modo de aplicação do *Bacillus subtilis*, em substrato esterilizado infestado com *Meloidogyne incognita*..... 41

TABELA 7 - Valores médios para os teores relativos de clorofila total e de potássio, nas folhas de plantas de tomateiro, em razão do modo de aplicação *Bacillus subtilis*, em substrato esterilizado infestado com *Meloidogyne incognita*..... 41

TABELA 8 - Influência do modo de aplicação de *Bacillus subtilis* sobre o teor de cálcio nas folhas de cultivares de tomateiro, em substrato esterilizado infestado com de *Meloidogyne incognita,* aos 40 DAP..... 42

TABELA 9 - Resumo da análise de variância (teste F) para as variáveis bioquímicas proteínas solúveis totais (PST), prolina (PRO), guaiacol peroxidase (GPX) e superóxido dismutase (SOD) nas folhas de tomateiro, em função do modo de aplicação de *Bacillus subtilis*, em substrato esterilizado, infestado por *Meloidogyne incognita*..... 42

TABELA 10 - Influência do modo de aplicação de *Bacillus subtilis* sobre a atividade da guaiacol peroxidase (GPX), nas folhas de duas cultivares de tomateiro, cultivadas em substrato esterilizado infestado com *Meloidogyne incognita*, aos 40 DAP..... 43

TABELA 11 - Resumo da análise de variância (teste F) dos componentes de crescimento vegetativo, características de parasitismo de nematoides e colonização bacteriana, de cultivares de tomateiro, em função do modo de aplicação de *Bacillus subtilis,* em solo naturalmente infestado com *Meloidogyne* spp..... 44
TABELA 12 - Influência do modo de aplicação de *Bacillus subtilis* sobre a massa fresca radicular (MFR) e sobre o controle de formas ativas de nematoides (FAN), nas raízes de duas cultivares de tomateiro, em solo naturalmente infestado com *Meloidogyne* spp., aos 40 DAP..... 45
TABELA 13 - Valores médios da colonização do gênero *Bacillus* spp. na rizosfera (CBR), em função dos modos de aplicação de *Bacillus subtilis*, em solo naturalmente infestado com *Meloidogyne* spp., aos 40 DAP..... 45
TABELA 14 - Resumo da análise de variância (teste F) para o teor relativo de clorofila total (CT) e macronutrientes nas folhas de duas cultivares de tomateiro, em função do modo de aplicação de *Bacillus subtilis*, em solo naturalmente com *Meloidogyne* spp..... 46
TABELA 15 - Resumo da análise de variância (teste F) para as variáveis bioquímicas proteínas solúveis totais (PST), prolina (PRO), guaiacol peroxidase (GPX) e superóxido dismutase (SOD) nas folhas de tomateiro, em função do modo de aplicação de *Bacillus subtilis*, em solo naturalmente infestado com *Meloidogyne* spp..... 46
TABELA 16 - Valores médios de prolina nas folhas do tomateiro, em função do modo de aplicação de *Bacillus subtilis*, em solo naturalmente infestado com *Meloidogyne* spp., aos 40 DAP 47

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO..... 12
2 REVISÃO DE LITERATURA..... 14
2.1 Cultura do tomateiro 14
2.2 Nematoides…….. 15
2.2.1 Fitonematoides no cultivo do tomateiro..... 17
2.3 Métodos de controle da meloidoginose…….. 19
2.3.1 Resistência genética do tomateiro aos nematoides..... 21
2.3.2 Controle Biológico..... 23
2.3.2.1 *Bacillus subtilis*..... 24
2.4 Alterações bioquímicas relacionadas à resistência em plantas.....… 25
3 OBJETIVO..... 29
4 MATERIAL E MÉTODOS..... 30
4.1 Condução experimental 30
4.2 Cultivares de tomateiro.....31
4.3 Aplicação de *Bacillus subtilis* 31
4.4 Condução e avaliações do tomateiro 32
4.4.1 Proteínas solúveis totais..... 33
4.4.2 Teor de prolina..... 33
4.4.3 Atividade enzimática guaiacol peroxidase (GPX)..... 34
4.4.4 Atividade enzimática superóxido dismutase (SOD)..... 34
4.5 Características sintomatológicas e quantificação de nematoides.....35
4.6 Colonização do gênero *Bacillus* spp. 36
4.7 Análises estatísticas 36
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 38
5.1 Experimento 1: Infestação de substrato esterilizado com *M. incognita*…… 38
5.2 Experimento 2: Solo naturalmente infestado com nematoides-das-galhas (*Meloidogyne* spp). 44
6 CONCLUSÕES..... 54
REFERÊNCIAS..... 55

1 INTRODUÇÃO

Os nematoides-das-galhas, (*Meloidogyne* spp.), são responsáveis por grandes perdas econômicas na cultura do tomateiro. Ocasionam sérios danos ao desenvolvimento das plantas e reduzem consideravelmente o potencial produtivo de áreas agrícolas. O parasitismo desses nematoides compromete o sistema radicular da planta hospedeira, formando as galhas. Estas são alterações e modificações nas células radiculares ocasionadas pela penetração e estabelecimento de sítios de alimentação pelo nematoide. Em consequência, o sistema vascular da planta fica comprometido, e há redução na absorção e translocação de água e nutrientes.

O ataque por nematoides-das-galhas afeta o funcionamento e o crescimento do sistema radicular, prejudicando o desenvolvimento da planta. Os sintomas na parte área incluem o desfolhamento, amarelecimento, necrose e, até mesmo, a morte precoce de plantas em áreas severamente infestadas. Estes fitonematoides possuem ampla distribuição geográfica, alta capacidade de reprodução, ciclo de vida rápido e grande diversidade de plantas hospedeiras.

Por estas razões, medidas integradas, que visem a redução das populações do nematoide abaixo do nível de dano econômico, são essenciais para o manejo do parasita em áreas infestadas. Para o manejo da meloidoginose na cultura do tomateiro, os agricultores frequentemente recorrem à utilização de cultivares resistentes e do controle químico. No entanto, as cultivares comerciais resistentes de tomateiro disponíveis no Brasil podem ter a eficiência afetada, pela elevação da temperatura do solo. Já a utilização de nematicidas químicos, tem sido cada vez mais limitada, pela alta toxidade, alto custo de aplicação e baixa eficiência de controle dos produtos.

Neste sentido, o controle biológico, com a utilização de microrganismos antagonistas, principalmente rizobactérias, tem se destacado na supressão de nematoides-das-galhas, sendo uma alternativa eficiente, ecologicamente sustentável, de fácil aplicação e de baixo custo econômico. A proteção de plantas por rizobactérias tem sido relacionada a múltiplos mecanismos de ação, na região da rizosfera, como antagonismo, competição por espaço e nutrientes, antibiose, parasitismo e indução de resistência.

Espécies do gênero *Bacillus* são relatadas como potenciais agentes de controle biológico contra diversos patógenos de plantas e podem contribuir na

redução de nematoides, em diferentes culturas. Essas bactérias podem, ainda, ocasionar alterações fisiológicas na absorção de nutrientes e atividade antioxidante na planta hospedeira. Este trabalho foi conduzido com o objetivo de testar a eficiência de *Bacillus subtilis* (isolado AP-3), aplicado em pré ou pós plantio, no controle de nematoides-das-galhas em tomateiro.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cultura do tomateiro

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é uma planta dicotiledônea, pertencente à família *Solanaceae*. Tem origem na região ocidental ao longo da costa andina da América do Sul, e das Ilhas Galápagos. Sua domesticação foi documentada na região sul do México, pelos povos Incas. Posteriormente, propagou-se para outros continentes, pelos exploradores europeus, por volta do século XV (JENKINS, 1948).

A espécie possui crescimento herbáceo, porte arbustivo e é perene. Porém, é cultivada como cultura anual. O sistema radicular pivotante do tomateiro pode alcançar até 1,5 m de profundidade, mas 70% das raízes se concentram a menos de 20 cm da superfície do solo (ALVARENGA, 2004).

As folhas são alternadas, compostas e com número ímpar de folíolos. O caule é flexível e possui inúmeras brotações laterais. O tomateiro apresenta dois hábitos de crescimento, o indeterminado e o determinado. O crescimento indeterminado ocorre na maioria das cultivares para produção de frutos de mesa, enquanto, as cultivares de crescimento determinado são adaptadas especialmente para a cultura rasteira, com finalidade agroindustrial (FILGUEIRA, 2000). As flores são pequenas, de coloração amarela, hermafroditas e autógamas, com baixa porcentagem de polinização cruzada. Os frutos são do tipo baga e possuem tamanho, formato e coloração variáveis (ALVARENGA, 2004).

O tomate, a segunda hortaliça mais consumida no mundo, é considerado um dos produtos de maior importância econômica e valor social, pela mão-de-obra empregada (MACEDO, 2006; MELO, 2014). Nos últimos 20 anos a produção mundial de tomate mais que duplicou, passando de 77,9 milhões de toneladas, para uma produção superior a 164 milhões de toneladas em 2013 (FAOSTAT, 2016).

A China é atualmente o maior produtor de tomate do mundo, com aproximadamente 50 milhões de toneladas, o que representa cerca de 30% do total produzido. O Brasil ocupa o oitavo lugar, com 4,3 milhões de toneladas (FAOSTAT, 2016; IBGE, 2018). Segundo o último levantamento realizado pelo IBGE (2018), na safra de 2017, a área cultivada com tomate no País foi de 64,6 mil hectares, e a

produtividade média ficou em 67,6 toneladas por hectare. Aproximadamente 24% da produção é destinada para o processamento industrial e o restante para o consumo “in natura” (MELO, 2014). O cultivo de tomate é bem distribuído por todas as regiões brasileiras, porém sua produção se concentra nas regiões Centro-Oeste e Sudeste. Os principais estados produtores são Goiás, Minas Gerais e São Paulo (IBGE, 2018).

O tomateiro se desenvolve bem em condições de clima tropical e subtropical, relativamente fresco e árido, com bastante luminosidade, em amplo espectro de latitude, em diferentes tipos de solo e métodos de cultivo (EMBRAPA, 1993; ALVARENGA, 2004). No entanto, em condições a campo, a cultura do tomateiro é considerada uma das mais difíceis de ser conduzida, pois é afetada por diversos patógenos e pragas. Dentre os problemas fitossanitários, os nematoides-das-galhas são responsáveis pelos maiores prejuízos à tomaticultura, principalmente em regiões onde as médias de temperatura são elevadas e os cultivos são sucessivos na mesma área (GONÇALVES, 2014).

2.2 Nematoides

Entre os seres vivos que compõe o complexo biótico do solo estão os nematoides, organismos invertebrados, microscópicos de corpo cilíndrico e alongado, pertencentes ao filo Nematoda. São capazes de ocupar diferentes habitats e para sobreviverem, necessitam se alimentar de algo vivo. Na natureza, a maioria dos nematoides são de vida livre. Algumas espécies são parasitas de outros animais ou plantas (LORDELLO, 1986; FERRAZ; MONTEIRO, 2011). Estima-se que 10% dos nematoides são parasitas de plantas (MACHADO et al., 2012).

Os nematoides parasitas de plantas denominados fitonematoides ou fitoparasitos, limitam a produtividade de diferentes culturas. As perdas causadas por nematoides, são estimadas entre 12 a 15%. As maiores incidências e danos ocorrem em países em desenvolvimento, afetando principalmente a produção de olerícolas (CARNEIRO, 1992; SILVA, 2011; ANWAR; MCKENRY, 2012). Em âmbito global, estudos apontam que os prejuízos econômicos gerados, pela infestação de nematoides na agricultura, ultrapassam 150 bilhões de dólares por ano (SINGH et al., 2015).

A atração e o reconhecimento da planta hospedeira pelo fitonematoide acontece a partir de sinais produzidos e emitidos pelas raízes, na forma de compostos orgânicos como exsudatos, secreções e mucilagens. Estes compostos são perceptíveis aos órgãos sensoriais do fitonematoide, atraindo-o para a rizosfera. Com o auxílio de estruturas especiais, como o estilete e as glândulas esofagianas, o fitonematoide modifica a célula da planta hospedeira, de modo a assegurar a sua alimentação (FARIA et al., 2003).

O modo de invasão e migração varia com a espécie e estágio de vida do nematoide. Os nematoides parasitos que se estabelecem no interior do organismo vegetal são designados endoparasitos. Aqueles que se alimentam da planta, permanecendo do lado externo, apenas introduzindo no tecido vegetal o estilete e parte do pescoço, são tidos como ectoparasitos. Além disso, podem permanecer instalados definitivamente nos tecidos da planta, sendo considerados parasitos sedentários. Ao contrário, se penetrarem na planta e retornarem ao solo, a qualquer momento, são tidos como parasitos migratórios (LORDELLO, 1986).

De maneira geral, qualquer parte da planta pode ser infectada pelo fitonematoide. No entanto, estruturas da planta que ficam em contato com o solo são aquelas com maior frequência afetadas (LORDELLO, 1986; FERRAZ; MONTEIRO, 2011). A ação físico-química do fitonematoide sobre o sistema radicular da planta hospedeira provoca alterações na absorção e translocação da água e nutrientes. Isso resulta em modificações e destruição dos tecidos radiculares, diminuindo o volume de raízes e abrindo porta de entrada, para outros patógenos (ASMUS, 2001).

Com o sistema radicular comprometido pelo parasitismo por nematoides, na parte aérea surgem sintomas característicos, tais como amarelecimento das folhas, redução de crescimento, murchamento, enfraquecimento, perda de vigor, queda de produção e morte da planta infectada (LOPES; SANTOS, 1994; ASMUS, 2001).

2.2.1 Fitonematoides no cultivo do tomateiro

Os principais gêneros de nematoides que causam danos expressivos à cultura do tomateiro, em âmbito mundial, são *Meloidogyne*, *Belonolaimus*, *Trichodorus* e *Paratrichodorus* (PINHEIRO et al., 2014).

Os nematoides-das-galhas, espécies do gênero *Meloidogyne*, são os de maior importância econômica para a cultura do tomateiro, podendo resultar em perdas de produtividade na ordem de 40% (ANWAR; MCKENRY, 2012; SHARMA; SHARMA, 2015).

No Brasil, as espécies de *Meloidogyne* que mais causam prejuízos à cultura do tomateiro são *M. incognita* (raças 1, 2, 3 e 4), *M. javanica, M. arenaria* e *M. hapla* (PINHEIRO et al., 2014). A capacidade de sobrevivência e desenvolvimento em vários tipos de solo, também contribuem para ampliar a dispersão e a ocorrência destas espécies de nematoides. No entanto, os danos econômicos ocorrem com maior intensidade em regiões de clima quente, com solos arenosos, descompactados e que apresentam baixos teores de matéria orgânica (LORDELLO, 1986; PINHEIRO et al., 2014).

A duração do ciclo de vida dos nematoides-das-galhas é influenciada por fatores como temperatura, umidade e a suscetibilidade da planta hospedeira. Para as espécies *M. arenaria, M. incognita e M. javanica*, a faixa ideal de temperatura é de 25 a 30ºC (FERRAZ; MONTEIRO, 2011). De modo geral, o ciclo de vida se completa em intervalos de 3 a 4 semanas (TAYLOR; SASSER, 1978).

O ciclo de vida de *Meloidogyne* spp. é constituído pela fase embrionária no ovo, quatro estágios juvenis (J1, J2, J3, J4) e a fase adulta (MOTA, 2015). Os ovos dos nematoides-das-galhas são depositados pela fêmea, em uma massa gelatinosa, na superfície das raízes da planta hospedeira. Essa massa gelatinosa, além de oferecer proteção contra os inimigos naturais, também atua contra a desidratação e eventuais condições externas desfavoráveis, fazendo com que o nematoide sobreviva no solo por longo período de tempo (GONÇALVES, 2014; PINHEIRO et al., 2014). Cada fêmea é capaz de produzir cerca de 400 ovos, resultando em aumento rápido da população do nematoide (FERRAZ; MONTEIRO, 2011).

Dentro de cada ovo, ocorre à formação do juvenil de primeiro estádio (J1), que sofre uma ecdise e se transforma em juvenil de segundo estagio (J2). Este que representa a forma infectiva, eclode, depois de perfurar a casca do ovo com seu estilete e passa a migrar no solo à procura de raízes de uma planta que possa hospedá-lo (GONÇALVES, 2014; PINHEIRO et al., 2014).

O J2 de *Meloidogyne* spp. pode sobreviver no solo, num estado quiescente, por longo período. Entretanto, durante tal período, ele consome suas reservas nutricionais, estocadas no intestino, e sua infectividade pode ser reduzida (FORMENTINI, 2012; GONÇALVES, 2014). Os machos participam menos no ciclo de vida, em relação às fêmeas, uma vez que a maioria das espécies se reproduz por partenogênese, sem a necessidade de copulação (PINHEIRO et al., 2014).

Por meio da percepção de substâncias exsudatas pelas raízes, o J2 se orienta para encontrar a planta hospedeira. A penetração dos nematoides-das-galhas é rápida e ocorre nas zonas de alongamento das raízes (GONÇALVES, 2014). Há pouca diferença, com relação a atratividade das raízes, entre plantas suscetível e resistente. No entanto, quando ambas estão presentes, a suscetível é preferida pelo nematoide (FORMENTINI, 2012). O J2, através do seu estilete, penetra nas raízes e se movimenta inicialmente pelo parênquima cortical. Ao se posicionar próximo ao cilindro central vascular, induz o sítio de alimentação, tornando-se sedentário (HUSSEY; GRUNDLER, 1998).

O sítio de alimentação consiste na modificação das células radiculares, mediante a liberação pelo estilete de substâncias secretadas pelas glândulas esofagianas. Estas substâncias induzem a planta hospedeira a realizar continua divisão celular ao redor da área parasitada, formando as galhas, um grupo de células ditas como nutridoras, hipertrofiadas. Estas células apresentam alta atividade metabólica, citoplasma denso e multinucleado, para garantir a alimentação dos fitonematoides (FARIA et at., 2003; WILLIAMSON; GLEASON, 2003; FERRAZ; MONTEIRO, 2011).

Depois de penetrar no tecido do hospedeiro e estabelecer o sítio de alimentação, o J2 sofre algumas mudanças morfológicas, tornando-se adulto (GONÇALVES et al., 2014). A fêmea adulta permanece na planta e passa da forma vermiforme para o formato de cabaça ou piriforme. Diferentemente, o macho adulto apresenta corpo longo e vermiforme e abandona o sistema radicular (MOTA, 2015).

Os sintomas causados pelos nematoides-das-galhas nas raízes são característicos. Como resultado do processo de alimentação, geralmente, as galhas são formadas no sistema radicular da planta infectada (FORMENTINI, 2012). Estas modificações e deformações nas raízes reduzem a absorção de água e nutrientes pela planta hospedeira. Em consequência, gera um quadro de deficiência nutricional e desequilíbrio hídrico, que compromete o crescimento da planta e desencadeia o amarelecimento nas folhas, murchamento da planta nas horas mais quentes do dia, abscisão foliar prematura, redução de produtividade e, até mesmo, a morte da planta em áreas severamente infestadas (ASMUS, 2001; FERRAZ; MONTEIRO, 2011; PINHEIRO et al., 2014).

Em áreas agrícolas, com incidência de nematoides-das-galhas os sintomas iniciais costumam aparecer em forma de “reboleiras”, devido a irregular distribuição populacional dos fitonematoides no solo. A infestação promove a concentração de plantas com desuniformidade de crescimento, de aspecto amarelado e sistema radicular reduzido e deformado. (FERRAZ; MONTEIRO, 2011; SHARMA; SHARMA, 2015).

2.3 Métodos de controle da meloidoginose

O controle de fitonematoides tem sido vastamente pesquisado nos últimos anos. Busca-se alternativas de controle que sejam mais eficientes, econômicas e sustentáveis (SILVA, 2015). No entanto, a supressão de fitonematoides é uma prática difícil, muitas vezes onerosa e que demanda tempo (VAZ et al., 2011).

A exclusão é uma medida de controle de fitonematoides, que objetiva evitar a entrada e o estabelecimento do patógeno na área. Porém, apesar dos fitonematoides se moverem lentamente e a curtas distâncias no solo, outras formas de dispersão, como movimentação do solo, água da chuva e irrigação, ventos, animais, materiais vegetais, tráfego de pessoas, máquinas e implementos agrícolas, podem provocar, de forma passiva, a disseminação de fitonematoides a longas distâncias, introduzindo-os em diferentes regiões (SILVA, 2011).

Desta forma, medidas de controle são necessárias e devem ser adotadas, visando reduzir as populações de fitonematoides em áreas infestadas. Entre os métodos mais utilizados no controle de fitonematoides, em diferentes

culturas, se destacam o uso de cultivares resistentes, a rotação de culturas, o manejo do solo e os controles químico e biológico (MACHADO et al., 2012; SILVA, 2015).

A utilização de cultivares resistentes é uma maneira natural, sustentável e altamente recomendável, para adoção em áreas com incidência de nematoides. No entanto, as cultivares resistentes disponíveis no mercado ainda são limitadas, sendo a resistência geralmente direcionada as espécies de nematoides mais importantes para determinadas culturas, com recomendação restrita a regiões e épocas de plantio. Outro problema é que a eficiência do uso de cultivares resistentes é prejudicada pela variabilidade genética dos nematoides e também pelas condições de campo desfavoráveis, como a alta temperatura do solo, que pode ocasionar a interrupção “quebra” da resistência (FREITAS, 2001; PINHEIRO et al., 2014).

A rotação de culturas com plantas resistentes, não hospedeiras e/ou antagônicas aos nematoides, também contribui para reduzir a população de nematoides no solo. Porém, para o controle de espécies do gênero *Meloidogyne*, que parasitam uma grande diversidade de hospedeiros, o método tem se mostrado pouco eficiente, em função da necessidade da utilização de culturas não econômicas (SILVA, 2011).

O controle químico é uma das alternativas mais utilizadas pelos agricultores, para o controle dos nematoides-das-galhas (SILVA, 2015). Contudo, os nematicidas químicos são produtos caros, altamente tóxicos e de amplo espectro de ação. Assim, podem causar sérios problemas ao meio ambiente, à saúde humana e a organismos benéficos do solo. Além disso, repetidas aplicações podem favorecer a seleção de biótipos resistentes, reduzindo a eficiência de controle desses produtos (VAZ et al., 2011).

Por outro lado, tem-se o controle biológico como opção ecológica para o manejo de fitonematoides (FREITAS, 2001). O controle biológico envolve o emprego de microrganismos antagonistas, principalmente fungos e bactérias, que podem, atuar como nematicidas, pela produção de compostos tóxicos (SILVA, 2011; VAZ et al., 2011; PODESTA, 2015) ou, somente alterar a orientação do parasita em direção às raízes da planta hospedeira no solo (ARAUJO et al., 2002). No controle biológico, os danos ambientais e a seleção de populações de fitonematoides resistentes são minimizados.

2.3.1 Resistência genética do tomateiro aos nematoides

A resistência de planta baseia-se em barreiras e mecanismos de defesa, comandados pela ativação de genes, capazes de restringir, ou mesmo prevenir, a multiplicação de um determinado nematoide em seus tecidos (TRUDGILL, 1991; SANTINI, 2014). A tolerância ao dano é independente da resistência. A tolerância é à habilidade da planta hospedeira em compensar ou desenvolver-se mesmo após a infecção do nematoide (TRUDGILL, 1991).

As plantas resistentes, geralmente são mais tolerantes às injúrias causadas pelos nematoides, pois ocasionam um menor desenvolvimento e reprodução destes parasitas no sistema radicular. Deste modo, as plantas conseguem manter o crescimento vegetativo e produção normais, mesmo sob condições de altas infestações (SANTINI, 2014). A resistência em plantas pode ser dividida em dois tipos: a pré-infectiva, que ocorre antes da penetração do fitonematoide nas raízes, com a produção de substâncias repelentes ou tóxicas e a resistência pós-infectiva, onde as ações de defesa da planta ocorre após a penetração do parasita nos tecidos vegetais (SILVA, 2015).

A resistência a nematoides-das-galhas, no tomateiro, é caracterizada como pós-infectiva e foi descoberta por Smith em 1944, em acesso selvagem de *Solanum peruvianum.* A resistência, conferida pelo gene *Mi,* posteriormente foi introgredida na espécie *Solanum lycopersicum* L., a partir de cruzamentos interespecíficos (JACQUET et al., 2005).

Os genes que contemplam a resistência apresentam oito alelos (*Mi*-1 a *Mi*-8). No entanto, o gene dominante *Mi*-1*,* localizado no cromossomo 6, é o mais utilizado em cruzamentos para o desenvolvimento de cultivares comerciais de tomateiro. Este gene confere resistência às três espécies mais importantes de nematoides das galhas: *M. incognita, M. javanica* e *M. arenaria* (PINHEIRO et al., 2014; SILVA et al., 2008).

A resistência da planta portadora do gene *Mi* está associada a uma reação de hipersensibilidade (RH), caracterizada por mudanças histológicas nas pontas das raízes. Tais mudanças provocam a morte celular, próximo ao sítio de infecção do juvenil de segundo estádio de *Meloidogyne* spp. e reduzem a capacidade de reprodução do nematoide na planta hospedeira (DROPKIN, 1969;

SILVA et al., 2008; CARVALHO et al., 2015). Assim, o J2 não consegue estabelecer o sítio de alimentação e, consequentemente, morre ou abandona o sistema radicular (PAULSON; WEBSTER, 1972).

Desta forma, em tomateiro resistente, o nematoide penetra na raiz e migra até o córtex central, para o estabelecimento do sítio de alimentação, assim como ocorre em plantas suscetíveis (GONÇALVES, 2014). No entanto, nenhuma célula nutridora será iniciada, pois há o reconhecimento das substâncias secretadas pelas glândulas esofágicas do nematoide pela proteína de resistência, mediada pelos genes R. Esta proteína detecta as moléculas elicitoras, desencadeando uma via de sinalizações de defesa, que inicia a ativação da reação de hipersensibilidade, promovendo a apoptose celular localizada (WILLIAMSON; ROBERTS, 2009; GONÇALVES, 2014).

Pesquisas moleculares revelam que plantas portadoras do gene *Mi* codificam proteínas com repetição rica em leucina (LRR) ligada a nucleotídeos (NBS). Estas proteínas, estão, possivelmente, localizadas no citoplasma ou na membrana plasmática e possuem interações complexas com outras proteínas, que são capazes de receptam as substâncias produzidas pelo nematoide, durante a infecção, e ativam as mensagens para o interior celular, iniciando o sistema de defesa da planta (WILLIAMSON; ROBERTS, 2009).

A ativação dos genes de defesa em planta resistente, ocorre de forma rápida. O fenômeno é reportado em um período de 12 horas, após a tentativa de infecção ou movimentação do nematoide no interior da raiz (PAULSON; WEBSTER, 1972; MELILLO et al., 2006). Porém, a eficiência do gene *Mi* está diretamente relacionada com a espécie e o nível populacional do nematoide-das-galhas no solo, com a cultivar e, também, com as condições ambientais, principalmente a elevação de temperatura no solo (GONÇALVES, 2014; CARVALHO et al., 2015).

Segundo Jacquet et al. (2005), embora a proteína seja ainda altamente eficiente, na maioria dos casos, em bloquear o desenvolvimento de nematoide-das-galhas em estágio inicial, a reprodução do nematoide em genótipos de tomateiros portando o gene *Mi,* tem sido documentada. O uso contínuo e sucessivo destes materiais em áreas infestadas, pode levar à seleção de espécies e raças de *Meloidogyne* spp. virulentas, comprometendo a durabilidade da resistência (CARNEIRO; MORAES, 1993, JACQUET et al., 2005). Além disso, também têm sido descritas como limitações para utilização do gene *Mi,* a incapacidade do gene

em controlar o *M. hapla*, *M enterolobii* e outras populações geograficamente isoladas de nematoides-das-galhas (FARIA et al., 2003; PINHEIRO et al., 2014; SILVA, 2015).

2.3.2 Controle Biológico

O controle biológico consiste na limitação de uma espécie por indivíduos ou organismos de ocorrência natural no ambiente. Os mecanismos de ação, envolvem relações antagonistas, como antibiose, competição, parasitismo, predação, virulência e indução de resistência sistêmica (BETTIOL; GHINI, 2009; SILVA, 2011). Segundo Vaz et al. (2011), o controle biológico é uma alternativa eficaz, de fácil aplicação e ecologicamente sustentável para redução de populações de nematoides.

Diferentes organismos são considerados inimigos naturais de fitonematoides. Já foram descritos como agentes de ação regulatória de nematoides fungos, bactérias, nematoides predadores, ácaros, vírus e outros (CARNEIRO, 1992; VAZ et al., 2011). Os fungos e as bactérias, são os mais pesquisados atualmente e têm mostrado alto potencial para utilização, como produtos comerciais, no controle de fitonematoides (SILVA, 2011).

Os fungos representam cerca de 75% dos antagonistas de fitonematoides já identificados. Por habitarem, normalmente, o solo, podem ser parasitas de ovos e fêmeas, predadores de juvenis, adultos ou cistos, ou ainda podem produzir compostos tóxicos a nematoides. Dentre os fungos mais promissores no controle biológico de fitonematoides, estão os parasitas de ovos e fêmeas, *Paecilomyces lilacinus* e *Pochonia chlamidosporia,* e os que produzem metabólitos tóxicos, (*Aspergillus, Pleurotus, Penicillium, Trichoderma*, *Myrothecium* e dentre outros gêneros) (COSTA, 2015).

Entre as bactérias, destacam-se como agentes de controle biológico de fitonematoides as rizobactérias, espécies que colonizam a rizosfera e a endorizosfera de plantas (MACHADO et al., 2012; PODESTA, 2015). Estirpes pertencentes aos gêneros *Agrobacterium, Azospirillum, Bacillus, Burkholderia*, *Pausteria*, *Pseudomonas* e *Serratia* foram relatadas como tendo atividades

protetora, elicitora de resistência e nematicida (FREITAS et al., 2005; MACHADO et al., 2012; SILVA, 2011; KUMAR et al., 2011; SHARAF et al., 2016).

2.3.2.1 *Bacillus subtilis*

As espécies do gênero *Bacillus* são bactérias Gram positivas, pertencentes à família *Bacillaceae,* com célula em forma de bastonete, móveis, de crescimento aeróbico ou anaeróbico facultativo e capazes de formarem endósporos que lhe conferem resistência a condições ambientais desfavoráveis, principalmente, altas temperaturas (CARBALLIDO LÓPEZ; FORMSTONE, 2007; SILVA, 2015).

As bactérias deste gênero são amplamente encontradas no solo, mais especificamente na região da rizosfera, onde compostos exsudatos pelo sistema radicular das plantas, como açúcares, aminoácidos e ácidos orgânicos estimulam a colonização microbiana (KUMAR et al., 2011; MOTA, 2015). Estas bactérias demonstram capacidade de colonizar a zona da rizosfera e endorizosfera vegetal, formando um biofilme ao redor das raízes. Consequentemente, podem promover um melhor desenvolvimento e proteção da planta contra nematoides-das-galhas (KILIAN et al., 2000; CETINTAS et al., 2018).

A utilização de estirpes de *Bacillus subtilis,* na agricultura, tem sido relacionada à promoção de crescimento de plantas e ao uso no controle biológico de patógenos (MACHADO et al., 2012; KUMAR et al., 2011). Os principais mecanismos de promoção de crescimento atribuídos a essas rizobactérias, incluem a solubilização e disponibilização de nutrientes, a síntese de fitormônios, a melhoria das condições do solo, a inibição da síntese de etileno e o biocontrole de pragas e doenças (LANNA FILHO et al., 2010; KUMAR et al., 2011).

O controle biológico e a proteção de plantas, pela utilização de isolados de *B. subtilis,* são reconhecidos por múltiplos mecanismos de ação como: antagonismo, antibiose, produção de enzimas e compostos tóxicos, alteração de exsudatos radiculares e indução de resistência sistêmica vegetal (FREITAS et al., 2005; MACHADO et al., 2012). Os produtos metabolizados por essas rizobactérias, como enzimas, antibióticos, lipopeptídeos cíclicos e outras moléculas menores, como compostos voláteis, podem agir de forma específica no controle de fitonematoides (TSUGE et al., 2001; LANNA FILHO et al., 2010).

O efeito do *B. subtilis* sobre a reprodução de nematoides-das-galhas, vem sendo comprovado em diferentes culturas. A ação regulatória sobre juvenis, massas de ovos e sobre a formação de galhas no sistema radicular, tem sido atribuída à liberação de substâncias tóxicas pelas bactérias e a indução de resistência na planta (ARAÚJO; MARCHESI, 2009; ABBASI et al., 2014; CETINTAS et al., 2018).

Sharma e Gomes (1996) relataram que a produção de endotoxinas por *B. subtilis,* no solo, interfere no ciclo reprodutivo dos nematoides, principalmente na oviposição e na eclosão de juvenis. Estudos revelam que enzimas produzidas por essas bactérias, na região da rizosfera das plantas, podem degradar a massa protetora que envolve os ovos dos nematoides e assim inviabilizar a eclosão, por desidratação (ARAÚJO; MARCHESI, 2009; CETINTAS et al., 2018).

Raut (2014), ao aplicar *B. subtilis* no solo, no momento do transplantio das mudas e depois aos 30 dias, verificou ganhos no crescimento da parte área e das raízes de plantas de tomateiro. O estímulo de crescimento das plantas foi atribuído à maior redução a formação de galhas e à diminuição da população de *Meloidogyne incognita*.

Araújo e Marchesi (2009), utilizando a estirpe PRBS-1 de *B. subtilis* para o tratamento de solo naturalmente infestado por nematoides, observaram redução na reprodução de *Meloidogyne* spp. em raízes de plantas de tomateiro, cultivado em condições de casa de vegetação. Segundo os autores, a presença de *B. subtilis* na rizosfera das plantas induz a degradação de exsudatos radiculares e provoca à desorientação do nematoide. Desse modo, o reconhecimento quimiotrópico emitido pelas raízes é interrompido e a população de nematoides no solo é reduzida pelo não parasitismo.

2.4 Alterações bioquímicas relacionadas à resistência em plantas

Substâncias produzidas pelo fitonematoide causam modificações na morfologia e fisiologia da planta. Em consequência a produção de substâncias bioquímicas, envolvidas na defesa da planta são afetadas. A geração de espécies reativas de oxigênio, na promoção da resposta de hipersensibilidade, a liberação de fitoalexinas, enzimas, proteínas e aminoácidos, têm sido associadas à resistência da

planta para suportar a infecção por nematoides (ABBASI et al., 2014; ALI et al., 2017).

As substâncias elicitoras produzidas pelo nematoide na superfície celular ou no citoplasma da planta, são interceptadas por proteínas receptoras. Estas que iniciam os processos ligados a defesa do hospedeiro e levam à ativação de fatores de transcrição de genes específicos. A partir deste processo de reconhecimento, a sinalização das vias de defesa da planta é iniciada, incluindo a produção de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico, a presença de alterações nos níveis de Ca^{2+} no citoplasma, a deposição de calose na parede celular, a produção de ácido salicílico, compostos fenólicos e outros metabólitos que em conjunto levam a uma interrupção ou barreira, suprimindo ou impedindo o crescimento do patógeno invasor (WILLIAMSON; ROBERTS, 2009; SHUKLA et al., 2018).

De acordo com Aldon et al. (2018), os primeiros eventos de sinalização que coordenam as respostas adaptativas ao estresse causado pelos nematoides, são as espécies reativas de oxigênio (EROs) e os íons de cálcio (Ca^{2+}). A explosão oxidativa, ocasionada pelo acúmulo das EROs como o superóxido (O_2^-) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), são ações precursoras de respostas fisiológicas na planta. Estas ações são responsáveis pelo fortalecimento da parede celular vegetal, pela liberação de compostos sinalizadores de defesa e também pela indução da reação de hipersensibilidade (MILILLO et al., 2006).

Alterações nas células vegetais, pelo desenvolvimento da reação de hipersensibilidade, permitem a morte celular localizada dos tecidos vegetais, ao redor do sítio de infecção. Assim, restringem o crescimento e a disseminação do patógeno na planta hospedeira (MILILLO et al., 2006). Além do aumento rápido e transitório de agentes oxidantes nas células hospedeiras, também estão relacionadas à reação de hipersensibilidade, as alterações no potencial transmembrânico e a alcalinização extracelular, devido a ganhos de íons de H^+ e Ca^{2+} e perdas de K^+, destruição de compartimentos celulares, espessamento das paredes celulares e a modulação de atividades de enzimas antioxidantes (RESENDE et al., 2007; BARROS et al., 2010).

Apesar de serem importantes agentes sinalizadores, as EROs ocorrem normalmente no metabolismo celular da planta. No entanto, devido a um desequilibro entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes, elas se

acumulam nas células vegetais e tornam-se tóxicas (RESENDE et al., 2003). Para minimizar os danos causados pelo estresse oxidativo, as plantas desenvolveram mecanismos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, capazes de neutralizar a citotoxidade das EROs. Os sistemas antioxidantes enzimáticos são compostos por superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX), glutationa redutase (GR), peroxidases (PO), catalase (CAT) e polifenoloxidase (PPO). Dentre os mecanismos não enzimáticos, destacam-se o ascorbato (AsA), a glutationa (GSH), o β-caroteno e o α-tocoferol (BARBOSA et al., 2014).

Segundo Melillo et al. (2006), a supressão dos mecanismos desintoxicantes das EROs são cruciais para o início da morte celular localizada, em reações de resistência. Quando o nematoide é detectado pelas células radiculares a resposta de hipersensibilidade é induzida e a planta passa a acumular, inicialmente, mais H_2O_2. Assim durante a resposta de defesa, a planta simultaneamente produz mais EROs e diminui sua capacidade de elimina-la, ocorrendo o acúmulo de radicais livres e ativação da morte celular localizada.

Zacheo et al. (1982) verificaram, comparando cultivares de tomateiro resistentes e suscetíveis a nematoides-das-galhas, que as enzimas superóxido dismutase e peroxidase desempenham funções metabólicas importantes no mecanismo de defesa naquele patossistema. De acordo com os autores, as células radiculares de plantas resistentes reage à presença do nematoide, desenvolvendo uma alta atividade da peroxidase e, consequentemente, uma maior quantidade de radicais livres é produzida. Estes radicais são a base do mecanismo pelo qual o patógeno é inativado pelas células hospedeiras. Além disso, nas cultivares resistentes, o processo de defesa é facilitado pela diminuição na atividade da superóxido dismutase. Essa enzima transforma os superóxidos em peróxido de hidrogênio, eliminando-os prontamente via catalase.

Além das mudanças enzimáticas, a planta quando exposta a condições estressantes, também pode acumular substâncias solúveis, como os aminoácidos. Os aminoácidos são compostos orgânicos de baixo peso molecular e constituintes de proteínas, que desempenham funções metabólicas importantes para o desenvolvimento e defesa da planta. Na adaptação da planta a estresses abióticos e bióticos, a prolina desempenha função osmoprotetora e tem à capacidade de equilibrar a homeostase intracelular, minimizar à desidratação e o estresse oxidativo (HAYAT et al., 2012).

Os mecanismos de sinalização conhecidos, pelos quais os estresses ambientais podem induzir a biossíntese de prolina em plantas, incluem o ácido abscísico, o cálcio e a fosfolipase C (LIANG et al., 2013). O fluxo metabólico da prolina leva à proteção celular, ajudando a planta a manter a energia e o balanço $NADP^+$ / NADPH, ativando vias de sinalização que podem desencadear a resposta de hipersensibilidade ou promover a regulação do redox intracelular potencial (REJEB et al., 2014).

Meon et al. (1978), inoculando plantas de tomateiro com diferentes concentrações de *Meloidogyne javanica*, observaram que os níveis de prolina livre foram mais prevalentes nas raízes, do que nas folhas de plantas infectadas pelos nematoides. Tanto nas folhas quanto nas raízes, a concentração do aminoácido foi superior, com o aumento da densidade do inóculo. Apesar de haver poucas informações sobre o conteúdo de prolina em folhas de plantas infectadas por nematoides, a síntese deste aminoácido, em condições de estresse, tem sido correlacionada à osmorregulação, à reparação celular e à sinalização molecular, no desencadeamento de mecanismos de defesa.

3 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do modo de aplicação de *Bacillus subtilis,* no controle de *Meloidogyne* spp., e sobre alterações na colonização da rizosfera, no crescimento, nutrição e na atividade enzimática de plantas de tomateiro tolerante e suscetível.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Condução experimental

Foram conduzidos dois experimentos consecutivos, em câmara de crescimento de plantas (Fitotron), com condições ambientais controladas: no primeiro, utilizou-se substrato estéril, com inoculação do nematoide e no segundo, foi utilizado solo com infestação natural de nematoides-das-galhas. Para realização do primeiro experimento, o substrato comercial (Carolina Soil), composto por turfa, vermiculita e composto orgânico, foi esterilizado em autoclave à uma temperatura de 121ºC, por duas horas. Para a infestação do substrato, foi utilizado o inóculo de *Meloidogyne incognita,* raça 3, obtido a partir de uma população pura mantida pela Embrapa Soja, em Londrina-PR, multiplicada em soja suscetível.

Para a inoculação, os ovos de *M. incognita* foram extraídos das raízes de soja, utilizando a metodologia de Hussey e Barker (1973), modificada por Bonetti e Ferraz (1981). A quantificação foi realizada em câmara de Peters, com o auxílio de microscópio óptico e a infestação do substrato esterilizado foi realizada duas horas antes do transplante das mudas de tomate. Em cada vaso, foram colocados 5000 ovos, distribuídos a um raio de 7 cm do caule da planta.

No segundo experimento, o solo naturalmente infestado foi coletado em Presidente Prudente – SP (22°09’21.2’’ S, 51°26’40.6’’ W e 383 m de altitude), em área em pousio por dois anos, anteriormente cultivada com tomate. A densidade populacional do nematoide era de 480 formas ativas de *Meloidogyne* spp. por 100 g de solo. Os nematoides foram extraídos do solo, pela técnica descrita por Jenkins (1964). Posteriormente, a espécie de *Meloidogyne* foi classificada, com base na configuração morfológica e quantificada por contagem em câmara de Peters, sob microscópio óptico. O solo utilizado foi caracterizado como Argissolo Vermelho distroférrico (EMBRAPA, 2006), de textura arenosa, com boa drenagem. A análise de fertilidade do solo foi determinada segundo Raij et al. (2001) (Tabela1).

TABELA 1 - Análise química do solo coletado no município de Presidente Prudente – SP, com incidência natural de *Meloidogyne* spp.

pH em ($CaCl_2$)	M.O.	P	$S\text{-}SO_2^{-4}$	Al^{3+}	H+Al	K	Ca	Mg	SB	CTC	M	V
	g dm^{-3}	----- mg dm^{-3} -----		---------- $mmol_C$ dm^{-3} ----------							%	
6,4	11,6	422,1	3,6	0,4	8,9	1,6	64	14	79,7	88,6	0,5	89,9

Fonte: Laboratório de Análise de solos e Tecido Vegetal, Faculdade de Ciências Agrárias da Unoeste.

Os experimentos foram conduzidos em delineamento experimental inteiramente casualizado, com distribuição em arranjo fatorial 2 (cultivares de tomateiro) x 3 (tratamentos), com seis repetições, totalizando 36 parcelas por cada experimento.

4.2 Cultivares de tomateiro

Foram utilizadas duas cultivares de tomateiro de crescimento determinado: a cultivar BSDI0038, tolerante às principais espécies de *Meloidogyne* e a cultivar Kátia, suscetível aos nematoides-das-galhas. As sementes das cultivares foram fornecidas pela empresa Blueseeds®. A semeadura foi realizada em substrato, acondicionado em bandejas plásticas de polipropileno, mantidas em casa de vegetação de viveiro comercial. Aos 35 dias após a semeadura, nos tratamentos com aplicação da bactéria em pré-plantio, as mudas de tomate receberam o tratamento e foram transplantadas para os vasos, com capacidade de 3 L, previamente desinfestados com hipoclorito de sódio a 5%, sendo mantida uma planta por vaso.

4.3 Aplicação de *Bacillus subtilis*

Os modos de aplicação da rizobactéria consistiram em: inoculação de *B. subtilis* em pré-plantio e inoculação de *B. subtilis* em pós-plantio. Para a aplicação da rizobactéria foram utilizados o isolado de *B. subtilis* AP-3, promotor de crescimento de plantas caracterizado por Araújo et al. (2005).

O isolado bacteriano foi multiplicado em placas de Petri com meio de cultura sólido ágar nutriente (3 g L^{-1} de extrato de levedura, 5 g L^{-1} de peptona e 20 g

L^{-1} de ágar). As placas foram mantidas em estufa por 48 horas, a 32° C. Após este período, as colônias bacterianas foram raspadas e transferidas para 100 mL de água salina ($MgSO_4$ $7H_2O$, 0,01 M) esterilizada. Na sequência, a suspensão foi agitada em vortex®, para total dispersão bacteriana. Pelo método de diluição seriada e plaqueamento, a concentração da suspensão bacteriana foi ajustada para aproximadamente 5,0 x 10^8 UFC (unidades formadoras de colônias) mL^{-1}.

A inoculação de *B. subtilis* em pré-plantio, consistiu na aplicação de 5,0 µL da suspensão bacteriana por célula da bandeja. A dose foi diluída em 1 mL de água destilada esterilizada e aplicada ao redor do colo da planta, visando maior dispersão na rizosfera. A inoculação da rizobactéria em pré-plantio foi realizada 24 horas antes do transplantio das mudas de tomateiro nos vasos.

Para o tratamento, com inoculação do *B. subtilis* em pós-plantio, foram aplicados 2 mL da suspensão bacteriana $vaso^{-1}$, sem diluição, num raio equidistante a 5 cm das plantas recém transplantadas.

As doses utilizadas em ambos tratamentos foram proporcionais ao volume das células da bandeja de produção de mudas e vasos de cultivo do tomateiro, respectivamente.

4.4 Condução e avaliações do tomateiro

As plantas foram mantidas em câmara de crescimento por 40 dias, sob iluminação artificial de 250 µmol m^{-2} s^{-1}, com fotoperíodo de 12 h, temperatura diurna de 29° C e noturna de 23° C, umidade relativa do ar a 70% e reposição periódica de umidade do solo. Os vasos foram dispostos aleatoriamente e casualizados semanalmente.

Os parâmetros avaliados no tomateiro aos 40 dias após o plantio (DAP) foram altura de plantas, diâmetro de caule, massa seca da parte aérea e massa fresca radicular. Para as atribuições fisiológicas, foram determinados o teor relativo de clorofila total, análises nutricionais e análises bioquímicas foliares.

Para avaliação da altura de planta, foi utilizado uma trena graduada, medindo-se do colo da planta à gema apical. O diâmetro de caule foi determinado pela medida da base da planta com o auxílio de paquímetro.

O teor relativo de clorofila total nas folhas foi determinado, por método não destrutivo, utilizando clorofilômetro portátil digital, modelo ClorofiLOG CFL 1030,

da marca Falker®. Esse equipamento mede a transmitância de luz através da folha, gerando um índice de clorofila (IC), em escala de 0 a 100. As leituras foram efetuadas aos 30 DAP, na terceira e quarta folha completamente expandida, a partir do ápice da planta de tomateiro. Foram avaliados cinco folíolos, sendo dois de cada lado da folha e o folíolo terminal central. Foi estimada a média entre os cinco folíolos, de modo a representar toda a superfície da folha amostrada, como realizado por Fontes e Araújo (2007).

Para realização das análises bioquímicas, aos 40 DAP, amostras foliares do terço médio da planta de tomateiro, foram coletadas e rapidamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C, até o processamento. Em seguida, as plantas foram coletadas, separando-se a parte aérea das raízes. A parte aérea foi seca, em estufa com circulação forçada de ar a 60°C, até o peso constante e posteriormente pesada. Amostras foliares da parte aérea, após a secagem, foram trituradas e submetidas a análise nutricional, para determinação dos teores de macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg e S), como proposto por Malavolta et al. (1997). As raízes frescas foram cuidadosamente lavadas, secas em papel toalha e pesadas.

4.4.1 Proteínas solúveis totais

A quantificação de proteínas solúveis totais foi determinada, de acordo com a metodologia proposta por Bradford (1976). Para obtenção do extrato, amostras de 250 mg do tecido foliar foram maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em 2 mL de tampão fosfato de potássio a 0,1 M, em pH 6,8, contendo 1% de polivinilpirrolidona (PVP). As amostras foram centrifugadas por 10 min a 7500 rpm, a 4°C, e o sobrenadante coletado foi mantido em gelo. A concentração de proteína solúvel, nos extratos, foi determinada em triplicata, realizando-se a leitura após 15 minutos em espectrofotômetro a 595 nm, utilizando albumina de soro bovino (BSA 0 – 15 μL^{-1}) como proteína padrão.

4.4.2 Teor de prolina

O teor do aminoácido prolina foi determinado, pela metodologia descrita por Bates et al. (1973), com preparação de extrato bruto de 100 mg de tecido foliar

macerados em 6 mL de ácido sulfosalicílico a 3%. O material obtido foi colocado em tubo de ensaio com 2 mL de ninidrina ácida, mais 2 mL de ácido ácetico glacial. As amostras foram mantidas em banho Maria a 100°C, por 1 hora. Em seguida, a solução foi resfriada em banho de gelo para a realização de leitura, efetuada em triplicata, em espectrofotômetro a 520 nm. As absorbâncias foram comparadas com a curva-padrão de prolina, e os resultados foram expressos em microgramas de prolina por grama de material fresco.

.

4.4.3 Atividade enzimática guaiacol peroxidase (GPX)

A atividade da guaiacol peroxidase (GPX, E.C. 1.11.1.7) foi determinada, pelo método espectrofotométrico direto (ARAÚJO et al., 2005), com algumas modificações. Amostras de 100 mg de tecido foliar foram maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em 2 mL de tampão fosfato de sódio (Na_2HPO/NaH_2PO_4) 0,01 moL L^{-1}, pH 6,0. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000 g, por 25 min, a 4°C. A reação consistiu na diluição de 0,1 mL do sobrenadante em 2,9 mL de tampão fosfato contendo 0,25% (v/v) de guaiacol e 0,1 M de peróxido de hidrogênio. A leitura de absorbância foi realizada após o período de 10 minutos, em espectrofotômetro a 470 nm. A atividade enzimática foi expressa em unidade de absorbância (UA) min^{-1} mg^{-1} de matéria fresca foliar (MF).

4.4.4 Atividade enzimática superóxido dismutase (SOD)

Para obtenção do extrato, amostras de 100 mg de folhas frescas foram maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em 2 mL de tampão fosfato de potássio a 0,1 M (pH 6,8), suplementado com 60 mg de PVP. O extrato foi centrifugado a 10.000 g, a 4ºC, durante 10 minutos. A atividade enzimática superóxido dismutase (SOD, E.C. 1.15.1.1) foi determinada, pela adição de 50 µL de extrato bruto a uma solução contendo 13 mM de metionina, 75 µM de azul de nitrotetrazólio (NBT), 100 nM de EDTA e 2 µM de riboflavina em 2,95 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7.8.

A reação foi iniciada pela iluminação dos tubos de ensaio, em câmara composta por lâmpadas fluorescentes (15 W), a 25 °C. A reação foi finalizada após

15 minutos de incubação pela interrupção da luz e o produto da reação foi determinado em espectrofotômetro a 560 nm (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977). Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para a inibição de 50% da fotorredução do NBT, nas condições do ensaio. Para o cálculo da atividade específica da enzima, consideraram se a percentagem de inibição obtida, o volume da amostra e a concentração de proteína na amostra (µg μL^{-1}).

4.5 Características sintomatológicas e quantificação de nematoides

Como indicativo sintomatológico de parasitismo do sistema radicular do tomateiro por *Meloidogyne* spp., foram avaliados, em ambos experimentos, o índice de galhas (IG) conforme a escala de notas proposta por Taylor e Sasser (1978), onde: 0 = ausência de galhas; 1 = presença de 1 a 2 galhas; 2 = 3 a 10 galhas; 3 = 11 a 30 galhas; 4 = 31 a 100 galhas e 5 = mais de 100 galhas.

Após a determinação do número de galhas, os sistemas radiculares foram submetidos a procedimentos de trituração, peneiramento e extração de formas ativas e ovos do nematoide, segundo Hussey e Barker (1973), modificada por Bonetti e Ferraz (1981). A determinação do número de formas ativas e ovos presentes nas raízes, foi obtida pela média da contagem de duas alíquotas de 1 mL em câmara de Peters, sob microscópio óptico, sendo os resultados expressos em gramas $raiz^{-1}$.

Para o experimento com a inoculação de *M. incognita* em substrato estéril, além das avaliações anteriores, também foram extraídos e quantificados o número de nematoides e ovos no substrato, conforme Jenkins (1964). Em seguida, foram calculados o fator de reprodução (FR) do nematoide, dividindo-se o valor da população final de cada tratamento pelo valor da população inicial (FR = Pf/Pi). A população final (Pf) foi obtida pela soma do número de ovos extraídos do substrato e das raízes de tomateiro e a população inicial (Pi) refere-se ao número de ovos utilizados na inoculação (OOSTENBRINK, 1966).

4.6 Colonização do gênero *Bacillus* spp.

As quantificações de unidades formadoras de colônias (UFC) nas amostras, foram determinadas pelo método de diluição seriada e contagem em placas. Para isso, foram coletadas amostras de substrato e solo aderido as raízes do tomateiro. Alíquotas de 10 g foram diluídas em erlenmeyer com 90 mL de solução salina esterilizada ($MgSO_4$ $7H_2O$, 0,01 M).

O material foi submetido a choque térmico, a 70°C por 10 minutos, visando à seleção de bactérias formadoras de esporos (BUCHANAN; GIBBONS, 1975). Em seguida, os erlenmeyers foram mantidos em agitador orbital por 30 minutos e em câmara de fluxo laminar, 1 mL da suspensão foi transferido para tubos de ensaio contendo 9 mL de solução salina estéril, de forma seriada.

O plaqueamento foi efetuado em duplicata, com a transferência de alíquotas de 0,1 mL das últimas diluições para placas de Petri, contendo meio ágar nutriente. As placas permaneceram incubadas em estufa a 32°C, por 72 horas. Após este período, as colônias formadas foram contadas e caracterizadas morfologicamente como pertencentes ao gênero *Bacillus*, de acordo com a metodologia descrita por Li e Alexander (1988).

Para a quantificação de bactérias presentes na região da rizosfera foi mantido o mesmo procedimento descrito anteriormente, porém foram utilizados 100 mg de raízes frescas, diluídas em tubos de ensaio contendo 9 mL de solução salina estéril. O resultado da contagem de colônias de bactérias foi expresso em UFC g^{-1} de raízes frescas.

4.7 Análises estatísticas

Os dados obtidos em cada experimento foram submetidos a análise de variância individual e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, por meio de programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000). Os dados referentes a formas ativas, número de ovos, fator de reprodução, colonização de *Bacillus* spp. no substrato e na rizosfera, prolina e guaiacol peroxidase (primeiro experimento) foram transformados em $\sqrt{x}$. No segundo experimento, os dados de formas ativas, colonização de *Bacillus* spp. do solo, teor

de enxofre, prolina e guaiacol peroxidase foram transformados em $\sqrt{x}$ e aqueles relativos à colonização de *Bacillus* spp. na rizosfera foram transformados em $\sqrt{x} + 1$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Experimento 1: Infestação de substrato esterilizado com *M. incognita*

Houve interação significativa entre os fatores cultivar de tomateiro e modo de aplicação de *B. subtilis*, para as variáveis massa fresca radicular, índice de galhas, fator de reprodução do *M. incognita* e colonização bacteriana do substrato. Para o fator modo de aplicação, houve significância nas variáveis altura de planta, formas ativas do nematoide, número de ovos e colonização bacteriana da rizosfera (Tabela 2).

TABELA 2 - Resumo da análise de variância (teste F) dos componentes de crescimento vegetativo das plantas, ao parasitismo do nematoide e à colonização bacteriana, em função dos modos de aplicação de *Bacillus subtilis,* em substrato esterilizado infestado com *Meloidogyne incognita*.

Fonte de variação	AP	DC	MSPA	MFR	FAN
Cultivar	27,04**	6,84*	55,29**	157,56**	20,27**
Modo de aplicação	4,19*	0,45 ns	0,64 ns	0,53 ns	6,63**
C x M	0,85ns	0,34 ns	0,93 ns	19,99**	0,94 ns
CV%	6,85	13,35	14,86	21,15	18,67
Fonte de variação	**NO**	**IG**	**FR**	**CBS**	**CBR**
Cultivar	5,02*	62,06**	1,61 ns	0,60 ns	14,93**
Modo de aplicação	34,05**	1,91 ns	5,12*	1,52ns	20,03**
C x M	0,45 ns	13,42**	24,5**	4,39*	2,18 ns
CV%	18,16	21,28	15,16	14,86	24,42

(AP) Altura de plantas, (DC) Diâmetro do caule, (MSPA) Massa seca da parte aérea, (MFR) Massa fresca radicular, (FAN) Formas ativas do nematoide, (NO) Número de ovos, (IG) Índice de Galhas, (FR) Fator de reprodução, (CBS) Colonização de *Bacillus* spp. no substrato, (CBR) Colonização de *Bacillus* spp. na rizosfera. *Significativo a 0,05 de probabilidade; ** Significativo a 0,01 de probabilidade e ns - Não significativo, pelo teste F.

A aplicação de *B. subtilis,* em pós-plantio, aumentou em 142% a massa radicular das plantas de tomateiro, cultivar BSDI0038, em relação ao controle. Por outro lado, para a cultivar Kátia, nas duas formas de aplicação, ocorreu diminuição na massa fresca radicular (Tabela 3).

Na avaliação da sobrevivência de *Bacillus* spp. no substrato estéril, aos 40 DAP, foi observada maior colonização da bactéria quando o isolado de *B. subtilis* foi aplicado em pós-plantio, apenas em plantas cultivar Kátia. Além disso, a presença de *Bacillus* spp. foi maior na cultivar suscetível, em comparação com o cultivar tolerante, (Tabela 3).

TABELA 3 - Influência do modo de aplicação de *Bacillus subtilis* sobre a massa fresca radicular (MFR) de cultivares de tomateiro e colonização de *Bacillus* spp. em substrato esterilizado (CBS), sob infestação de *Meloidogyne incognita*, aos 40 DAP.

	MFR (g)		CBS (UFC 10^6 g^{-1} substrato)	
Tratamentos	Kátia	BSDI0038	Kátia	BSDI0038
Controle	11,35 aA	2,08 bB	1,95 cB	2,3 aA
B. subtilis pré-plantio	9,00 bA	3,59 abB	3,05 bA	2,98 aB
B. subtilis pós-plantio	7,33 bA	5,03 aB	3,67 aA	3,11 aB
CV%	21,15		28,34	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de significância.

A aplicação da rizobactéria, independentemente do método utilizado, reduziu o índice de galhas e o fator de reprodução do nematoide na cultivar Kátia, mas na cultivar BSDI0038 houve aumento do fator de reprodução (Tabela 4).

TABELA 4 – Influência do modo de aplicação de *Bacillus subtilis* sobre o índice de galhas (IG) e fator de reprodução (FR) de *Meloidogyne incognita,* em cultivares de tomateiro, aos 40 DAP.

	IG		FR	
Tratamentos	Kátia	BSDI0038	Kátia	BSDI0038
Controle	4,42 aA	1,50 aB	11,03 aA	4,50 bB
B. subtilis pré-plantio	3,17 bA	2,20 aB	7,43 bA	5,91 abA
B. subtilis pós-plantio	2,83 bA	2,16 aA	3,01 cB	7,29 aA
CV%	21,28		15,16	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 1% de significância.

Entre os modos de aplicação, o tratamento com *B. subtilis,* em pré-plantio, proporcionou maior crescimento da planta, aumentando em 8% a altura de planta, aos 40 DAP (Tabela 5). A inoculação da rizobactéria, em pós-plantio, proporcionou redução média de 45% no número de formas ativas de *M. incognita,* nas raízes do tomateiro (Tabela 5).

As aplicações de *B. subtilis,* em pré e pós-plantio, reduziram o número de ovos de *M. incognita* nas raízes do tomateiro em 64 e 62%, respectivamente, e promoveram aumento da colonização por *Bacillus* spp. na região da rizosfera das cultivares, mas não houve diferença entre as formas de aplicação (Tabela 5).

TABELA 5 - Valores médios de altura de plantas (AP), formas ativas do nematoide (FAN), número de ovos (NO) e colonização de *Bacillus* spp. na rizosfera (CBR) em cultivares de tomateiro, em razão da variação no modo de aplicação de *Bacillus subtilis*, em substrato esterilizado infestado com *Meloidogyne incognita*, aos 40 DAP.

	AP	FAN	NO	CBR
Tratamentos	(cm)	(g^{-1} de raiz)		(UFC 10^7 g^{-1} de raiz)
Controle	44,70 b	44,54 a	432,72 a	0,96 b
B. subtilis pré-plantio	48,17 a	33,55 ab	156,98 b	2,29 a
B. subtilis pós-plantio	45,25 ab	25,18 b	166,17 b	2,86 a
CV%	6,85	18,67	18,16	24,42

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Nas comparações pelo teste F, quanto ao índice clorofilométrico e teores de macronutrientes, apenas houve significância para o índice clorofilométrico e teores de potássio e cálcio foliar (Tabela 6).

TABELA 6 - Resumo da análise de variância (teste F) para o teor relativo de clorofila total (CT) e macronutrientes nas folhas de duas cultivares de tomateiro, em função do modo de aplicação do *Bacillus subtilis*, em substrato esterilizado infestado com *Meloidogyne incognita*.

Fonte de variação	CT	N	P	K	Ca	Mg	S
Cultivar	2,10 ns	5,13*	33,37**	19,87**	11,40**	23,89**	22,52**
Modo de aplicação	3,87*	1,14 ns	1,42 ns	4,75*	2,09 ns	0,19 ns	2,13 ns
C x M	0,97 ns	1,95 ns	0,35 ns	1,42 ns	3,42*	0,23 ns	0,37 ns
CV%	12,40	5,65	11,79	13,33	23,47	10,15	21,75

*Significativo 0,05 de probabilidade; ** Significativo a 0,01 de probabilidade e ns - Não significativo, pelo teste F.

Em comparação com o controle, o índice de clorofila total mostrou-se superior em plantas de tomateiro que receberam a aplicação de *B. subtilis,* em pré-plantio (Tabela 7). Os teores médios de potássio se mantiveram em menores concentrações, nos tecidos foliares de plantas tratadas com a rizobactéria, em pré-plantio, sendo até inferiores aos teores observados em plantas controle (Tabela 7).

TABELA 7 - Valores médios para os teores relativos de clorofila total e de potássio, nas folhas de plantas de tomateiro, em razão do modo de aplicação *Bacillus subtilis*, em substrato esterilizado infestado com *Meloidogyne incognita*.

	Clorofila Total	Teor de Potássio
Tratamentos	(IC)	(g kg^{-1})
Controle	47,81 b	41,71 a
B. subtilis pré-plantio	54,75 a	35,32 b
B. subtilis pós-plantio	49,80 ab	39,67 ab
CV%	12,40	13,33

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Apenas para a cv. Kátia, a concentração de cálcio nas folhas, foi superior nas plantas tratadas com a rizobactéria (Tabela 8). Na ausência da aplicação de *B. subtilis,* as plantas suscetíveis, apresentaram teor de cálcio foliar inferior ao observado em plantas tolerantes a *M. incognita*.

TABELA 8 – Influência do modo de aplicação de *Bacillus subtilis* sobre o teor de cálcio nas folhas de cultivares de tomateiro, em substrato esterilizado infestado com de *Meloidogyne incognita,* aos 40 DAP.

	Teor de Cálcio (g kg^{-1})	
Tratamentos	Kátia	BSDI0038
Controle	4,70 bB	8,88 aA
B. subtilis pré-plantio	7,73 aA	8,80 aA
B. subtilis pós-plantio	7,28 aA	8,03 aA
CV%	23,47	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Com relação as análises bioquímicas nas folhas, de tomateiro, houve interação significativa apenas para a atividade enzimática guaiacol peroxidase (Tabela 9).

TABELA 9 - Resumo da análise de variância (teste F) para as variáveis bioquímicas proteínas solúveis totais (PST), prolina (PRO), guaiacol peroxidase (GPX) e superóxido dismutase (SOD) nas folhas de tomateiro, em função do modo de aplicação de *Bacillus subtilis*, em substrato esterilizado, infestado por *Meloidogyne incognita*.

Fonte de variação	PST	PRO	GPX	SOD
Cultivar	0,013 ^{ns}	28,74**	0,41 ^{ns}	1,642 ^{ns}
Modo de aplicação	0,619 ^{ns}	0,32 ^{ns}	5,14*	0,038 ^{ns}
C x M	0,456 ^{ns}	1,40 ^{ns}	3,89*	0,241 ^{ns}
CV%	7,67	18,97	13,97	7,57

*Significativo 0,05 de probabilidade; ** Significativo a 0,01 de probabilidade e ns - Não significativo, pelo teste F.

A atividade da guaiacol peroxidase (GPX) nas folhas do tomateiro cultivar Kátia, em comparação ao controle, foi reduzida em 34%, quando o *B. subtilis* foi aplicado em pré-plantio, e 49%, quando a rizobactéria foi aplicada em pós-plantio

(Tabela 10). Para a cultivar BSDI0038, os valores enzimáticos da peroxidase se mantiveram constantes em todos os tratamentos (Tabela 10).

TABELA 10 – Influência do modo de aplicação de *Bacillus subtilis* sobre a atividade da guaiacol peroxidase (GPX), nas folhas de duas cultivares de tomateiro, cultivadas em substrato esterilizado infestado com *Meloidogyne incognita*, aos 40 DAP.

	GPX (UA min^{-1} mg^{-1} MF)	
Tratamentos	Kátia	BSDI0038
Controle	8,19 aA	5,99 aB
B. subtilis pré-plantio	5,43 bA	5,07 aA
B. subtilis pós-plantio	4,35 bA	5,78 aA
CV%	13,97	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de significância.

5.2 Experimento 2: Solo naturalmente infestado com nematoides-das-galhas (*Meloidogyne* spp).

Pelo teste F, os valores foram significativos, tanto para os fatores isolados (exceto cultivares no caso da FAN), quanto para a interação entre cultivar e modo de aplicação, nas variáveis massa fresca radicular e formas ativas de nematoides (Tabela 11).

TABELA 11 - Resumo da análise de variância (teste F) dos componentes de crescimento vegetativo, características de parasitismo de nematoides e colonização bacteriana, de cultivares de tomateiro, em função do modo de aplicação de *Bacillus subtilis,* em solo naturalmente infestado com *Meloidogyne* spp.

Fonte de variação	AP	DC	MSPA	MFR
Cultivar	44,58**	0,18 ns	21,32**	116,02**
Modo de aplicação	0,47 ns	2,96 ns	1,72 ns	17,70**
C x M	0,096 ns	0,13 ns	1,00 ns	9,70**
CV%	11,78	13,28	18,18	22,68
Fonte de variação	**FAN**	**IG**	**CBS**	**CBR**
Cultivar	1,08 ns	112,74**	170,49**	8,85**
Modo de aplicação	6,52**	0,79 ns	0,76 ns	4,10*
C x M	5,28*	2,26 ns	0,38 ns	0,07 ns
CV%	17,94	21,50	28,37	14,37

(AP) Altura de plantas, (DC) Diâmetro do caule, (MSPA) Massa seca da parte aérea, (MFR) Massa fresca radicular, (FAN) Formas ativas de nematoides, (NO) Número de ovos, (IG) Índice de Galhas, (FR) Fator de reprodução, (CBS) Colonização de *Bacillus* spp. no solo, (CBR) Colonização de *Bacillus* spp. na rizosfera. *Significativo a 0,05 de probabilidade; ** Significativo a 0,01 de probabilidade e ns - Não significativo, pelo teste F.

Em relação aos pesos da massa fresca radicular, observou-se incrementos de até 98%, quando as plantas da cultivar suscetível, foram tratadas com *B. subtilis* (Tabela 12). A rizobactéria foi eficiente também em reduzir o número de formas ativas de *Meloidogyne* spp. no sistema radicular desta cultivar, com reduções de 34% e 64%, suscetivamente, para as aplicações em pré e pós-plantio (Tabela 12). Para a cv. tolerante, não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos para o número de formas ativas de *Meloidogyne* spp.

TABELA 12 – Influência do modo de aplicação de *Bacillus subtilis* sobre a massa fresca radicular (MFR) e sobre o controle de formas ativas de nematoides (FAN), nas raízes de duas cultivares de tomateiro, em solo naturalmente infestado com *Meloidogyne* spp., aos 40 DAP.

	MFR (g)		FAN (g^{-1} de raiz)	
Tratamentos	Kátia	BSDI0038	Kátia	BSDI0038
Controle	2,48 bA	1,53 aB	813,03 aA	598,09 aA
B. subtilis pré-plantio	4,22 aA	1,26 aB	581,73 aA	694,96 aA
B. subtilis pós-plantio	4,93 aA	2,11 aB	292,63 bB	593,19 aA
CV%	22,68		17,94	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 1% e 5% de significância, respectivamente.

Os tratamentos que receberam as aplicações bacterianas resultaram em maior colonização de *Bacillus* spp. na região da rizosfera, expressando densidade bacteriana média na ordem de 6,0 a 9,0 x 10^5 g de raiz^{-1} (Tabela 13). Contudo, não foi constatada diferença significativa, entre os modos de aplicação em pré e pós-plantio.

TABELA 13 - Valores médios da colonização do gênero *Bacillus* spp. na rizosfera (CBR), em função dos modos de aplicação de *Bacillus subtilis*, em solo naturalmente infestado com *Meloidogyne* spp., aos 40 DAP.

	CBR
Tratamentos	(UFC 10^5 g^{-1} de raiz)
Controle	2,4 b
B. subtilis pré-plantio	6,1 ab
B. subtilis pós-plantio	8,8 a
CV%	14,37

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Não foram encontradas alterações significativas para o índice clorofilométrico e os teores de macronutrientes nas folhas das plantas de tomateiro,

após os tratamentos biológicos testados. Apenas foram encontradas diferenças significativas para o fator cultivar (Tabela 14).

TABELA 14 - Resumo da análise de variância (teste F) para o teor relativo de clorofila total (CT) e macronutrientes nas folhas de duas cultivares de tomateiro, em função do modo de aplicação de *Bacillus subtilis*, em solo naturalmente com *Meloidogyne* spp.

Fonte de variação	CT	N	P	K	Ca	Mg	S
Cultivar	6,56*	0,61 ns	71,83**	0,02 ns	6,89*	64,22**	48,61**
Modo de aplicação	1,75 ns	1,69 ns	1,5 ns	0,79 ns	1,04 ns	0,58 ns	2,32 ns
C x M	3,01 ns	0,86 ns	0,52 ns	2,79 ns	0,56 ns	0,69 ns	3,25 ns
CV%	10,16	7,43	10,56	21,43	16,07	9,30	18,76

*Significativo a 0,05 de probabilidade; ** Significativo a 0,01 de probabilidade e ns - Não significativo, pelo teste F.

Não houve interação significativa entre os fatores cultivar de tomateiro e o modo de aplicação de *B. subtilis*, para as variáveis bioquímicas analisadas (Tabela 15). No entanto, observou-se que os teores médios de prolina em folhas de plantas de tomateiro tratadas com *B. subtilis,* em pós-plantio, eram superiores as folhas de plantas de tomateiro não tratadas (Tabela 16). Embora o teor de prolina no tratamento com aplicação da rizobactéria, em pós plantio, tenha sido superior ao da aplicação anterior ao plantio, a diferença não foi significativa.

TABELA 15 - Resumo da análise de variância (teste F) para as variáveis bioquímicas proteínas solúveis totais (PST), prolina (PRO), guaiacol peroxidase (GPX) e superóxido dismutase (SOD) nas folhas de tomateiro, em função do modo de aplicação de *Bacillus subtilis*, em solo naturalmente infestado com *Meloidogyne* spp.

Fonte de variação	PST	PRO	GPX	SOD
Cultivar	6,85*	2,68 ns	30,19*	1,24 ns
Modos de aplicação	1,22 ns	3,43*	2,44 ns	0,74 ns
C x M	0,46 ns	0,66 ns	0,64 ns	1,24 ns
CV%	10,63	13,70	16,56	12,72

*Significativo a 0,05 de probabilidade; ** Significativo a 0,01 de probabilidade e ns - Não significativo, pelo teste F.

TABELA 16 - Valores médios de prolina nas folhas do tomateiro, em função do modo de aplicação de *Bacillus subtilis*, em solo naturalmente infestado com *Meloidogyne* spp., aos 40 DAP.

Tratamentos	Prolina ($\mu mol\ g^{-1}$ de MF)
Controle	30,34 b
B. subtilis pré-plantio	33,99 ab
B. subtilis pós-plantio	39,82 a
CV%	13,70

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de significância.

A produção de massa fresca radicular do tomateiro foi influenciada pelas aplicações de *B. subtilis,* durante o período de 40 DAP. No entanto, os comportamentos foram distintos entre as cultivares e os experimentos. Em substrato estéril, as plantas da cv. Kátia, não tratadas com *B. subtilis,* apresentaram maior massa fresca radicular e tiveram maiores índice de galhas e fator de reprodução de *Meloidogyne incognita,* quando comparadas às plantas que receberam os tratamentos biológicos. Já no tomateiro cv. BSDI0038, cultivado em substrato estéril, foram observados incrementos na massa fresca radicular e no fator de reprodução de *M. incognita,* após a aplicação de *B. subtilis,* em pós-plantio.

Em solo naturalmente infestado com nematoides-das-galhas, as plantas de tomateiro cv. suscetível apresentaram melhor desenvolvimento das raízes, quando tratadas com *B. subtilis.* Por outro lado, essas plantas tiveram redução significativa do número de formas ativas de *Meloidogyne* spp. no sistema radicular. A cultivar tolerante de tomateiro não foi influenciada pelos tratamentos testados.

Segundo Abrão e Mazzafera (2001), o aumento da massa radicular de plantas infectadas por nematoides-das-galhas no início do desenvolvimento da cultura, pode ser devido ao efeito combinado, da emissão de raízes secundárias com a formação de galhas. Porém, a capacidade de compensação das plantas em tolerar o ataque de nematoides-das-galhas, pela produção de novas raízes, pode resultar em aumento do inóculo do patógeno na área, pois quanto mais raízes sadias estiverem disponíveis para o parasitismo, maiores serão as chances para o nematoide se reproduzir (SANTINI, 2014).

O efeito do tratamento com *B. subtilis,* sobre o crescimento das plantas de tomateiro, foi mais evidente na produção de massa radicular, do que em relação ao desenvolvimento da parte aérea dos cultivares de tomateiro aos 40 DAP. A promoção do crescimento de plantas, pela utilização de *B. subtilis*, tem sido relacionada ao melhor desenvolvimento radicular, à disponibilização de nutrientes, à produção de fitormônios e ao aumento da resistência a estresses bióticos e abióticos (LANNA FILHO et al., 2010; SHARAF et al., 2016).

Cetintas et al. (2018), ao estudarem 15 isolados de rizobactérias promotoras de crescimento, incluindo *Bacillus subtilis*, em tomateiro, observaram aumento no crescimento das plantas e na atividade antagonista contra *Meloidogyne incognita*. Para estes autores, as bactérias do gênero *Bacillus* podem aumentar a resistência das plantas aos nematoides-das-galhas, pela melhor disponibilização de nutrientes no solo e podem, ainda, agir diretamente na redução dos números de galhas e massa de ovos no sistema radicular. Esta ação sobre o nematoide resulta da liberação de compostos tóxicos e enzimas extracelulares, que destroem a proteção dos ovos e a cutícula de juvenis.

Os resultados aqui obtidos, demonstram que a rizobactéria *B. subtilis* foi capaz de reduzir o número de formas ativas e de ovos de *M. incognita,* nas raízes de plantas de tomateiro, cultivado em substrato estéril. Em plantas de cv. suscetível, a atividade de biocontrole da rizobactéria foi mais expressiva em reduzir a formação de galhas nas raízes e o fator de reprodução do nematoide. Em solo naturalmente infestado, os tratamentos biológicos foram eficientes em reduzir o número de formas ativas apenas nas plantas cv. suscetível (Kátia).

Sabe-se que o efeito regulatório de nematoides, proporcionado pelo *B. subtilis,* está relacionado a metabólitos bacterianos produzidos na região da rizosfera. Estes podem agir, negativamente, sobre a reprodução, oviposição, eclosão e sobrevivência de juvenis e adultos nas raízes e no solo (MACHADO et al., 2012).

Sharaf et al. (2016), ao avaliarem a influência de diferentes momentos da aplicação de *Bacillus subtilis* (uma semana antes, ao mesmo tempo e uma semana após a infestação com nematoides), na eficiência de controle sobre *M. incognita,* verificaram que a aplicação da rizobactéria simultaneamente à infestação do solo com nematoide, possibilitou a redução de 86% da formação de galhas nas raízes das plantas e 88% do número de massas de ovos de *M. incognita*.

Fernandes et al. (2014), através da microbiolização de sementes de tomateiro com *B. subtilis,* conseguiram redução na ordem de 60% no número de ovos de *M. incognita* nas raízes das plantas, em comparação as sementes não tratadas. Nível de controle semelhante, aos obtidos neste trabalho, quando os tratamentos com *B. subtilis* foram conduzidos em substrato estéril com a inoculação do nematoide.

Voss (2013), ao avaliar diferentes doses de *B. subtilis* no controle de nematoides das galhas, em tomateiro cultivado em solo naturalmente infestado, verificou maior redução no número de nematoides presentes no solo e menor formação de galhas nas raízes das plantas, com o aumento das concentrações do inóculo bacteriano no solo.

Abbasi et al. (2014), ao testarem três espécies de *Bacillus* no controle de *Meloidogyne javanica* em berinjela, verificaram maior redução na penetração do nematoide e menor intensidade de galhas, quando as plantas foram tratadas com *B. subtilis*. Por meio de plaqueamento, estes mesmos autores constaram, também, que aos 45 dias após a inoculação dos isolados bacterianos em solo autoclavado, a rizobactéria ainda se encontrava presente nas raízes e no solo.

Semelhantemente, neste trabalho, o gênero *Bacillus* spp. foi capaz de persistir na região da rizosfera e no solo, em ambos experimentos. Porém em ambiente estéril, foi recuperado maior número de colônias bacterianas. Além disso, verificou-se que o tratamento biológico quando conduzido na cultivar Kátia (suscetível), contribuiu para aumentar o número de colônias de *Bacillus* spp. no substrato estéril, sendo o tratamento pós-plantio superior ao pré-plantio.

Segundo Qiao et al. (2017), o ambiente estéril favorece a colonização radicular por *Bacillus subtilis*. Em experimento, utilizando placas com meio de cultura, estes autores verificaram uma quantidade de 10^7 UFC de *B. subtilis* na rizosfera do tomateiro. Por outro lado, em experimento em vasos, contendo solo não autoclavado, o número de colônias bacterianas foi de 10^6 UFC. Tais afirmações corroboram com os resultados aqui encontrados, em que as inoculações com *B. subtilis* também favoreceram o aumento da densidade populacional da bactéria nas plantas de tomateiro, quando foram cultivadas em substrato estéril. As taxas de colonização radicular alcançadas foram semelhantes (10^7 UFC) às verificadas por Qiao et al. (2017), indicando que de fato estas bactérias possuem predileção pela rizosfera das plantas.

A colonização e a distribuição uniforme das bactérias antagonistas na rizosfera são fatores importantes, para um controle eficiente dos nematoides. A concentração inicial do agente biológico a ser introduzido deve ser suficiente para garantir uma população do microrganismo capaz de promover um controle adequado do parasita (ARAÚJO et al., 2002). Além disso, o estabelecimento e a manutenção desses microrganismos no solo, devem ser mantidos ano após ano, no ambiente de produção agrícola, garantindo, assim, a supressão dos nematoides (SILVA et al., 2017).

Em relação aos teores de macronutrientes, observou-se que, após os tratamentos com *B. subtilis,* houve o aumento no teor de cálcio e diminuição na concentração de potássio, nas folhas do tomateiro cultivado em substrato estéril. A maior absorção de Ca^{2+}, em detrimento do K^{+}, pode estar relacionada à disponibilidade inicial destes nutrientes no substrato e à competição, entre estes dois cátions, pelo mesmo sítio de absorção pelas raízes (PINHEIRO et al., 2011). Além disso, a preferência pela absorção de Ca^{2+}, pode estar correlacionada a mecanismos de defesa das plantas, em resposta à infecção por nematoides no sistema radicular.

Hurchanik e colaboradores (2003) afirmam que uma planta bem nutrida em Ca^{2+} possui maior capacidade de suportar o ataque de nematoides, uma vez que este nutriente é essencial para o crescimento radicular. O cálcio participa de diversas funções enzimáticas e está ligado à integridade da membrana plasmática e da parede celular das plantas. Desse modo, o cálcio é um elemento importante na resistência da planta a patógenos. Segundo Aldon et al. (2018), o cálcio atua como mensageiro secundário e aumentos na concentração de Ca^{2+}, intracelular, nos tecidos vegetais é um dos primeiros eventos de sinalização, de respostas de defesa de plantas contra os nematoides-das-galhas.

Os sintomas de deficiência nutricional, em plantas infectadas por nematoides-das-galhas são reflexos de distúrbios metabólicos resultantes do suprimento ou absorção insuficiente de um ou mais nutrientes essenciais, decorrentes do parasitismo. No entanto, as alterações na composição mineral das plantas podem ser influenciadas, por um conjunto de fatores. Não existe um comportamento padrão, entre as plantas infectadas pelos nematoides, em condições de campo (ALMEIDA et al., 2011). Porém, quando as cultivares de tomateiro foram

transplantadas, no presente trabalho, para o substrato estéril, as alterações nos teores de Ca^{2+} e K^{+} foliar foram mais evidentes.

Nas avaliações clorofilométricas, quando o tomateiro foi cultivado em substrato estéril, houve aumento na concentração de clorofila total nas folhas, após o tratamento com o *B. subtilis* em pré-plantio. Abbasi et al. (2014), ao analisarem folhas de plantas de berinjela infectadas por nematoides-das-galhas, pelo método espectrofotométrico, também observaram maior concentração de clorofila total, em função da inoculação de *B. subtilis* em solo esterilizado. Desta forma, o aumento nos teores de clorofila após aplicações de *B. subtilis*, pode ser decorrente de uma menor infecção das plantas pelos nematoides.

Em relação aos teores de prolina, quando o solo foi naturalmente infestado por nematoides, houve aumento da concentração deste aminoácido nas folhas do tomateiro, após o tratamento com a rizobactéria em pós-plantio. Anita et al. (2006) também constataram aumentos nos teores de prolina, nas folhas de tomateiro, após o tratamento com a rizobactéria *Pseudomonas fluorescens,* ligando este aumento a uma maior tolerância ao ataque de *M. incognita.* De acordo com Hayat et al. (2012), o acúmulo de prolina em plantas, pode ser uma resposta fisiológica de resistência a várias condições de estresse. A justificativa para isso, é que este aminoácido desempenha funções importantes no equilíbrio osmótico, armazenamento de energia, estruturação celular, estabilização de proteínas e sinalização molecular.

Segundo Higaki e Araújo (2012), a avaliação foliar do teor de prolina livre em plantas cultivadas em áreas infestadas por nematoides, pode ser uma importante ferramenta na indicação do parasitismo. Uma vez que, o aumento da síntese de prolina, em plantas infectadas pelos nematoides-das-galhas, tem sido associado ao desequilíbrio osmótico causado pelo estabelecimento destes nematoides no interior das raízes, que comprometem os vasos condutores do xilema e reduzem a translocação de água das raízes para a parte aérea das plantas (MEON et al., 1978).

Com relação às análises enzimáticas nos tecidos foliares do tomateiro, observou-se que as inoculações com *B. subtilis,* em pré e pós-plantio, acarretaram em redução de atividade da guaiacol peroxidase no tomateiro Kátia, cultivado em substrato estéril. A redução na síntese desta enzima antioxidativa, pode estar

relacionada à menor infecção em decorrência da atração da rizobactéria no controle do nematoide.

Os valores da atividade da peroxidase encontrados na cultivar BSDI0038 se mantiveram constantes, mesmo após os tratamentos com *B. subtilis*. Em cultivares tolerantes, este efeito pode ser recorrente aos níveis constitutivos desta enzima nestas plantas, que são ativadas na presença dos nematoides. Para a enzima superóxido dismutase, não houve diferença entre os tratamentos biológicos conduzidos, em ambas as cultivares utilizadas.

Resultados semelhantes aos encontrados neste estudo, também foram verificados por Higaki e Araújo (2012), em genótipo de algodão resistente, cultivado em solo altamente infestado por nematoides. Os autores observaram menor atividade enzimática da peroxidase foliar nas plantas de algodão oriundas de sementes tratadas com *B. subtilis*, e que consequentemente, foram menos afetadas pelos nematoides.

Zacheo et al. (1982), observaram que genótipos de tomateiro resistentes e suscetíveis à meloidoginose, apresentavam a atividade da peroxidase e da superóxido dismutase semelhantes, quando sadias. No entanto, estes autores verificaram que após a inoculação com *M. incognita,* a cultivar resistente apresentava aumento da atividade peroxidase nas raízes. Ao contrário, as plantas suscetíveis o declínio. Com base nesses resultados, foi sugerida a participação dessa enzima no mecanismo de defesa das plantas. Já para a atividade superóxido dismutase, os autores perceberam que após a infecção por nematoides-das-galhas, os níveis desta enzima aumentavam em cultivares suscetíveis, mas diminuíam em cultivares resistentes.

Abbasi et al. (2014) ao analisarem as atividades da guaiacol peroxidase e da superóxido dismutase em folhas de berinjela, após a inoculação de *B. subtilis* para o controle nematoides-das-galhas, observaram redução da atividade da guaiacol peroxidase nas plantas tratadas com a rizobactéria, após 15 dias da inoculação. Porém, aos 45 dias após a inoculação, a atividade da enzima aumentou e atingiu níveis semelhantes aos de plantas não tratadas. Para a superóxido dismutase, houve maior concentração foliar da enzima após o tratamento com a rizobactéria.

No entanto, no presente estudo, somente a atividade da enzima guaiacol peroxidase foi reduzida, em resposta a aplicação de *B. subtilis*, nas plantas

cv. Kátia conduzidas em substrato estéril. Isso demonstra que as alterações, nos níveis foliares desta enzima, devem ser mais sensíveis ao parasitismo da planta por nematoides-das-galhas.

As mudanças no padrão da atividade enzimática foliar da peroxidase podem estar relacionadas com a defesa local e sistêmica das plantas. Isso porque essa enzima está envolvida na remoção de peróxido de hidrogênio (componente tóxico aos tecidos vegetais), na participação da síntese de compostos fenólicos, no fortalecimento da parede celular nos locais de invasão de patógenos e na ativação de mecanismos de defesa da planta (ANTER et al., 2014). Por tanto, as rizobactérias podem influenciar o metabolismo de enzimas antioxidantes, no sentido de minimizar as ações prejudiciais atribuídas as espécies reativas de oxigênio, geradas em resposta ao estresse (RADHAKRISHNAN et al., 2017).

Os resultados aqui encontrados, mostraram que as mudanças nas respostas nutricionais e bioquímicas das plantas de tomateiro, foram mais destacadas na condição estéril de cultivo, onde se obteve maior isolamento dos fatores analisados. Estas informações podem auxiliar na compreensão das diferenças de alterações que ocorrem em plantas hospedeiras suscetíveis e tolerantes, na presença dos nematoides-das-galhas no solo.

Considerando os resultados apresentados, os modos de aplicação de *Bacillus subtilis* promoveram a melhoria do sistema radicular e reduziram a multiplicação de nematoides-das-galhas, mostrando-se ser uma prática de controle eficiente no manejo da meloidoginose, sendo uma alternativa de fácil aplicação e que oferece mínimo impacto ambiental, podendo ser incorporada no manejo integrado deste fitoparasita na cultura do tomateiro.

6 CONCLUSÕES

A aplicação de *Bacillus subtilis,* em pré ou pós-plantio, foi eficiente em aumentar a massa radicular de plantas de tomateiro suscetível e em reduzir a reprodução de nematoides-das-galhas, em solo naturalmente infestado.

Em substrato estéril, a inoculação de *B. subtilis* em pós-plantio promoveu redução do número de formas ativas do nematoide e ambas as aplicações promoveram a diminuição de ovos de *Meloidogyne incognita* nas raízes do tomateiro.

A aplicação de *B. subtilis*, na condição de substrato estéril, aumentou o teor de cálcio e reduziu o teor de potássio nas folhas do tomateiro.

A aplicação de *B. subtilis* contribuiu para redução dos valores da peroxidase nas folhas do tomateiro suscetível a nematoides-das-galhas, em condição estéril.

A aplicação da rizobactéria, em pós-plantio, possibilitou o aumento no teor de prolina nas folhas do tomateiro, cultivado em solo naturalmente infestado com nematoides-das-galhas.

As inoculações com *B. subtilis* promoveram o aumento do número de colônias desse gênero bacteriano no substrato estéril e na rizosfera do tomateiro, sendo comprovada a persistência destas bactérias aos 40 DAP.

REFERÊNCIAS

ABBASI, M. W. et al. Potential of *Bacillus* species against *Meloidogyne javanica* parasitizing eggplant (*Solanum melongena* L.) and induced biochemical changes. **Plant Soil**, v. 375, ed. 1- 2, p. 159 -173, 2014.

ABRÃO, M. M.; MAZZAFERA, P. Efeitos do nível de inóculo de *Meloidogyne incognita* em algodoeiro. **Bragantia**, v.60, p.19-26, 2001.

ALDON, D. et al. Calcium Signalling in Plant Biotic Interactions. **International Journal of Molecular Sciences**, v.19, 665 p., 2018.

ALI, M. A. Smart parasitic nematodes use multifaceted strategies to parasitize plants. **Frontiers in Plant Science**, 2017. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2017.01699/full> Acesso em: 23 mar. 2018.

ALMEIDA, E. J.; SANTOS, J, M.; MARTINS, A. B. G. Influência do parasitismo pelo nematoide de galhas nos níveis de nutrientes em folhas e na fenologia de goiabeira 'Paluma'. **Bragantia,** v.70 n. 4, Campinas, 2011.

ALVARENGA, M. A. R. Origem, botânica e descrição da planta. In: ALVARENGA, M. A. R. **Tomate: produção em campo, em casa-de-vegetação e em hidroponia**. Lavras: UFLA, 13-23 p. 2004.

ANITA, B. et al. Defence Mechanism in tomato treated with *Pseudomonas fluoresecens* Migula against *Meloidogyne incognita* (Kofoid and white) Chitwood. India. **Pest management in Horticultural Ecosystems**, v. 12, n. 1, p. 63-66., 2006.

ANTER, A. A. et al. Evaluation of some rhizobacteria as induce systemic resistance or bio-control agents in controlling root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* on tomato. **Egypt. J. Agronematol.**, v. 13, n.1, p. 107-123, 2014.

ANWAR, S. A.; MCKENRY, M. V. Incidence and Population Density of Plant-Parasitic Nematodes Infecting Vegetable Crops and Associated Yield Losses in Punjab, Pakistan. **Pakistan J. Zool.,** v. 44, p. 327-333, 2012.

ARAÚJO, F. F. et al. Influência de *Bacillus subtilis* na eclosão, orientação e infecção de *Heterodera glycines* em soja. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 2, p. 197-203, 2002.

ARAÚJO, A. S. F.; MONTEIRO, R. T. R.; CARDOSO, P. F. Composto de lodo têxtil em plântulas de soja e trigo. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, Brasília, v. 40, p. 549-554, 2005.

ARAÚJO, F. F.; HENNING, A. A.; HUNGRIA, M. Phytohormones and antibiotics produced by *Bacillus subtilis* and their effects on seed pathogenic fungi and on soybean root development. **World Journal of Microbiology & Biotechnology,** v. 21, p.1639–1645, 2005.

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.

ASMUS, G. L. Danos causados à cultura da soja por nematoides do gênero *Meloidogyne*. In: SILVA, J. F. V. (Org.). **Relações parasito-hospedeiro nas meloidoginoses da soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2001.

BARBOSA, M. R. et al. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.44, n.3, p.453-460, 2014.

BATES, L. S; WALDREN, R. P.; TEARE, I. Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant and Soil**, Netherlands, v. 39, n. 2, p. 205-207, 1973.

BETTIOL, W.; GHINI, R. Impactos das mudanças climáticas sobre o controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL W.; MORANDI, M. A. B. **Biocontrole de doenças de plantas**: uso e perspectivas. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 2009. p. 29-31.

BONETTI, J. I; FERRAZ S. Modificações do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* em raízes de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 6, p. 553, 1981.

BRANDFORD, M. **Analytical Biochemistry**, v.72, p. 248-254, 1976.

BUCHANAN, R. E.; GIBBONS, N.G. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. Baltimore: The Willians & Wilkens, 1975. 1268 p.

CARBALLIDO LÓPEZ, R.; FORMSTONE, A. Shape determination in *Bacillus subtilis.* **Current Opinion in Microbiology**, v.10, p. 611–616. 2007.

CARNEIRO, R. M. D. G. Princípios e tendências do controle biológico de nematoides com fungos nematofágos. **Pesquisa agropecuária Brasileira**, Brasília, v.27, s/n, p. 113-121. 1992.

CARNEIRO, R. M. D. G.; MORAES, E.C. Avaliação de resistência de cultivares de tomateiro ao nematoides das galhas, em estufa. **Nematologia Brasileira**, v. 17, Pelotas, RS. 1993.

CARVALHO, L. et al. *Mi-1*-Mediated Nematode Resistance in Tomatoes is Broken by Short-Term Heat Stress but Recovers Over Time. **Journal of Nematology,** v.47, n. 2, p. 133-140, 2015.

CETINTAS, R. et al. Effect of some plant growth-promoting rhizobacteria strains on root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*, on tomatoes. **Egyptian, Journal of Biologycal Pest Control**., v. 28, p. 7, 2018.

COSTA, M. A. **Biocontrole de nematoides com fungos**. 2015. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista – UNESP Campus de Jaboticabal, 2015.

DROPKIN, V. H. Necrotic reaction of tomatoes and other hosts resistant to *Meloidogyne*: reversal by temperature. **Phytopathology**, v. 59, p. 1632–1637, 1969.

EMBRAPA. **A cultura do tomateiro (para a mesa).** Brasília: EMBRAPA SPI, 1993. 92p.

EMBRAPA. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. 2. ed. Rio de Janeiro: EMBRAPA SPI, 2006. 306 p.

FARIA, C. M. D. R. et al. Mecanismos de ataque e defesa na interação nematóide-planta. **Revisão Anual de Patologia de Plantas (RAPP)**, v. 11, 373 p. 2003. Disponível em: <http://docentes.esalq.usp.br/sbn/rapp/rapp08.pdf>. Acesso em: 07 jul. 2016.

FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Produtividade Mundial. 2013.** Disponível em: <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>. Acesso em: 28 ago. 2016.

FERNANDES, R. H. et al. *Pochonia chlamydosporia* e *Bacillus subtilis* no controle de *Meloidogyne incognita* e *M. javanica* em mudas de tomateiro. **Biosci. J**., Uberlândia, v. 30, n. 1, 194-200 p., jan./feb. 2014.

FERRAZ, L. C. C. B.; MONTEIRO, A. R. Nematoides In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIM FILHO, A. **Manual de fitopatologia**: Princípios e conceitos. 4. ed. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2011. p. 277- 289.

FERREIRA, D. F. Análises Estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45. **Anais...** UFSCAR, São Carlos, SP. Julho de 2000. p. 255 -258.

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

FONTES, P. C. R; ARAÚJO, C. **Adubação nitrogenada de hortaliças**: princípios e práticas com o tomateiro. Viçosa: UFV, 2007. 148 p.

FORMENTINI, H. M. **Avaliação de indutores de resistência bióticos e abióticos e extratos vegetais no controle de *Meloidogyne incognita* em tomateiro**. 2012. 90 f. Dissertação (Doutorado) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Marechal Cândido Rondon, 2012.

FREITAS, L. G. **Rizobactérias versus nematoides**. 2001. Disponível em: <http://www.ufv.br/dpf/labnematologia/rizo.pdf>. Acesso em: 18 jun. 2017.

FREITAS, L. G. et al. Isolamento e seleção de rizobactérias para controle de nematoides formadores de galhas (*Meloidogyne* spp.) na cultura do tomateiro. **Nematologia Brasileira,** v. 29, n. 2, p. 215-220, 2005.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superóxido dismutases. I. occurrence in higher plants. **Plant Phys**., v. 59, p. 309-314, 1977.

GONÇALVES, L. A. **Levantamento e manejo de nematoides fitoparasitas em áreas cultivadas com olerícolas na região centro oeste do estado de São Paulo**. 2014. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu-SP, 2014.

HAYAT, S. et al. Role of proline under changing environments. **Plant signaling e Behavior**, v. 7, n. 11, p. 1456-1466, nov. 2012.

HIGAKI, W. A.; ARAUJO, F. F. *Baccilus subtilis* e abamectina no controle de nematoides e alterações fisiológicas em algodoeiro cultivado em solos naturalmente infestados. **Nematropica,** v. 42, n. 2, p. 295–303, 2012.

HURCHANIK, D. et al. Realationship of *Meloidogyne konaensis* population densities to nutritional status of coffee roots and leaves. **Nematropica**, v. 33. 2003.

HUSSEY, R. S.; GRUNDLER, F.M.W. Nematode parasitismo of plants. In: PERRY, R. N.; WRIGHT, D. J. The physiology and biochemistry of free-living and plant-parasitic nematodes. **CAB International,** p. 43-213, 1998.

IBGE. **Dados extraídos do acervo do Levantamento Sistemático da Produção Agrícola (LSPA)**. Disponíveis em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/prevsaf/default.asp?t=1&z=t&o=26&u1=1&u2=1&u3=1&u4=1>. Acesso em: 28 jun. 2018.

JACQUET, M. et al. Variation in resistance to the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* in tomato genotypes bearing the *Mi* gene. **Plant Pathology**, v.54, p. 93–99, 2005.

JENKINS, J. A. The origen of the cultivated tomato. **Ec. Bot**., n. 2, p. 379-392, 1948.

JENKINS, W. R. Rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Reporter**, v. 48, n. 9, p. 692, 1964.

KILIAN, M. et al. FZB24 *Bacillus subtilis* mode of action of a microbial agent enhancing plant vitality. **Pflan-zenschutz Nachrichten Bayer**, v.1. p. 72-93. 2000.

KUMAR, A.; PRAKASH, A.; JOHRI, B. N. *Bacillus* as PGPR in Crop Ecosystem. Chapter 2. In: Maheshwari, D.K (ed). **Bacteria in Agrobiology.** Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2011.

LI, D.M.; ALEXANDER, M. Co-inoculation with antibioticproducing bacteria to increase colonization and nodulation by rhizobia. **Plant and Soil**, v.108, p. 211-219, 1988.

LIANG, X. et al. Proline mechanisms of stress survival. **Antioxidants e Redox Signaling**, v. 19, n. 9, p. 998-1011, sep. 2013.

LANNA FILHO, R.; FERRO, H. M.; PINHO, R. S. C. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas,** v. 4, n. 2, p. 12-20. 2010.

LORDELLO, L. G. E. **Nematoides das Plantas Cultivadas**. 8. ed. São Paulo: Nobel,1986.

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

MACEDO, M. A. A. **Estratégias de controle de insetos-praga nas culturas do tomateiro (*Lycopersicum esculentum* Mill) e pimentão (*Capsicum annum* L.)**. 2006. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu, 2006.

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

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas:** princípios e aplicações. 2. ed. Piracicaba: Potafos, 1997.

MELILLO, M. T. et al. Modulation of reactive oxygen species activities and H_2O_2 accumulation during compatible and incompatible tomato–root-knot nematode interactions. **New Phytologist**, v.170, n. 3, p. 501-512, 2006.

MELO, P. C. T. **Avanços recentes na tomaticultura de mesa associada a mudanças no paradigma tecnológico e desafios a superar**. Disponível em: <http://www.tomatedemesa.com.br/2014/noticia01.html>. Acesso em: 20 jun. 2018.

MEON, S. et al. Changes in free proline following infection of plants with either *Meloidogyne javanica* or *Agrobacterium tumefaciens*. **Physiological Plant Pathology**, p. 251-256,1978.

MOTA, L. C. B. M. **Micro-organismos, quitina e quitosana no manejo de nematóides das galhas no tomateiro**. 2015. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Uberlândia, Minas Gerais, 2015.

OOSTENBRINK, M. Major characteristics of the relations between nematodes and plants. **Mededelingen Landbouwhogeschool**, Wageningen, v. 66-4, p. 46, 1966.

PAULSON, R. E.; WEBSTER, J. M. Ultrastructure of the hypersensitive reaction in roots of tomato, *Lycopersicum esculentum* L., to infection by the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. **Physiology Plant Pathology**, v. 2, p. 227-234, 1972.

PINHEIRO, J. B. et al. Severidade da ferrugem da soja em função do suprimento de potássio e cálcio em solução nutritiva. **Revista Ceres**, v. 58 n.1, feb. 2011.

PINHEIRO, J. B. et al. **Manejo de nematoides na cultura do tomate**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2014. (Boletim Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Hortaliças; 132)

PODESTA, G. S. **Interação entre *Pochonia Chlamydosporia* e rizobactérias no controle de *Meloidogyne javanica***. 2015. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2015.

QIAO, J. et al. Addition of plant-growth-promoting *Bacillus subtilis* PTS-394 on tomato rhizosphere has no durable impact on composition of root microbiome. **BMC Microbiology**, v. 17, p. 131, 2017.

RADHAKRISHNAN, R.; HASHEM, A.; ABD ALLAH, E. F. *Bacillus*: A biological tool for crop improvement through bio-molecular changes in adverse environments. **Frontiers in Physiology,** v. 6, n. 8, p. 667. 2017.

RAIJ, B. V. et al. **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais.** Campinas: Instituto Agronômico, 2001.

RAUT, S. C. **Efficacy of biocontrol antagonists against root knot nematode, *Meloidogyne incognita* infecting tomato**. 2014. Master of Science in Agriculture (Nematology). University of Agriculture and Technology Bhubaneswar, Odisha, 2014.

REJEB, K. B.; ABDELLY, C.; SAVOURÉ, A. How reactive oxygen species and proline face stress together. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 80, p. 278-284, July, 2014.

RESENDE, M. L. V.; SALGADO, S. M. L.; CHAVES, Z. M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira,** v. 28, p. 123-130, 2003.

RESENDE, M. L. V. et al. Percepção e transdução de sinais para a ativação de respostas de defesa em plantas contra patógenos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas (RAPP),** v.15, p.129-198, 2007.

SANTINI, L. **Análise, via RNAseq, do transcritoma do feijoeiro e identificação de genes expressos em resposta a infecção pelo nematoide das galhas**. 2014. 118 f. Dissertação (Doutorado) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2014.

SHARAF, A. E. M. A. et al. Induced resistance in tomato plants against root knot nematoide using biotic and abiotic inducers. **International Journal of Advanced Research in Biological Sciences**, v. 3, n. 11, p. 31-46, 2016.

SHARMA, R. D.; GOMES, A. C. Effect of *Bacillus* spp. toxins on oviposition and juvenile hatching of *Heterodera glycines*. **Nematologia Brasileira**, v. 20, p. 53-62 1996.

SHARMA, I. P.; SHARMA, A. K. Effects of initial inoculum levels of *Meloidogyne incognita* J2 on development and growth of tomato cv.PT-3 under control conditions. **African Journal of Microbiology Research**, v. 9, p. 1376-1380, 2015.

SHUKLA, N. et al. Transcriptome analysis of root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*)-infected tomato (*Solanum lycopersicum*) roots reveals complex gene expression profiles and metabolic networks of both host and nematode during susceptible and resistance responses. **Molecular Plant Pathology,** 2017.

SILVA, R. V. et al. Efeito do gene *Mi* na reprodução de populações de *Meloidogyne exigua* em tomateiro. **Nematologia Brasileira,** Piracicaba, v. 32, n. 2, 2008.

SILVA, G. S. **Métodos Alternativos de controle de fitonematoides**. São Luís: Universidade Estadual do Maranhão, 2011. p. 81-152. (Revisão Anual de Patologia de Plantas – RAPP; 19)

SILVA, J. O. ***Meloidogyne incognita* na cultura do tomate**: levantamento e manejo com produtos biológicos. 2015. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Goiás, Escola de Agronomia, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Goiânia, 2015.

SILVA, J. O. et al. Biocontrol agents in the management of *Meloidogyne incognita* in tomato. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 47, n. 10, 2017.

SINGH, S. et al. Nematodes: A threat to sustainability of agriculture. **Procedia Environmental Sciences**, v. 29, p. 215-216, 2015.

TAYLOR, A. L.; SASSER, J. N. **Biology, Identification and Control of the Root-knot Nematodes (*Meloidogyne* species).** Raleigh: North Carolina State University Graphics, 1978. 111 p.

TRUDGILL, D. L. Resistance and tolerance of plant parasitic nematodes in plants. **Annual Review of Phytopathology**, v. 29, p. 167-192, 1991.

TSUGE, K.; AKIYAMA, T.; SHODA, M. Cloning, Sequencing, and Characterization of the Iturin A Operon. **Journal of bacteriology**, v. 183, n. 21, p. 6265–6273, nov. 2001.

VAZ, M. V. et al. Controle biológico de *Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne incognita* com *Bacillus subtilis*. **Revista do Núcleo Interdisciplinar de Pesquisa e Extensão**, v. 1, n. 8, p. 203-212, jul. 2011.

VOSS, G. B. **Produção de *Bacillus subtilis* em biorreatores airlift e sua aplicação no controle de nematoide de galhas do tomateiro**. 2013. 115f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis- SC, 2013.

WILLIAMSON, V. M.; GLEASON, C. A. Plant–nematode interactions. **Current Opinion in Plant Biology**, p.1–7, 2003.

WILLIAMSON, V. M, ROBERTS, P. A. Mechanisms and genetics of resistance. In: Perry RN, Moens M, Starr JL, editors. **Root-knot Nematodes**. Oxfordshire, UK: CABI; 2009. p. 301–325.

ZACHEO, G.; BLEVE-ZACHEO, T; LAMBERT, F. Role of peroxidase and superoxide dismutase activity in resistant and suscetible tomato cultivars infected by *Meloidogyne incognita*. **Nematologia Mediterrania Ban**., v. 10, p. 75-80, 1982.