

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL

ADAN DEZAN CÔGO

**Caracterização da microbiota antagonista em biofertilizantes e seu papel nas interações
multitróficas para o manejo do *Meloidogyne exigua* em cafeeiro arábica**

ALEGRE

2020

ADAN DEZAN CÔGO

Caracterização da microbiota antagonista em biofertilizantes e seu papel nas interações multitróficas para o manejo do *Meloidogyne exigua* em cafeeiro arábica

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal do Centro de Ciências Agrárias e Engenharia da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção de título de Mestre em Produção Vegetal, na área de concentração de Fitossanidade (Fitopatologia).

Orientador: Prof. Dr. Fábio Ramos Alves

ALEGRE

2020

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de
Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

C676c Côgo, Adan Dezan, 1993-
Caracterização da microbiota antagonista em biofertilizantes e
seu papel nas interações multitróficas para o manejo do
Meloidogyne exigua em cafeeiro arábica / Adan Dezan Côgo. -
2020.
92 f. : il.

Orientador: Fábio Ramos Alves.

Coorientador: André da Silva Xavier.

Tese (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Federal
do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias.

1. Meloidogyne exigua. 2. Café. 3. Controle biológico. 4.
Biologia molecular. 5. Fitopatologia. I. Alves, Fábio Ramos. II.
Xavier, André da Silva. III. Universidade Federal do Espírito
Santo. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. IV. Título.

CDU: 63

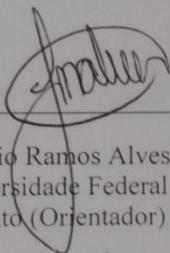
ADAN DEZAN CÔGO

**Caracterização da microbiota antagonista em biofertilizantes e seu papel nas interações
multitróficas para o manejo de *Meloidogyne exigua* em cafeeiro arábica**

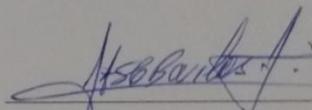
Dissertação apresentada à Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para
obtenção do Título de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal.

27 de fevereiro de 2020.

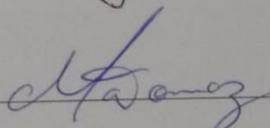
Comissão Examinadora:



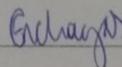
Fábio Ramos Alves
Prof. Dr. Universidade Federal do Espírito
Santo (Orientador)



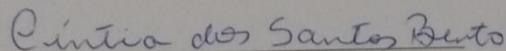
Dr. Dimmy Herllen Silveira
Gomes Barbosa
Embrapa Mandioca e Fruticultura.
(Membro Externo)



Prof. Dr. Marcelo Antônio Tomaz
Universidade Federal do Espírito Santo
(Membro Interno)



Prof. Dr. Elcio do Nascimento Chagas
Instituto Federal do Espírito Santo (Ifes)-
Campus de Alegre (Membro Externo)



Profa. Dra. Cíntia dos Santos Bento
Universidade Federal do Espírito Santo
(Membro Externo)

A Deus,

Aos meus pais Tomé e Lúcia (*in memoriam*), a minha família, a minha namorada Ariane e a todos os meus amigos por todo o apoio durante minha vida e minha formação

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida, por me conceder força e me abençoar em todos os passos dessa conquista.

À Universidade Federal do Espírito Santo pela oportunidade de realização do curso e formação profissional e ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, por me proporcionar a oportunidade de ingresso na pós-graduação;

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Agradeço por aqueles que são a base da minha vida: meu pai José Tomé Côgo, por ser o meu herói, por estar ao meu lado em todos os momentos me apoiando e me dando conselhos e por toda a força durante essa caminhada e por se deslocar várias vezes de Vitória até Iúna para poder me ajudar para as coletas de campo. A minha mãe Lúcia Idê Dezan (*in memoriam*) por todos os nossos momentos juntos, pelo seu carinho e seu amor incondicional. Agradeço também a minha irmã Alyne Dezan Côgo, meu cunhado Rogério Baptista Nery e ao meu afilhado Heitor Côgo Nery por todo o amor, carinho e apoio. Ao meu avô Geraldo Côgo (*in memoriam*) por ser meu exemplo de vida, e minha inspiração para a escolha do meu curso. A minha avó Rita Lachini Côgo (*in memoriam*) por ser meu exemplo de fé e por todos os seus ensinamentos. A minha tia/mãe Zélia Côgo por tudo o que fez por mim durante toda a minha vida e a minha tia Maria Auxiliadora Côgo e minha prima Amábile Izabel Côgo, por todo apoio, ajuda nos momentos mais difíceis e pelas orações;

A minha namorada, companheira e melhor amiga Ariane Tonetto Vieira, pelo incentivo em ingressar nesse mestrado, por estar ao meu lado em todos os momentos difíceis, pelo amor, carinho e conselhos que sempre me ajudam a crescer como pessoa e por estar sempre me ajudando não importando as adversidades.

Ao professor Dr. Fábio Ramos Alves pela amizade, orientação, ensinamentos, dedicação, paciência e, principalmente, por me incentivar a buscar a fazer sempre o melhor, contribuindo para o meu crescimento profissional e pessoal. Aos meus coorientadores Dr. André da Silva Xavier e Dr. William Bucker Moraes por todo apoio que recebi durante esse mestrado e pelos ensinamentos e por me tornarem uma pessoa e um profissional melhor;

Aos membros examinadores da banca, Dr. Dimmy Herllen Silveira Gomes Barbosa, Dr. Marcelo Antonio Tomaz, Dra. Cíntia dos Santos Bento e Dr. Elcio do Nascimento Chagas por aceitarem o convite em participar e pelas contribuições para o enriquecimento deste trabalho;

A todos os integrantes dos laboratórios Nematufes, LAVIB e LEMP que trabalharam comigo ao longo desse mestrado, em especial aos integrantes Leonardo (Belan), Jean, Alex, Alícia (Kids), Arthur (Chapéu), Lucas, Gabriela;

Ao Dr. Dimmy Herllen Silveira Gomes Barbosa por toda a ajuda para a condução dos experimentos em campo. À Secretaria de Agricultura de Iúna, em especial ao meu amigo Klinger Chaves que me auxiliou nas escolhas das propriedades para o experimento e por todo o suporte. Aos produtores Marcio José Gomes e Rodrigo Severino da Silva que permitiram desenvolver essa pesquisa em suas áreas;

Ao meu amigo e irmão Welinton Sartório, alguém muito especial que Deus colocou na minha vida, sempre estando ao meu lado me ajudando, me apoiando e me aconselhando e por me ouvir muito;

Em especial ao Grupo de Oração Universitário (GOU) Luz do Amor de Deus, por tornar minhas quintas-feiras tão maravilhosas e especiais. Em especial aos meus amigos: Alisson, Cordeiro, Fran, Marlúcia, Mikaella Miqueias, Nádia, Nathalia, Paloma, Suzana, Thamiris e Werikis, pelos momentos de alegria. Agradeço muito a Deus por ter colocado vocês na minha vida;

A todos que torceram e acreditaram no meu sucesso, muito obrigado!

"Jamais sofra antecipadamente. Pense positivo, acredite nos seus sonhos e nunca desista de lutar. A vida é generosa para aqueles que acreditam nela!"

Ayrton Senna

BIOGRAFIA

Adan Dezan Côgo, filho de José Tomé Côgo e Lúcia Idê Dezan (*in memoriam*), nasceu em Cariacica, Espírito Santo, no dia 22 de junho de 1993. Em 2011, ingressou na Universidade Federal do Espírito Santo, em Alegre, ES, graduando-se Bacharel em Agronomia em agosto de 2016. Durante o período de graduação foi bolsista de iniciação científica PIBIC/CNPq, tendo desenvolvido atividades de pesquisa na área de fitotecnia. Em agosto de 2017 iniciou o Mestrado no Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal da Universidade Federal do Espírito Santo, atuando na área de Fitossanidade, sob orientação do Prof. Dr. Fábio Ramos Alves, submetendo-se à defesa de dissertação em fevereiro de 2020.

RESUMO

Os fitonematoides estão entre os principais patógenos na cultura do cafeeiro arábica, na qual a espécie *Meloidogyne exigua* ganha destaque. Devido à complexidade do manejo em campo e à alta toxicidade de produtos químicos que visam seu manejo, têm-se pesquisado técnicas alternativas para a redução populacional desse patógeno no campo. Entre as alternativas, o uso de nematicidas de baixa toxicidade e a aplicação de produtos biológicos como biofertilizantes vêm ganhando destaque nos últimos tempos o manejo dos nematoides das galhas. No entanto, devido à grande diversidade de microrganismos presentes nessas formulações dos biofertilizantes, faz-se necessário realizar a caracterização morfológica e genética a fim de se compreender a diversidade genética. Objetivou-se no presente estudo acessar a diversidade genética dos microrganismos presentes em biofertilizantes utilizados para o manejo de *M. exigua*; e avaliar o efeito isolado e combinado de diferentes nematicidas químicos e biofertilizantes no manejo de *M. exigua* em lavoura comercial de café arábica na região de Iúna, sul do Espírito Santo. Os isolados foram obtidos a partir de diluições seriadas dos biofertilizantes em diferentes meios de cultura para posterior análise visual das características morfológicas. Para a caracterização genética foi realizado Rep-PCR utilizando primers REP, ERIC e BOX. Os géis de agarose foram fotografados e posteriormente analisados no programa GelJ, no qual a similaridades entre os perfis digitalizados foi calculada usando o Coeficiente de Similaridade Jaccard (CSJ), e com base nas estimativas de dissimilaridades dos isolados foram agrupadas pelo método hierárquico UPGMA. No campo, os nematicidas químicos e os biofertilizantes foram aplicados isolados e combinados e foram realizadas avaliações populacionais de *M. exigua* antes da aplicação e 45 dias após a aplicação dos produtos. A partir do Vitaflex e do Maxfert, 218 bactérias foram isoladas e incluídas em 53 grupos. Desse total, 40 grupos foram encontrados em ambos os biofertilizantes e 13 grupos presentes apenas no Vitaflex. No campo, a aplicação isolada do Nimitz, Vitaflex e Maxfert resultaram em maior redução populacional de *M. exigua*. A combinação entre os biofertilizantes com o Nimitz também apresentou resultados satisfatórios, tornando-se possível realizar a combinação entre esses produtos para o manejo *M. exigua* em campo.

Palavras-chave: Nematóide das galhas, *Coffea arabica*, REP-PCR, Controle biológico, Controle químico

ABSTRACT

Phytonematoids are among the main pathogens in the Arabica coffee culture, in which the species *Meloidogyne exigua* gains prominence. Due to the complexity of handling in the field and the high toxicity of chemicals that target its management, alternative techniques have been investigated to reduce the population of this pathogen in the field. Among the alternatives, the use of low toxicity nematicides and the application of biological products as biofertilizers have recently gained prominence in the management of gall nematodes. However, due to the great diversity of microorganisms present in these formulations of biofertilizers, it is necessary to carry out the morphological and genetic characterization in order to understand the genetic diversity. The aim of this study was to access the genetic diversity of microorganisms present in biofertilizers used for the management of *M. exigua*; and to evaluate the isolated and combined effect of different chemical nematicides and biofertilizers in the management of *M. exigua* in commercial Arabica coffee plantations in the region of Iúna, southern Espírito Santo. The isolates were obtained from serial dilutions of biofertilizers in different culture media for further visual analysis of morphological characteristics. For the genetic characterization, Rep-PCR was performed using REP, ERIC and BOX primers. The agarose gels were photographed and later analyzed in the GelJ program, in which the similarities between the digitized profiles were calculated using the Jaccard Similarity Coefficient (CSJ), and based on the estimates of dissimilarities of the isolates were grouped by the UPGMA hierarchical method. In the field, chemical nematicides and biofertilizers were applied alone and combined and population measurements of *M. exigua* were carried out before application and 45 days after application of the products. From Vitaflex and Maxfert, 218 bacteria were isolated and included in 53 groups. Of this total, 40 groups were found in both biofertilizers and 13 groups present only in Vitaflex. In the field, the isolated application of Nimitz, Vitaflex and Maxfert resulted in a greater population reduction of *M. exigua*. The combination of biofertilizers with Nimitz also showed satisfactory results, making it possible to combine these products for the management of *M. exigua* in the field

Keywords: *Meloidogyne exigua*, *Coffea arabica*, REP-PCR, Biological control, Chemical control.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADE- Água Destilada Esterilizada;

AN- Agar nutriente;

BDA- Batata Dextrose Agar;

CL- Caldo Lactose;

COVs- Compostos Orgânicos Voláteis;

CSJ- Coeficiente de Similaridade Jaccard;

EMB- Eosina Azul Metileno;

ERIC- Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus;

LAVIB- Laboratório de Virologia Microbiana e Biocontrole de Doenças de Plantas

NEMATUFES- Laboratório de Nematologia

NUDEMAFI- Núcleo de Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Manejo Fitossanitário de Pragas e Doenças;

PCR- Reação em Cadeia da Polimerase;

REP- Repetitive Extragenic Palindromic;

RPCPs- Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas;

SDA- Ágar Sabouraud Dextrose;

UFES- Universidade Federal do Espírito Santo;

UPGMA-;Método da Ligação Média Entre Grupos

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Colônias isoladas de alguns representantes de grupos de bactérias encontrados nos biofertilizantes Maxfert (M) e Vitaflex (V). 40
- Figura 2. Teste em meio King B: A) Na presença de luz UV; B) Na presença da luz UV saturada para evidenciar a fluorescência e C) Imagem em 3D evidenciando o pico de excitação dos sideróforos gerados no controle positivo. Fotos realizadas no fotodocumentador Loccus L-Pix EX. A marcação em vermelho indica o controle negativo *Ralstonia solanacearum*. 42
- Figura 3. Rep-PCR de alguns representantes de isolados presentes no Vitaflex (V) e Maxfert (M). (A) BOX; (B) ERIC; (C) REP. A primeira canaleta com a letra M indica o Marcador 1 kb Plus DNA Ladder (Cellco Biotecnologia). 44
- Figura 4. Dendograma da diversidade gênica dos isolados encontrados nos biofertilizantes Vitaflex (V) e Maxfert (M) construído com base na matriz de similaridade pelo complemento do Coeficiente de Jaccard, com os dados gerados pelo primers BOX, usando o método das médias das distâncias (UPGMA). 45
- Figura 5. Dendograma da diversidade gênica dos isolados encontrados nos biofertilizantes Vitaflex (V) e Maxfert (M) construído com base na matriz de similaridade pelo complemento do Coeficiente de Jaccard, com os dados gerados pelo primers ERIC, usando o método das médias das distâncias (UPGMA). 46
- Figura 6. Dendograma da diversidade gênica dos isolados encontrados nos biofertilizantes Vitaflex (V) e Maxfert (M) construído com base na matriz de similaridade pelo complemento do Coeficiente de Jaccard, com os dados gerados pelo primers REP, usando o método das médias das distâncias (UPGMA). 47
- Figura 7. Rep-PCR de todos os representantes de isolados presentes no Vitaflex (V) e Maxfert (M). (A) BOX; (B) ERIC; (C) REP. A primeira canaleta com a letra M indica o Marcador 1 kb Plus DNA Ladder (Cellco Biotecnologia). 92

LISTA DE TABELA

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Relação do número de bactérias isoladas para cada meio de cultura testado | 36 |
| Tabela 2. Efeito de nematicidas químicos (Rugby e Fluensulfone 40EC) e biofertilizantes (Vitaflex e Maxfert) aplicados isoladamente ou em associação sobre a população de <i>M. exigua</i> parasitando o cafeeiro cv. Catuaí 44 no município de Iúna, ES..... | 64 |
| Tabela 3. Caracterização morfológica de colônias isoladas de bactérias presentes nos biofertilizantes Vitaflex (V) e Maxfert (M) desenvolvidas em meio Kado. | 74 |
| Tabela 4. Concentração e pureza de Ácidos Nucléicos de representantes de grupos de isolados formados a partir da caracterização morfológica..... | 87 |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| INTRODUÇÃO GERAL | 17 |
| REFERENCIAS BIBLOGRAFICA | 22 |
| CAPÍTULO I: PERFIL MORFOLÓGICO E GENÔMICO DE BACTÉRIAS ASSOCIADAS AO VITAFLEX E MAXFERT EFETIVOS PARA O CONTROLE DE FITONEMATÓIDES | 27 |
| RESUMO | 27 |
| ABSTRACT | 28 |
| 1 INTRODUÇÃO | 29 |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS | 31 |
| 2.1 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE MICRORGANISMOS PRESENTES NOS BIOFERTILIZANTES VITAFLEX E MAXFERT | 31 |
| 2.2 DETECÇÃO DA PRODUÇÃO DE SIDERÓFOROS POR ISOLADOS BACTERIANOS PRESENTES NOS BIOFERTILIZANTES VITAFLEX E MAXFERT | 32 |
| 2.3 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS BACTERIANOS PRESENTES NOS BIOFERTILIZANTES VITAFLEX E MAXFERT | 33 |
| 2.3.1 Extração do DNA genômico | 33 |
| 2.3.2. Fingerprint genômico utilizando Rep-PCR..... | 34 |
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 36 |
| 3.1 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE MICRORGANISMOS PRESENTES NOS BIOFERTILIZANTES VITAFLEX E MAXFERT | 36 |

| | |
|--|-----------|
| 3.2 DETECÇÃO DA PRODUÇÃO DE SIDERÓFOROS POR ISOLADOS BACTERIANOS PRESENTES NOS BIOFERTILIZANTES VITAFLEX E MAXFERT | 42 |
| 3.3 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS BACTERIANOS PRESENTES NOS BIOFERTILIZANTES VITAFLEX E MAXFERT | 43 |
| 3.3.1 Extração do DNA genômico | 43 |
| 3.3.2. Fingerprint genômico utilizando Rep-PCR..... | 43 |
| 4 CONCLUSÃO..... | 52 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 53 |
| CAPÍTULO II: EFICIÊNCIA DE BIOFERTILIZANTES E NEMATICIDAS QUÍMICOS NO MANEJO DE <i>Meloidogyne exigua</i> EM CAFEIEIRO ARÁBICA. | 59 |
| RESUMO | 59 |
| ABSTRACT | 60 |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 61 |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS | 63 |
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 64 |
| 4. CONCLUSÃO..... | 68 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 69 |
| ANEXOS | 73 |

INTRODUÇÃO GERAL

O café é um dos principais produtos dentro do cenário agrícola brasileiro. Atualmente existe uma área cultivada de aproximadamente 2.168.599,9 hectares no Brasil, dos quais 80,68% da área é ocupada por café arábica (*Coffea arabica* L.) e 20,65% de café conilon (*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner), sendo Minas Gerais e Espírito Santo os principais produtores, responsáveis por 75,06% de toda a produção nacional (CONAB, 2019).

Minas Gerais ocupa o primeiro lugar com aproximadamente 53% da produção cafeeira nacional, com maior predomínio de cultivo de café arábica, enquanto o Espírito Santo ocupa o segundo lugar em produção, responsável por 22,06% da produção nacional sendo também o terceiro maior produtor de café arábica no país (CONAB, 2019).

A cultura do cafeeiro arábica gera em torno de 150 mil empregos diretos e indiretos, e é a principal fonte de renda de 80% das propriedades rurais capixabas localizadas em terras frias e montanhosas, sendo o município de Iúna um dos maiores produtores do estado (INCAPER, 2018). Desse modo, a cultura cafeeira possui uma grande importância para o país tanto no aspecto econômico quanto social, por meio da geração de empregos e manutenção do homem no campo (RODRIGUES et al., 2012).

Dentre os fatores bióticos que limitam a produtividade do cafeeiro, as doenças merecem destaque, pois a cultura do café é afetada por muitos fitopatógenos (fungos, bactérias, vírus e nematoides) (ALVES et al., 2012). Os fitonematoides são os principais organismos responsáveis por doenças do sistema radicular, sendo que os sintomas podem ser expressos em outros órgãos da planta (folhas, ramos), e muitas vezes associados a deficiências nutricionais pelos agricultores (KIMANI et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2009; SALGADO; RESENDE, 2010; BARROS et al., 2014; CONTARATO et al., 2014). Além disso, os nematoides podem causar danos indiretos à cultura ao ferir as radículas e permitir a entrada de outros patógenos presentes na área (GOMES et al., 2011).

As perdas ocasionadas pela interação entre fitonematoides e cafeeiro podem chegar a 45%, destes, 75% ocorrem devido ao parasitismo de *Meloidogyne* spp. Goeldi, também conhecido como nematoides das galhas (BARBOSA et al., 2004). Nesse gênero, as espécies *M. incognita* Chitwood e *M. paranaensis* Carneiro *M. exigua* Goldi são as mais

importantes. A relevância dessas espécies é devido à ampla distribuição nas regiões cafeeiras (BARROS et al., 2014), facilidade de disseminação, ampla gama de hospedeiros e adaptação a diferentes ecossistemas (SALGADO; RESENDE, 2010; AMORIM et al., 2011).

M. incognita, *M. exigua* e *M. paranaensis* estão amplamente distribuídas nas principais áreas produtivas das regiões sul, serrana e norte do Espírito Santo (BARROS et al., 2014). Os autores relataram que nas áreas da região sul as espécies mais presentes são *M. exigua* e *M. incognita*. Já na região norte são *M. incognita* e *M. paranaenses*.

Devido a sua importância para a cultura do café faz-se necessária a adoção de medidas de manejo com o intuito de reduzir a população de *Meloidogyne* spp. no campo (JONES et al., 2017). Entre as formas de manejo mais empregadas para a redução populacional de *Meloidogyne* spp. no campo a aplicação de nematicidas sintéticos ganha destaque por apresentar resultados mais rápidos comparado à outras medidas (DONG; ZHANG, 2006; KEARN et al., 2014).

A maioria dos nematicidas enquadra-se nas seguintes classes: Carbamatos ou Organofosforados. Esses produtos inibem a acetilcolinesterase, um neurotransmissor que catalisa a reação de quebra da acetilcolina em colina e acetato, substâncias que atuam na transmissão de impulsos nervosos através das sinapses até os receptores (SILVA et al., 2012). Quando a acetilcolinesterase é inibida pela ação dos nematicidas há um acúmulo de acetilcolina nos fitonematoides, o que provoca a paralisia e, consequente, a morte desses patógenos por inanição (JONES et al., 2017).

Entretanto, esses produtos são considerados altamente tóxicos para humanos e para o meio ambiente, sendo que a maioria delas não tem especificidade em sua toxicidade (JONES et al., 2017). Por essa razão, muitos nematicidas foram proibidos de serem comercializados no Brasil (HUSAIN et al., 2010).

Com o intuito de se buscar novas medidas alternativas para o manejo de fitonematoides, novos ingredientes ativos com ação nematicida de baixa toxicidade vêm sendo desenvolvidos, a exemplo do nematicida Nimitz[®], lançado no mercado brasileiro, e que possui como ingrediente ativo Fluensulfone ou MCW-2 (5-cloro-2-(3,4,4-trifluorobut-3-f enilsulfonil) -1,3-tiazole). Esse nematicida é um membro do grupo Tioéter Fluoroalquilo e possui, além da ação nematicida, baixa toxicidade para organismos não-

alvo, ação sistêmica e ação de contato sendo recomendado para o manejo dos principais fitonematoides nas culturas do algodão, batata, café, cana-de-açúcar, cenoura, citros, goiaba, pimenta-do-reino, pimentão, soja e tomate (AGROFIT, 2018).

Alguns autores demonstraram que o Fluensulfone reduziu a infecção e a penetração de *M. javanica*, *M. incognita* e *M. arenaria* em raízes de plantas cultivadas (CSINOS et al., 2010; KEARN et al., 2014; CARDOSO et al., 2015; FUDO et al., 2015; TAKACHI et al., 2015).

Atualmente, os consumidores de café buscam um produto cujo processo produtivo tenha promovido o menor impacto ambiental possível (FERRÃO, 2017). Nesse sentido, o controle biológico vem sendo uma opção para o manejo de fitonematoides por minimizar os danos ambientais, em comparação com os nematicidas químicos convencionais (COIMBRA e CAMPOS, 2005).

O controle biológico é definido como a redução da densidade de inóculo ou das atividades determinantes da doença, através de um ou mais organismos antagonistas (STIRLING, 2018). Entre os microrganismos antagônicos, as rizobactérias são bastante utilizadas no manejo de *Meloidogyne* spp. (VAZ et al., 2011; ARAÚJO et al., 2012). Segundo Sharma e Gomes (1996), as rizobactérias liberam endotoxinas que interferem no ciclo reprodutivo dos fitonematoides, principalmente na ovoposição e eclosão de juvenis, além de auxiliar no crescimento das plantas (RAMAMOORTHY et al., 2001).

Vale ressaltar que quando esses antagonistas são empregados no biocontrole de fitonematoides, a redução populacional do patógeno ocorre devido à presença das rizobactérias presentes naturalmente no solo ou introduzidas pelo homem (VENZON et al., 2005). Uma das formas de introduzir as rizobactérias no solo é por meio de produtos biológicos, como os biofertilizantes que são compostos bioativos resultantes da biodigestão de compostos orgânicos de origem animal e/ou vegetal (SINGH et al., 2016). Segundo os autores, a microbiota presente nesses biofertilizantes é bastante diversificada e pode apresentar diferentes efeitos sobre as plantas, como indução de crescimento, aumento da disponibilidade de nutrientes de fácil assimilação e proteção das plantas contra o ataque de pragas e doenças.

Os biofertilizantes Vitaflex e Maxfert são bioestimulantes orgânicos provenientes do processo de fermentação do melaço de cana. Podem ser utilizados em conjunto e

apresenta melhoras na microbiota do solo, indução de resistência e estimulam o desenvolvimento e potencial fotossintético da planta (AGROHUMUS, 2019). Recentemente foi descoberto que ambos os produtos possuem ação nematicida e vêm sendo utilizados para a redução populacional de *M. exigua* em cafeeiros cultivados no estado do Espírito Santo.

Como a produção de biofertilizantes não é padronizada em nosso país, cada produto disponível no mercado possui em sua composição receitas e microrganismos variados, o que torna necessária a compreensão de quais organismos antagonistas faz parte desses produtos e qual o papel isolado e conjunto dessas microbiota na mortalidade de fitonematoides (MAGRINI et al., 2011).

Desse modo, a caracterização morfológica de microrganismo nesses produtos faz-se necessária a fim de se obter informações importantes para o agrupamento de estirpes bacterianas. Características morfológicas como tamanho, forma, elevação, superfície, brilho e tipo de borda permitem diferenciar uma espécie de outra e pode servir inicialmente de base para medidas de biodiversidade (HUNGRIA e ARAÚJO, 1994). Entretanto, é necessária a associação dessas informações a outras técnicas de caracterização como bioquímicas e genéticas (CHAUHAN et al., 2013).

O uso da reação em cadeia da polimerase (PCR) vem apresentando bons resultados para a diagnose e estudo da variabilidade genética de microrganismos (SHANGKUAN et al. 2001; LIMA et al. 2002). Entre as técnicas empregadas, a REP-PCR (Repetitive Element Polymorphism) consiste na caracterização de sequências repetitivas e conservadas nos genomas bacterianos utilizando o conjunto de primers REP, ERIC e BOX (VERSALOVIC et al., 1991). Assim, não é necessário o conhecimento prévio das sequências genômicas das espécies estudadas, uma vez que vários desses elementos repetitivos intercalados estão conservados nas bactérias, possibilitando a formação de padrões específicos de fingerprint (impressão digital) do DNA genômico das bactérias auxiliando nos estudos de diversidade genética (VERSALOVIC et al. 1994; RADEMAKER & DE BRUIJIN 1997, SHANGKUAN et al. 2001; LIMA et al. 2002; DA SILVA e BEZERRA, 2013).

Atualmente, as estratégias de manejo de fitonematoides prioritárias são aquelas que diminuem custos, aumentam a produção e não agridem o ambiente (RITZINGER e

FANCELLI, 2006). Uma das possibilidades é a aplicação conjunta de nematicidas químicos de baixa toxicidade, como o Fluensulfone, e biofertilizantes, como o Maxfert e o Vitaflex. Entretanto, até o momento, nenhum estudo foi feito em nível de campo com o intuito de estudar a eficiência conjunta desses produtos no manejo de *M. exigua* em cafeeiro arábica.

Diante do exposto até aqui, objetiva-se com o presente trabalho (a) Identificar a diversidade genética dos microrganismos presentes em fertilizantes orgânicos comerciais utilizados para o manejo de *Meloidogyne* spp. (b) Avaliar o efeito isolado e combinado de diferentes nematicidas químicos e biofertilizantes no manejo de *M. exigua* em lavoura comercial de café arábica na região de Iúna, sul do Espírito Santo.

REFERENCIAS BIBLOGRAFICA

AGRO HUMUS - AGRO HUMUS: Adubos Orgânicos. Disponível em: <<https://www.agrohumusorganicos.com/>>. Acesso em: 10 de dez. de 2019.

AGROFIT - DE AGROTÓXICOS FITOSSANITÁRIOS, Sistemas. Consulta de ingredientes ativos. 2018. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/agrofit>>. Acesso em: 15 de jan. de 2020.

ALVES, F. R.; LIMA, I. M. ; PEREIRA, A. J. ; COSTA, D. C.; RABELLO, L. K. C. ; TOMAZ, M. A. ; JESUS JUNIOR, W. C. . Resistência Genética em Cafeeiros e Variabilidade Genética nos Principais Fitonematóides Associados a essa Cultura. **In:** Marcelo Antonio Tomaz, José Francisco Teixeira do Amaral, Waldir Cintra de Jesus Júnior, Aymbiré Francisco A. da Fonseca, Romário Gava Ferrão, Maria Amélia Gava Ferrão. (Org.). Tecnologias para a Sustentabilidade da Cafeicultura. **Alegre:** CAUFES, v. , p. 95-123. 2012,

AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. Manual de fitopatologia: princípios e conceitos. **São Paulo**, 2011.

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

BARBOSA, D. H. S. G. et al. Field estimates of coffee yield losses and damage threshold by *Meloidogyne exigua*. **Nematologia Brasileira**, v. 28, n. 1, p. 49-54, 2004.

BARROS, A. F.; OLIVEIRA, R. D. L.; LIMA, I. M.; COUTINHO, R. R.; FERREIRA, A. O.; COSTA, A. Root-knot nematodes, a growing problem for Conilon coffee in Espírito Santo state, Brazil. **Crop Protection**, v. 55, p. 74-79, 2014.

CARDOSO, V. H. P.; TAKACHI, M. T.; BENETTI, E.; GIRALDI J. B.; SANTIAGO, D. C.; ALMEIDA, A. A. Eficácia do novo nematicida fluensulfone no controle de *Meloidogyne javanica* em *Beta vulgaris*. **Anais... XXXII Congresso Brasileiro de Nematologia**, Sociedade de nematologia brasileira Londrina Paraná, p. 101, 2015.

CHAUHAN, H.; BAGYARAJ, D. J.; SHARMA, A. Plant growth-promoting bacterial endophytes from sugarcane and their potential in promoting growth of the host under field conditions. **Experimental Agriculture**, v. 49, n. 1, p. 43-52, 2013.

COIMBRA, J. L.; CAMPOS, V. P. Efeito de exsudatos de colônias e de filtrados de culturas de actinomicetos na eclosão, motilidade e mortalidade de juvenis do segundo estágio de *M. javanica*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, p. 232-238, 2005.

CONAB, COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira: café. **Monitoramento agrícola-Safra** 2019, v. 5, n. 2, 2019.

CONTARATO, C. C. et al. Reaction of cultivar coffee 'Vitoria INCAPER 8142' of conillon to parasitism of *Meloidogyne exigua*. **Idesia**, v. 32, n. 1, p. 93-97, 2014.

CSINOS, A.; WHITEHEAD, J.; HICKMAN, L. L.; LAHUE S. S.; Evaluation of fluensulfone for root knot nematode on tobacco, **Phytopathology**, v. 100, p.28, 2010.

DA SILVA, Rosane Bezerra; VALICENTE, Fernando Hercos. Molecular characterization of *Bacillus thuringiensis* using REP-PCR. **SpringerPlus**, v. 2, n. 1, p. 641, 2013.

DONG, L. Q.; ZHANG, K. Q. Microbial control of plant-parasitic nematodes: a five-party interaction. **Plant and Soil**, v. 288, p.31-45, 2006.

FERRÃO, R. G. et al. **Café conilon**. 2.ed. atual e ampl. Vitória, ES: INCAPER, p. 784, 2017.

FUDO, C. H.; SILVA, F. M. L.; BENETTI, E. Avaliação da eficácia do nematicida nimitztm (Fluensulfone 480 EC) no controle de *Meloidogyne javanica* na cultura do pimentão. **Anais...** XXXII Congresso Brasileiro de Nematologia, Sociedade de nematologia brasileira Londrina Paraná, p. 99, 2015.

GOMES, V. M. et al. Guava decline: a complex disease involving *Meloidogyne mayaguensis* and *Fusarium solani*. **Journal of Phytopathology**, v. 159, n. 1, p. 45-50, 2011.

HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. S. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: Embrapa-Serviço de Produção e Informação, 1994.

HUSAIN, K.; ANSARI, R. A.; FERDER, L. Pharmacological agents in the prophylaxis/treatment of organophosphorous pesticide intoxication. **Journal of Experimental Biology**, v. 48, p. 642-650, 2010.

INCAPER. Cafeicultura – Café Arabica. {online}. Disponível em: <<https://incaper.es.gov.br/cafeicultura-arabica>>. Acesso em 10/08/2019.

JONES, J. G. et al. Evaluation of nematicides for southern root-knot nematode management in lima bean. **Crop protection**, v. 96, p. 151-157, 2017.

KEARN, J. et al. Fluensulfone is a nematicide with a mode of action distinct from anticholinesterases and macrocyclic lactones. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, p. 44–57, 2014.

KIMANI, M.; LITTLE, T.; VOS, J. G. M. Introduction to coffee management through discovery learning. **CAB International. African Regional Centre, Nairobi, Kenya**, p. 2, 2002.

LIMA, A. S. G. et al. Identification of new isolates of *Bacillus thuringiensis* using rep-PCR products and delta-endotoxin electron microscopy. **Genetics and molecular biology**, v. 25, n. 2, p.: 225-229. 2002,

MAGRINI, F. E. et al. Características químicas e avaliação microbiológica de diferentes fases de maturação do biofertilizante Bokashi. **Agrarian**, v. 4, n. 12, p. 146-151, 2011.

OLIVEIRA, R. D. L.; LIMA, I. M.; BARROS, A. F. Importância e diagnose do parasitismo de nematoides em cafeeiro conilon. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). Tecnologias para a produção do café conilon. **Viçosa: UFV**, p. 65-83, 2009.

RADEMAKER, J. L. W.; DE BRUIJIN, F. J. Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer assisted patterns analysis. **In: Caetano-Anollés G, Gresshoff, PM (eds) DNA Markes: Protocols, Applications and Overviews. Willey, New York**, pp 151–171, 1997.

RAMAMOORTHY, V. et al. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. **Crop Protection**, v.20, n.2, p.1-20, 2001.

RITZINGER, C. H. S. P.; FANCELLI, M. Manejo integrado de nematóides na cultura da bananeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 2, p. 331-338, 2006.

RODRIGUES, W. N. et al. Estimativa de parâmetros genéticos em grupos de clones de café Conilon. **Coffee Science**, v. 7, n. 2, 2012.

SALGADO, S. M. L.; RESENDE, J. C. Manejo de fitonematoides em cafeeiro. In: REIS, P. R.; CUNHA, R. L. (Ed.). *Café arábica do plantio a colheita*. Lavras: EPAMIG, p. 757-804. 2010.

SHANGKUAN, Y.-H., et al. Molecular characterization of *Bacillus anthracis* using multiplex PCR, ERIC-PCR and RAPD. **Letters in applied microbiology**, v. 32, n.3, p: 139-145, 2001.

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.

SILVA, G. R. et al. Defesa química: histórico, classificação dos agentes de guerra e ação dos neurotóxicos. **Química Nova**, v. 35, n. 10, p. 2083-2091, 2012.

SINGH, M. et al. Role of biofertilizers in conservation agriculture. **Conservation Agriculture**. Springer, Singapore, p. 113-134, 2016

STIRLING, G. R. Biological control of plant-parasitic nematodes. **Diseases of nematodes**. CRC Press, p. 103-150, 2018

TAKACHI, M. T. et al. Efficiency of new nematicide fluensulfone in control of *Pratylenchus zae* in ratoon cane. **Anais...** XXXII Congresso Brasileiro de Nematologia, Sociedade de nematologia brasileira Londrina Paraná, p. 98, 2015.

VAZ, M. V. et al. Controle biológico de *Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne incognita* com *Bacillus subtilis*. **Perquirere**, v. 8, p. 203-212, 2011.

VENZON, M.; PAULA JÚNIOR, T. J.; PALLINI, A. Controle alternativo de pragas e doenças. **Viçosa: UFV**, 2005.

VERSALOVIC, J., et al. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to finerprinting of bacterial enomes. **Nucleic acids research**, v. 19, n.24, p: 6823-6831, 1991.

VERSALOVIC, J., et al. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in molecular and cellular biology**, v. 5, n. 1, p: 25-40, 1994.

CAPÍTULO I: PERFIL MORFOLÓGICO E GENÔMICO DE BACTÉRIAS ASSOCIADAS AO VITAFLEX E MAXFERT EFETIVOS PARA O CONTROLE DE FITONEMATÓIDES

RESUMO

A aplicação de biofertilizantes é uma das formas que vem sendo empregadas a fim de introduzir microrganismos antagônicos para o manejo dos nematoides das galhas (*Meloidogyne* spp.). No entanto, devido à grande diversidade de microrganismos presentes nessas formulações faz-se necessário realizar a caracterização morfológica e genética a fim de se compreender a diversidade genética. O presente estudo tem por objetivo identificar a diversidade genética dos microrganismos cultivados presentes em biofertilizantes utilizados para o manejo de *M. exigua*. Foram realizadas diluições seriadas dos biofertilizantes até 10^{-3} nos meios de cultura Ágar nutriente (AN), Batata Dextrose Ágar (BDA), Ágar Sabouraud Dextrose (SDA), Ágar Eosina Azul Metileno (EMB), Caldo Lactose (CL), Meio Kado. Após os processos de repicagem e preservação dos isolados, foi realizada análise visual das características morfológicas das colônias bacterianas isoladas em meio Kado e *Spot test* com o meio de cultura King B. Após caracterização morfológica foi realizada extração de DNA genômico e Fingerprint genômico utilizando os primers REP, ERIC e BOX. Os géis de agarose foram fotografados e posteriormente analisados no programa GelJ, no qual a similaridade entre os perfis digitalizados foi calculada usando o Coeficiente de Similaridade Jaccard (CSJ), e, com base nas estimativas de dissimilaridades dos isolados, foram agrupados pelo método hierárquico UPGMA. Um total de 218 bactérias foram isoladas dos biofertilizantes Vitaflex e Maxfert, nos quais não foi constatada a presença de bactérias da família *Enterbacteriaceae* e *Pseudomonas* spp. do grupo fluorescente. Com base na caracterização morfológica e triagem genética foi possível agrupar os isolados em 53 grupos distintos, sendo 40 presentes nos dois biofertilizantes e 13 presentes apenas no Vitaflex. O uso da técnica de Rep-PCR possibilitou ampliar o conhecimento sobre a biodiversidade da microbiota, uma vez que permite a caracterização com uma maior segurança, não estando sujeita a ação do ambiente. Nesse sentido, o uso da técnica de Rep-PCR possibilita uma melhor compreensão da diversidade genética das comunidades presentes nos biofertilizantes.

Palavras-chave: Sequências repetitivas, Perfil genômico, Biofertilizantes, *Meloidogyne exigua*, Microrganismos benéficos.

ABSTRACT

The application of biofertilizers is one of the ways that has been used in order to introduce antagonistic microorganisms for the management of gall nematodes (*Meloidogyne* spp.). However, due to the great diversity of microorganisms present in these formulations, it is necessary to carry out the morphological and genetic characterization in order to understand the genetic diversity. The present study aims to identify the genetic diversity of cultured microorganisms present in biofertilizers used for the management of *M. exigua*. Serial dilutions of biofertilizers were performed up to 10⁻³ in the culture media Nutrient agar (AN), Potato Dextrose Agar (BDA), Sabouraud Dextrose Agar (SDA), Eosine Blue Methylene Agar (EMB), Lactose Broth (CL), Kado Medium. After the isolation and preservation processes, a visual analysis of the morphological characteristics of the bacterial colonies isolated in Kado and Spot test with the King B culture medium was performed. After morphological characterization, genomic DNA extraction and genomic fingerprint were performed using primers REP, ERIC and BOX. The agarose gels were photographed and subsequently analyzed using the GelJ program, in which the similarity between the digitized profiles was calculated using the Jaccard Similarity Coefficient (CSJ), and, based on the estimates of dissimilarities of the isolates, were grouped by the UPGMA hierarchical method. A total of 218 bacteria were isolated from the biofertilizers Vitaflex and Maxfert, in which the presence of bacteria from the family Enterbacteriaceae and *Pseudomonas* spp was not found. of the fluorescent group. Based on the morphological characterization and genetic screening, it was possible to group the isolates into 53 different groups, with 40 present in the two biofertilizers and 13 present only in Vitaflex. The use of the Rep-PCR technique made it possible to expand knowledge about the microbiota's biodiversity, since it allows characterization with greater security, not being subject to the action of the environment. In this sense, the use of the Rep-PCR technique allows a better understanding of the genetic diversity of the communities present in biofertilizers.

Key words: Repetitive sequences, genomic profile, biofertilizers, phytonmatoids, beneficial microorganisms.

1 INTRODUÇÃO

Os nematoides são organismos multicelulares que constituem um grupo de invertebrados pertencentes ao filo Nematoda, sendo bastante diversificados com uma estimativa de aproximadamente 100 mil a um milhão de espécies (DE LEY e BLAXTER, 2002), o que representa 80% de todos os indivíduos do reino Animalia (PLATT, 1999). Entretanto, os fitonematoides ganham destaque devido a sua importância para o homem, por serem responsáveis por danos em plantas de valor econômico (FRAGOSO et al., 2007).

Estima-se que os fitonematoides ocasionem perdas anuais à produção agrícola internacional entre 100 e 157 bilhões de dólares (SINGH et al., 2013), sendo mais frequentes em condições de climas tropicais e subtropicais (NICOL et al., 2011).

Os nematoides das galhas (*Meloidogyne* spp.) são importantes fitopatógenos e estão amplamente disseminados pelo país, sendo responsáveis pela redução na produção e no valor comercial de diversas culturas. Culturas como o café, soja, batata, tomate, quiabo, alface, cenoura, fumo, arroz, feijão, cana-de-açúcar, alho, algodão, abacaxi, coco, goiaba, banana, entre outras podem ser hospedeiras dos nematoides (FREITAS et al., 2006).

Entre as formas de manejo utilizadas para a redução populacional de *M. exigua*, o controle biológico vem ganhando espaço nos últimos anos devido à busca por produtos que promovam menor impacto ambiental e pela falta de nematicidas de baixa toxicidade para organismos não alvos (COIMBRA e CAMPOS, 2005; FERRÃO, 2017; JONES et al., 2017). O controle biológico é definido como a redução da densidade de um inóculo de um fitopatógeno ou das atividades determinantes do mesmo, através de um ou mais organismos antagonistas (COOK & BAKER, 1983 *apud* AMORIM et al., 2011). Além disso, atua na redução da população dos fitonematoides por meio da ação de microrganismos antagônicos ou de produtos do metabolismo secundários microbianos que estão presentes naturalmente no solo ou introduzidos pelo homem (VENZON et al., 2005).

Entre os microrganismos antagônicos, as rizobactérias ganham destaque, pois atuam de forma direta e indireta no desenvolvimento das plantas. De forma direta, pela produção de fitormônios e compostos orgânicos voláteis (COVs) que auxiliam no

desenvolvimento das plantas hospedeiras (SALAS-MARINA et al., 2011; CASARRUBIA et al., 2016). Já a ação indireta envolve aumento da solubilização de nutrientes e supressão de doenças promovendo melhor absorção de nutrientes e resistências às doenças e expansão de vias metabólicas nas plantas (BERG et al., 2014). Segundo Sharma e Gomes (1996), as rizobactérias atuam por meio da liberação de endotoxinas que intervêm no ciclo reprodutivo dos fitonematoides, principalmente na ovoposição e eclosão de juvenis.

Uma das formas de incorporação das rizobactérias no campo é por meio de produtos biológicos como os biofertilizantes. Os biofertilizantes são produtos bioativos resultantes da biodigestão de compostos orgânicos de origem animal e/ou vegetal realizada por uma microbiota bastante diversificada que se mantém como fração biológica efetiva que atua de diferentes formas sob as plantas, a saber, indução de crescimento, aumento da disponibilidade de nutrientes e proteção contra o ataque de pragas e fitopatógenos (SINGH et al., 2016).

Os biofertilizantes Vitaflex e Maxfert são bioestimulantes orgânicos oriundos do processo de fermentação natural de melão de cana. São utilizados em conjunto e, além de beneficiar a microbiota autóctone do solo, atuam na indução de resistência e melhoram o desenvolvimento das plantas (AGRO HUMUS, 2019). Esses produtos possuem também ação nematicida e vêm sendo utilizados para o manejo de *M. exigua* no município de Iúna, na região sul do estado do Espírito Santo (AGRO HUMUS, 2019).

No entanto, por não existir uma fórmula padrão para a produção de biofertilizantes, cada produto no mercado possui receitas e microrganismos variados em sua composição, tornando a compreensão do papel isolado desses microrganismos cultiváveis pouco conhecida (MAGRINI et al., 2011). Desse modo, a caracterização biológica, morfológica e genética de microrganismos faz-se necessária a fim de se obter informações importantes para otimização de formulações baseada na modulação da composição da comunidade microbiana efetiva (CHAUHAN et al., 2013).

O uso da reação em cadeia da polimerase (PCR) vem apresentando bons resultados para a caracterização da variabilidade genética microbiana (SHANGKUAN et al. 2001; LIMA et al. 2002). Entre as técnicas de genotipagem baseada em PCR, a Rep-PCR

(Repetitive element polymorphism- Polymerase Chain Reaction) consiste na caracterização de sequências repetitivas e conservadas nos genomas bacterianos utilizando o conjunto de primers REP, ERIC e BOX (VERSALOVIC et al., 1991). Nesse sentido, não é necessário o conhecimento prévio das sequências genômica das espécies estudadas, uma vez que vários desses elementos repetitivos intercalados estão conservados no Domínio Bactéria, possibilitando a formação de *fingerprints* espécie-específicos ou até mesmo cepa-específicos (VERSALOVIC et al. 1994; RADEMAKER & DE BRUIJIN 1997, SHANGKUAN et al. 2001; LIMA et al. 2002; DA SILVA e BEZERRA, 2013).

Com base no exposto, o presente estudo teve por objetivo identificar a diversidade morfológica e genética dos microrganismos cultivados presentes em fertilizantes orgânicos comerciais utilizados para o manejo de *Meloidogyne exigua*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Virologia Microbiana e Biocontrole de Doenças de Plantas (LAVIB), Setor de Fitopatologia do Núcleo de Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Manejo Fitossanitário de Pragas e Doenças (NUDEMAFI), situado na Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), localizada no município de Alegre – ES.

2.1 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE MICRORGANISMOS PRESENTES NOS BIOFERTILIZANTES VITAFLEX E MAXFERT

Para o isolamento dos microrganismos presentes nos biofertilizantes foi utilizada a metodologia de semeadura por espalhamento (MARIANO e SOUZA, 2016). Dessa forma, com o propósito de se obter colônias bacterianas isoladas para os processos de repicagem foram realizadas diluições seriadas dos biofertilizantes. Para isso, foi retirado 1 mL de cada produto e diluído em 9 mL de água destilada esterilizada (ADE) até a diluição 10^{-3} .

Após as diluições, foram pipetados 150 µL da suspensão em placas Petri contendo meios de culturas, para posterior espalhamento de forma homogênea com o auxílio de uma alça de Drigalsky, em Câmara de Fluxo.

Os meios utilizados para o isolamento foram o Ágar nutriente (AN), Batata Dextrose Ágar (BDA), Ágar Sabouraud Dextrose (SDA), Ágar Eosina Azul Metileno(EMB), Caldo Lactose (CL), Meio Kado. Sendo que os meios BDA e SDA são utilizados para isolamento e cultivo de fungos, enquanto AN, EMB, CL e Kado são utilizados para o isolamento e cultivo de bactérias. As placas foram incubadas em Câmara de crescimento bacteriano por um período de três dias a uma temperatura de 28°C.

Após o período de incubação, os isolados bacterianos foram analisados com base em parâmetros morfológicos das colônias, tais como: tamanho, pigmentação, forma, superfície, brilho, elevação e margens. Colônias puras de cada isolado bacteriano foram preservadas em microtubos de 2 mL contendo 1 mL de ADE e mantidas na Bacterioteca do LAVIB.

Depois de realizadas as preservações, foram realizadas novas diluições seriadas, em câmara de fluxo, transferindo-se 1µL da suspensão bacteriana em 9µL de ADE até a diluição 10^{-3} que foram pipetadas em meio de cultura Kado sólido para posterior espalhamento de forma homogênea com o auxílio de uma alça de Drigalsky, a fim de se obter colônias isoladas em número representativo. Após três dias de incubação em Câmara de crescimento bacteriano a 28°C, as placas foram analisadas com o auxílio de uma lupa da marca Leica modelo S8AP0 e fotografadas para a caracterização morfológica das bactérias.

2.2 DETECÇÃO DA PRODUÇÃO DE SIDERÓFOROS POR ISOLADOS BACTERIANOS PRESENTES NOS BIOFERTILIZANTES VITAFLEX E MAXFERT

Para fins de detectara produção de sideroforos frequentemente produzidos por *Pseudomonas* spp. do grupo fluorescente, realizou-se um *Spot test* com o meio de cultura King B, que é um meio de cultura que permite identificar a produção dessas moléculas através da propriedade de fluorescência após excitação em luz ultravioleta (KING et al., 1954), uma vez que o gênero *Pseudomonas* spp. do grupo fluorescente é o

maior representante de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCPs) gram-negativas documentadas.

Nesse sentido, foram realizadas pipetagens de 5µL da suspensão bacteriana ($DO_{570nm}=0,52$) preservada em placas contendo meio King B e em cada placa de Petri foram pipetados 28 isolados. Também foram pipetados 5 µL de suspensão bacteriana de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* como controle positivo para produção de sideróforos e *Ralstonia solanacearum* como controle negativo.

As placas foram incubadas em Câmara de crescimento bacteriano por um período de três dias a uma temperatura de 28°C. Após o período de incubação foi realizada a análise para detecção de fluorescência por meio da exposição das colônias bacterianas a luz UV do fotodocumentador Loccus L-Pix EX.

2.3 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS BACTERIANOS PRESENTES NOS BIOFERTILIZANTES VITAFLEX E MAXFERT

2.3.1 Extração do DNA genômico

A extração do DNA genômico das bactérias presentes nos biofertilizantes foi realizada conforme metodologia proposta por Narayan et al. (2016) com algumas adaptações. Resumidamente, as bactérias foram repicadas em meio de cultura Kado sólido 48-72h antes do procedimento de extração de DNA.

Em microtubos de 1,5 mL contendo 500µL de Suspension Buffer (S Buffer) (10% Sacarose, 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 50 mM EDTA (pH 8,0), 50 nM NaCl) o crescimento bacteriano foi recuperado com o auxílio de uma ponteira de 1000µL, raspando-se a cultura até obter um pellet de aproximadamente 20 a 40 mg, sendo homogeneizado em vórtex por 3min.

Após a homogeneização foram adicionados 20 µL de Lisozima (10 mg/ml) na suspensão de células e incubados em banho-maria a 37°C por 45 min, sendo realizadas vigorosas inversões em intervalos de 15 min, seguido pela adição de 5µL de Proteinase K (20 mg/ml) e novamente incubados a 37°C por 45 min. Posteriormente foram adicionados 50 µL de SDS (20% p/v) e levados para o banho-maria a 65°C por 45 min.

O lisado foi centrifugado a 11.000xg por 3 min a 20°C com o propósito de sedimentar os detritos celulares no fundo dos microtubos para então ser realizada a coleta e a transferência do sobrenadante para um novo microtubo de 1,5 mL contendo 20 µL de RNase A (5 mg/ml) e novamente incubado em banho-maria a 37°C por 45 min.

Para promover a precipitação de proteínas celulares e outros resíduos celulares foi adicionado o equivalente a 0,35X de Acetato de potássio 2,5 M (pH 8,0) e realizadas de 15 a 20 suaves inversões para retornar para a centrífuga em rotação baixa (6500xg) e alta (8000xg) a 20°C por 3 min a fim de promover a sedimentação do precipitado. O sobrenadante foi novamente coletado e transferido para um novo microtubo de 1,5 mL e adicionado o mesmo volume de sobrenadante coletado, de isopropanol, sendo realizadas suaves inversões e incubando por 5 min em temperatura ambiente.

Após a incubação, a solução foi centrifugada a 11.000 xg a 4°C por 20 min a fim de promover a sedimentação do DNA e para o descarte do sobrenadante. Os pellets de DNA foram lavados duas vezes com 200µL etanol 70% e após cada adição os microtubos foram levados para a centrífuga a 11.000 xg a 4°C por 2 min e posterior descarte do sobrenadante. Uma nova centrifugação a 11.000 xg a 4°C por 2 min foi realizada a fim de promover a descida do etanol 70% remanescente presente nas paredes dos microtubos, sendo retirado com o auxílio de ponteiras de 10µL.

Após esse procedimento os microtubos foram deixados em aberto para a finalização da secagem em capela durante 10 min e ressuspensos em 50µL de TE (pH 8,0) e armazenados a -20°C.

Após a quantificação, o DNA genômico teve a integridade analisada em gel de agarose a 1% em tampão TAE 1X, sob eletroforese a 80 V por 1 hora. Com base no gel foi possível observar que as amostras selecionadas apresentaram boa concentração de material genético e boa integridade para a realização do Rep-PCR (dados não mostrados).

2.3.2. Fingerprint genômico utilizando Rep-PCR

As reações de PCR foram realizadas conforme foi proposto por Da Silva e Bezerra (2013). Para as reações utilizando os primers ERIC e BOX as amplificações foram conduzidas utilizando 1µL de DNA genômico (30 ng/ µL), 0,5 µL de primers (10µM/

μL) e 12,5 μL de Taq Polimerase – Master mix (2X) Green (Cellco Biotec) e volume de água ultra pura até completar 25 μL de reação. As sequências de primers foram desenhadas por Versalovic et al. (1994):

- ERIC-1: 5'- ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C- 3';
- ERIC-2: 5'- AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G- 3';
- BOX A1R: 5'-CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G- 3'.

As ampliações foram realizadas em um termociclador Loccus TC-9639 utilizando o seguinte programa: 5 min a 94°C, seguido de 40 ciclos a 94°C por 1 min, 50°C por 1 min e 72°C por 2 min. Foi adicionado um passo de extensão a 72°C durante 7 min. Os fragmentos amplificados foram separados em gel de agarose a 1,2% em tampão TAE (0,5 M EDTA; 1M TRIS, pH 8,0; ácido acético), sob eletroforese a 80V por 1 hora e 30 min, e antes da corrida foram adicionadas às amostras 1 μL de GelRed 10.000X. Após a corrida, o gel de agarose foi levado para o fotodocumentador Loccus L-Pix EX para ser analisado e fotografado.

Para as reações utilizando os primers REP as ampliações foram conduzidas utilizando 2 μL de DNA genômico (30 ng/ μL), 0,5 μL de primers (10 μM / μL) e 12,5 μL de Taq Polimerase – Master mix (2X) Green (Cellco Biotec) e volume de água ultra pura até completar 25 μL de reação. As sequências de primers foram desenhadas por Versalovic et al. (1994):

- REP1R- 5'- III ICG ICG ICA TCI GGC -3';
- REP2I- 5'- ICG ICT TAT CIG GCC TAC -3'.

As ampliações foram realizadas em um termociclador Loccus TC-9639 utilizando o seguinte programa: 5 min a 94°C, seguido de 41 ciclos a 94°C por 1 min, 45°C por 1 min e 72°C por 2 min. Foi adicionado um passo de extensão a 72°C durante 7 min. Os fragmentos amplificados foram separados em gel de agarose a 1,5% em tampão TAE (0,5 M EDTA; 1M TRIS, pH 8,0; ácido acético), sob eletroforese a 80V por 1 hora e 30 min, e antes da corrida foram adicionadas às amostras 2 μL de GelRed 10.000X. Após a corrida, o gel de agarose foi levado para o fotodocumentador Loccus L-Pix EX para ser analisado e fotografado.

Os resultados do fingerprinting foram analisados pelo pacote de software GelJ (HERAS et al., 2015). A similaridade entre os perfis digitalizados foi calculada usando o Coeficiente de Similaridade Jaccard (CSJ), e, com base nas estimativas de dissimilaridades dos isolados, esses perfis foram agrupados pelo método hierárquico UPGMA (Método da Ligação Média Entre Grupos).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE MICRORGANISMOS PRESENTES NOS BIOFERTILIZANTES VITAFLEX E MAXFERT

Após o plaqueamento dos biofertilizantes e isolamento dos microrganismos presentes nos meios de cultura AN, BDA, SDA, EMB, CL e Kado foi obtido um total de 218 bactérias, não sendo constatada a presença de fungos nos biofertilizantes apenas bactérias. Das 218 bactérias encontradas nos isolamentos, 166 pertencem ao biofertilizante Vitaflex e 52 ao Maxfert (Tabela 1).

Tabela 1. Relação do número de bactérias isoladas para cada meio de cultura testado

| Meios de cultura | Vitaflex | Maxfert | Total |
|---------------------------------|------------|-----------|------------|
| Agar nutriente (AN) | 7 | 3 | 10 |
| Batata Dextrose Agar (BDA) | 39 | 9 | 48 |
| Ágar Sabouraud Dextrose (SDA) | 6 | 0 | 6 |
| Ágar Eosina Azul Metileno (EMB) | 0 | 0 | 0 |
| Caldo Lactose (CL) | 50 | 8 | 58 |
| Meio Kado | 64 | 32 | 96 |
| Total | 166 | 52 | 218 |

Entre os meios de cultura utilizados para o isolamento, o meio Kado foi o que possibilitou o crescimento do maior número de bactérias em ambos os biofertilizantes, com um total de 96 microrganismos, sendo 64 do Vitaflex e 32 do Maxfert, representando 44,04% dos isolados encontrados. Para o meio CL, 58 isolados foram encontrados (26,61%), sendo 50 no Vitaflex e oito no Maxfert. Já para o BDA, foram obtidos 48 isolados (22,02%), sendo 39 do biofertilizante Vitaflex e nove do Maxfert (Tabela 1).

O meio AN apresentou 10 isolados (4,59%) sendo sete do Vitaflex e três do Maxfert. O meio de cultura SDA foi o que apresentou o menor número de isolados encontrados, num total de seis (2,75%), todos presentes no Vitaflex. Apenas o meio de cultura EMB não apresentou isolado (Tabela 1).

A variação de número de isolados obtidos em cada biofertilizantes, assim como o número de bactérias por meio de cultura, está associada diretamente ao processo de fabricação dos biofertilizantes. Ambos os biofertilizantes utilizam o melaço da cana-de-açúcar como matéria-prima para sua fabricação, sendo que o Maxfert utiliza o processo natural de fermentação do melaço, enquanto o Vitaflex utiliza uma técnica japonesa que associa a fermentação natural e a adição de microrganismos benéficos (Informações da empresa). A composição dos biofertilizantes e como esses produtos atuam quando aplicados no campo está diretamente relacionado ao número de microrganismos encontrados.

O Vitaflex, além da adição dos microrganismos, possui em sua composição aminoácidos, vitaminas, antibióticos, enzimas, bioestimulantes e substâncias antagônicas que são subprodutos do processo de fermentação dos microrganismos.

Dessa forma, o Vitaflex atua no processo de fotossíntese, absorção de nutrientes, estímulo à brotação de gemas e ação contra agentes fitopatogênicos. Já o Maxfert é um produto rico em matéria orgânica, utilizado para melhorar a fisiologia da planta e a microbiota presente no solo, uma vez que o teor de ácidos húmicos presente nesse produto é de 5,7%, enquanto no Vitaflex é de 0,36% (AGRO HUMUS, 2019).

O ácido húmico promove um aumento da microbiota presente no solo e auxilia no crescimento vegetativo pelo aumento da emergência de raízes laterais (local da interação entre as rizobactérias e o hospedeiro), além de facilitar a penetração das

rizobactérias devido ao afrouxamento da parede celular em decorrência da presença de compostos com subunidades da auxina (CONCEIÇÃO et al., 2009; CARON et al., 2015). Nesse sentido, com base em seu método de produção e ao seu modo de ação ao ser aplicado no campo, o Maxfert atua mais como um condicionador da microbiota presente no solo justificando assim o menor número de isolados encontrados.

Entre os meios testados no presente estudo, o meio Kado foi o mais eficiente em relação ao número de isolados total e por produtos. As causas podem estar relacionadas à composição do meio, uma vez que o meio Kado é o mais enriquecido entre os meios utilizados no estudo.

Entre os componentes presentes em sua constituição a caseína hidrolisada e o extrato de levedura podem ser os responsáveis pela superioridade do meio Kado, no qual a caseína atua como fonte de proteínas e o extrato de levedura como fonte de vitaminas principalmente do grupo B, importantes para o desenvolvimento das bactérias (VIOLATTI e TEBALDI, 2016). Já os meios BDA, CL e NA são meios não seletivos, ou seja, uma ampla gama de microrganismos pode se desenvolver. Contudo, para o desenvolvimento de microrganismos é necessário que os meios possuam em sua composição carbono e minerais para o seu desenvolvimento (SCHMIDELL et al., 2001). Dessa forma, os meios BDA e CL apresentaram maior número de isolados encontrados por serem meios mais ricos em carbono (dextrose e lactose) atendendo a necessidade das bactérias que foram encontradas quando comparados com o meio AN.

O meio SDA é um meio seletivo para fungos patogênicos e leveduras, uma vez que, devido ao alto teor de dextrose, promove uma acidificação do meio ($\text{pH} \pm 5,6$) (HARE, 2013). Dessa forma, o baixo número de isolados encontrados no meio SDA está relacionado ao pH do meio, pois para a maioria das bactérias é necessário um pH próximo da neutralidade (6,8-7,5) para poderem se desenvolver (ENGELKIRK e ENGELKIRK, 2012). A não presença de isolados no meio de cultura EMB está associada à seletividade do meio.

O meio EMB é utilizado para o isolamento e diferenciação de bacilos entéricos Gram-negativos, pertencentes à família *Enterbacteriaceae*. O EMB é utilizado principalmente para testar materiais clínicos, alimentos e produtos lácteos, sendo utilizado para detectar fermentadores de lactose como a *Escherichia.coli* (HORWITZ et al., 2010).

Os gêneros *Escherichia* spp, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia* spp., membros da família *Enterbacteriaceae*, são de grande importância para a segurança alimentar, uma vez que esses gêneros são os principais agentes de infecções intestinais e causam sérios problemas de saúde pública no Brasil. (SOUSA, 2006). Dessa forma, com base nos resultados obtidos, ambos os biofertilizantes não possuem esse grupo de bactérias em sua composição, não apresentando qualquer risco à saúde de quem os manipula.

Com base nas características morfológicas (tamanho, forma, elevação, superfície, brilho e cor) observadas a partir das colônias bacterianas isoladas (Tabela 3 - Anexos e Figura 1), foi possível agrupar os 218 isolados em 61 grupos distintos. Nos quais, 21 isolados estão presentes nos dois biofertilizantes, 38 isolados foram encontrados apenas no Vitaflex e dois isolados encontrados apenas no Maxfert.

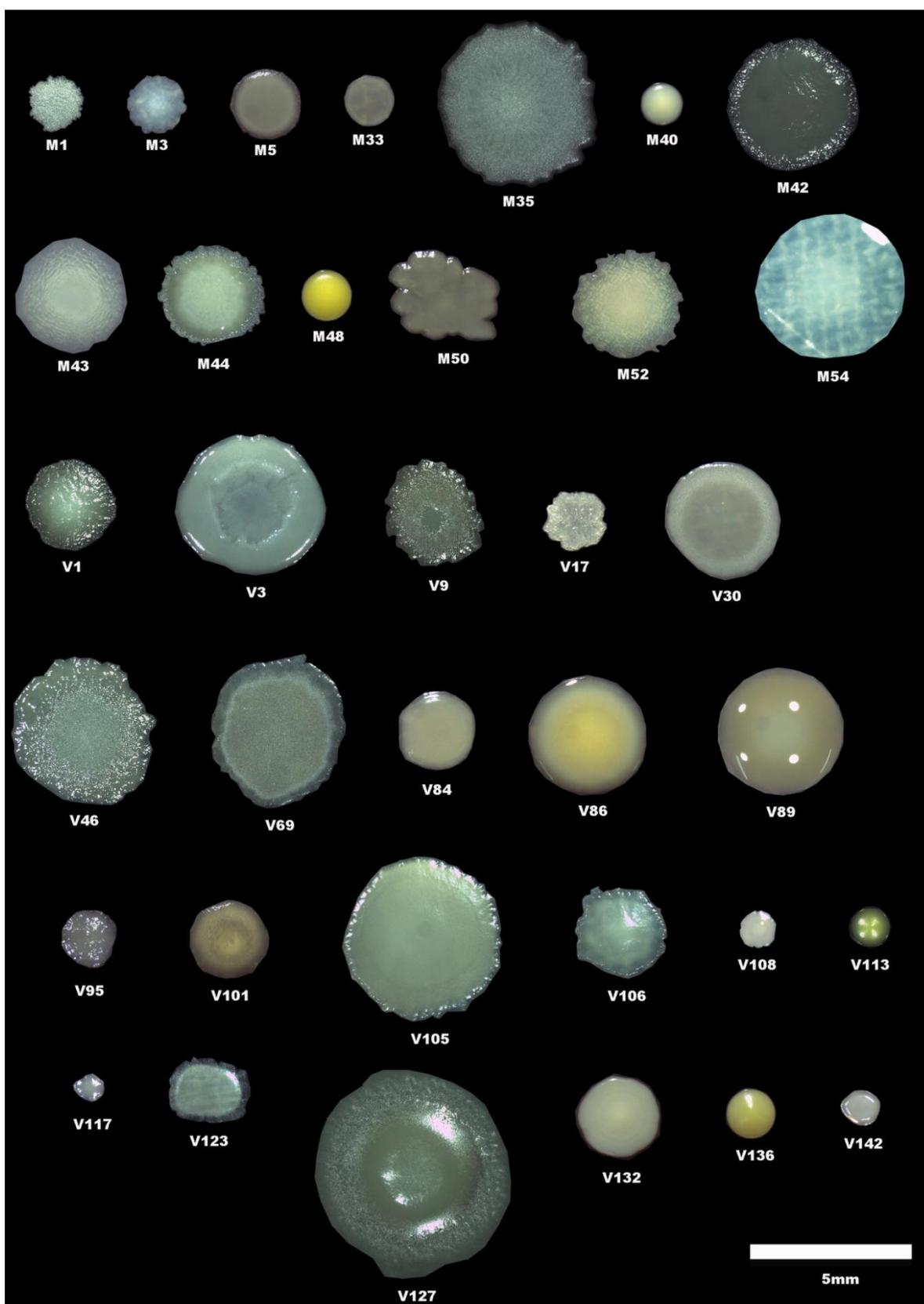


Figura 1. Colônias isoladas de alguns representantes de grupos de bactérias encontrados nos biofertilizantes Maxfert (M) e Vitaflex (V).

Os biofertilizantes Vitaflex e Maxfert são produzidos a partir do processo de fermentação da cana-de-açúcar. Nesse sentido, os 21 grupos de isolados que estão presentes nos dois biofertilizantes podem compor o grupo de bactérias que estão presentes naturalmente no material de origem sem a necessidade de serem adicionados (AGRO HUMUS, 2019). No entanto, como base nas informações presentes na bula, o Vitaflex possui, em sua composição, microrganismos benéficos. Dessa forma, os 38 grupos encontrados no após a caracterização morfológica podem estar associados aos microrganismos relatados na bula do Vitaflex.

Segundo Hungria e Silva (2011), a caracterização morfológica de colônias bacterianas possui potencial tanto para superestimar quanto para subestimar a diversidade de espécies devido a variações morfológicas intraespecíficas ou por semelhanças morfológicas comuns a várias espécies. Segundo os autores, as características fenotípicas de um determinado microrganismo não são estáveis, podendo sofrer alteração dependendo das condições de desenvolvimento. Contudo, para a realização da caracterização morfológica, todos os isolados do presente estudo foram repicados em meio Kado e foram mantidos sob a mesma condição de temperatura (28°C). Nesse sentido, o meio não influenciou nas características morfológicas dos isolados uma vez que os mesmos estavam sob mesma condição de temperatura, pH e nutrientes para seu desenvolvimento.

A caracterização morfológica de colônias bacterianas, embora trabalhosa e até certo ponto subjetiva, é importante como uma primeira aproximação para a avaliação da diversidade de populações microbianas. Em estudos que apresentam um grande número de representantes, como os do presente estudo, é de suma importância realizar a caracterização a fim de selecionar representantes de cada grupo, promovendo assim uma diminuição no número de isolados com perfis similares, o que favorece a otimização de formulações microbianas comerciais. Nesse sentido, o uso de critério morfológico (tamanho, forma, estrutura etc.) permite diferenciar uma espécie de outra e pode servir inicialmente de base para medidas de biodiversidade. Contudo, outros critérios complementares (bioquímicos, fisiológicos, genéticos) são indispensáveis para classificar adequadamente os microrganismos (RIBEIRO e CARDOSO, 2012).

3.2 DETECÇÃO DA PRODUÇÃO DE SIDERÓFOROS POR ISOLADOS BACTERIANOS PRESENTES NOS BIOFERTILIZANTES VITAFLEX E MAXFERT

Com base nos resultados obtidos pelo Spot test em meio King B, nenhuma das 218 bactérias isoladas apresentou pigmentos fluorescentes, uma vez foi detectada a presença de pigmentos fluorescentes apenas em *P. syringae* pv.*tomato* (Figura 2A e 2B). Para confirmar os resultados do teste em meio King B foi gerada uma imagem em 3D que evidencia o pico de excitação para os isolados bacterianos na presença da luz UV, quando a produção de sideróforos ocorre em meio de cultura (Figura 2C).

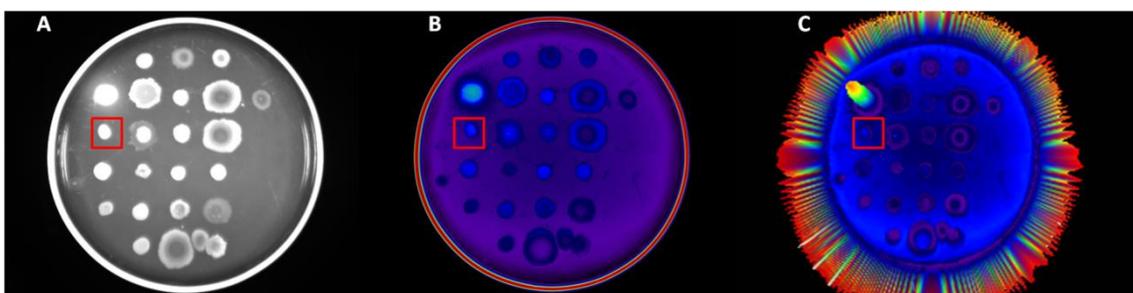


Figura 2. Teste em meio King B: A) Na presença de luz UV; B) Na presença da luz UV saturada para evidenciar a fluorescência e C) Imagem em 3D evidenciando o pico de excitação dos sideróforos gerados no controle positivo. Fotos realizadas no fotodocumentador Loccus L-Pix EX. A marcação em vermelho indica o controle negativo *Ralstonia solanacearum*.

O teste em meio king B tem como principal objetivo detectar a presença de *Pseudomonas* spp. do grupo Fluorescente que são facilmente distinguíveis de outras rizobactérias, quando cultivadas sob essas condições nutricionais (KING et al., 1954), devido a sua capacidade em produzir pigmento verde-amarelado fluorescente sob luz ultravioleta, graças à grande quantidade de sideróforos (STANIER et al., 1966). O gênero *Pseudomonas* é o maior representante de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCPs) gram-negativas documentadas, sendo que o maior número das espécies pertence ao grupo das fluorescentes. Sendo assim uma forma de identificação de bactérias.

A não presença de *Pseudomonas* spp. do grupo fluorescente não descarta a hipótese que exista bactérias do gênero *Pseudomonas* spp., uma vez que trata-se de um gênero heterogêneo e que apresenta dois grupos distintos que são classificados com base na capacidade de produzir pigmentos (pioverdina) ou de acumular poli- α -hidroxibutirato (não fluorescentes) (ZAGO, 2000).

3.3 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS BACTERIANOS PRESENTES NOS BIOFERTILIZANTES VITAFLEX E MAXFERT

3.3.1 Extração do DNA genômico

A escolha dos representantes dos grupos formados foi realizada após a caracterização morfológica das colônias (Tabela 4-Anexo) e em seguida, de posse do DNA genômico extraído, a concentração e a pureza (Tabela 4-Anexo) foram checadas para conclusão da análise de rotina.

Além da concentração do DNA genômico também foram checadas a relação 260/280 nm e 260/230 nm, ambas as relações são utilizadas para analisar a pureza do DNA. Na relação 260/280 é considerado como puro quando o valor da relação fica entre 1,8 -2,0, caso o valor da relação for consideravelmente mais baixa, poderá indicar a presença de proteínas, fenol ou outros contaminantes que absorvem fortemente a 280 nm ou próximos a eles.

Já a relação 260/230 é uma medida secundária da pureza do ácido nucléico. Os valores de 260/230 para um ácido nucléico "puro" costumam ser mais altos que os respectivos valores de 260/280 e geralmente estão na faixa de 1,8-2,2. Se a proporção for consideravelmente mais baixa, isso pode indicar a presença de contaminantes co-purificados (SCIENTIFIC, 2009).

3.3.2. Fingerprint genômico utilizando Rep-PCR

O número de fragmentos gerados usando o primer BOX variou de 1 a 7 por isolado com um tamanho variando entre 4000 a 300 pb (Figura 3A). Os primers ERIC geraram de 2 a 8 fragmentos por isolado variando o tamanho entre 3000 a 75 pb (Figura 3B). Já os primers REP geraram de 2 a 5 fragmentos que variaram de 7000 a 200 pb (Figura 3C).

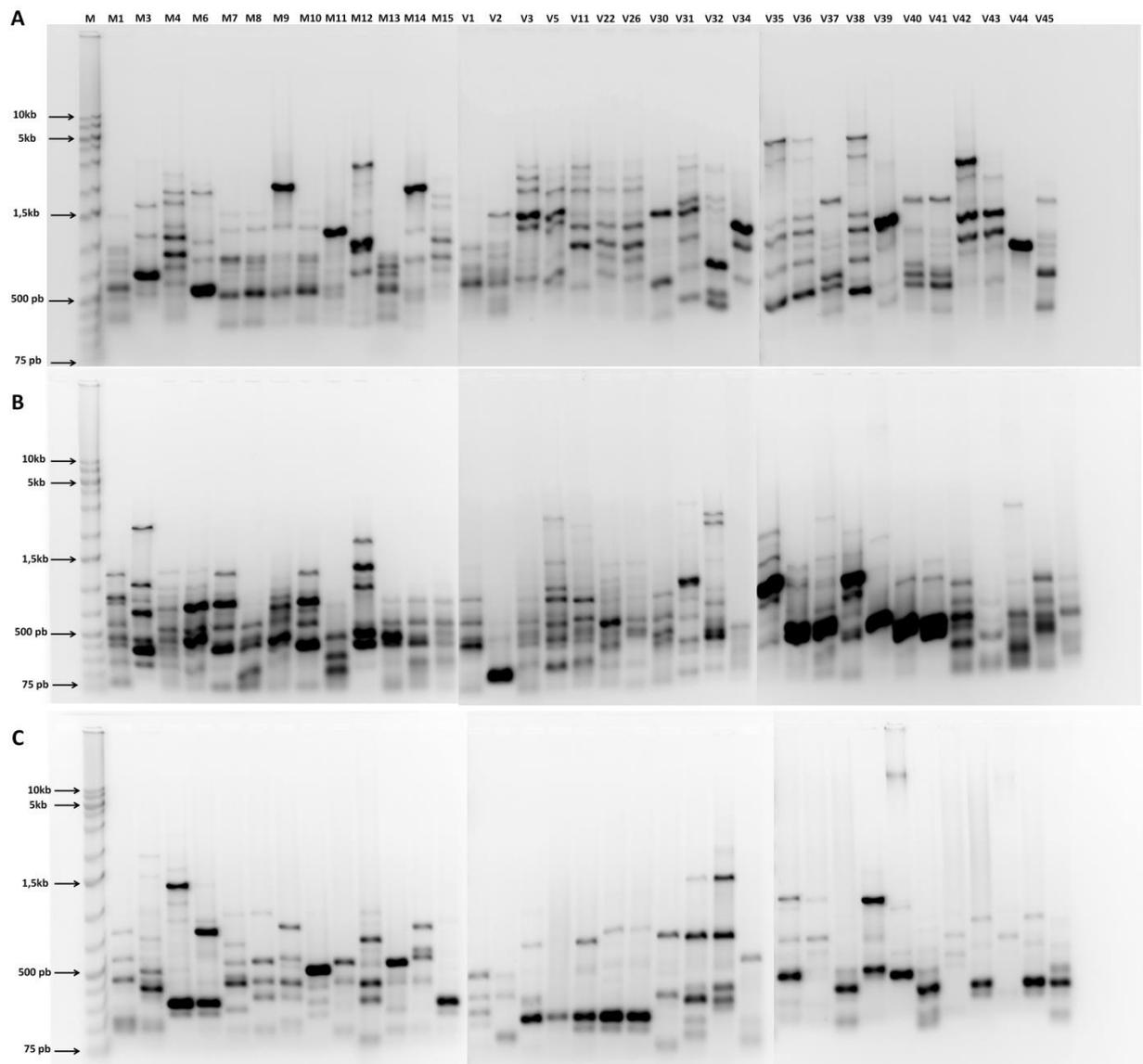


Figura 3. Rep-PCR de alguns representantes de isolados presentes no Vitaflex (V) e Maxfert (M). (A) BOX; (B) ERIC; (C) REP. A primeira canaleta com a letra M indica o Marcador 1 kb Plus DNA Ladder (Cellco Biotecnologia).

Por meio da análise de agrupamento UPGMA, para os 61 grupos de isolados no presente estudo (Figura 7- Anexos) foi possível gerar três dendrogramas (Figuras 4, 5 e 6). Para os três dendrogramas foi possível observar uma mudança abrupta a partir de 70% similaridade. Dessa forma, para os três dendrogramas o ponto de corte foi de 70% (Figuras 4,5 e 6).

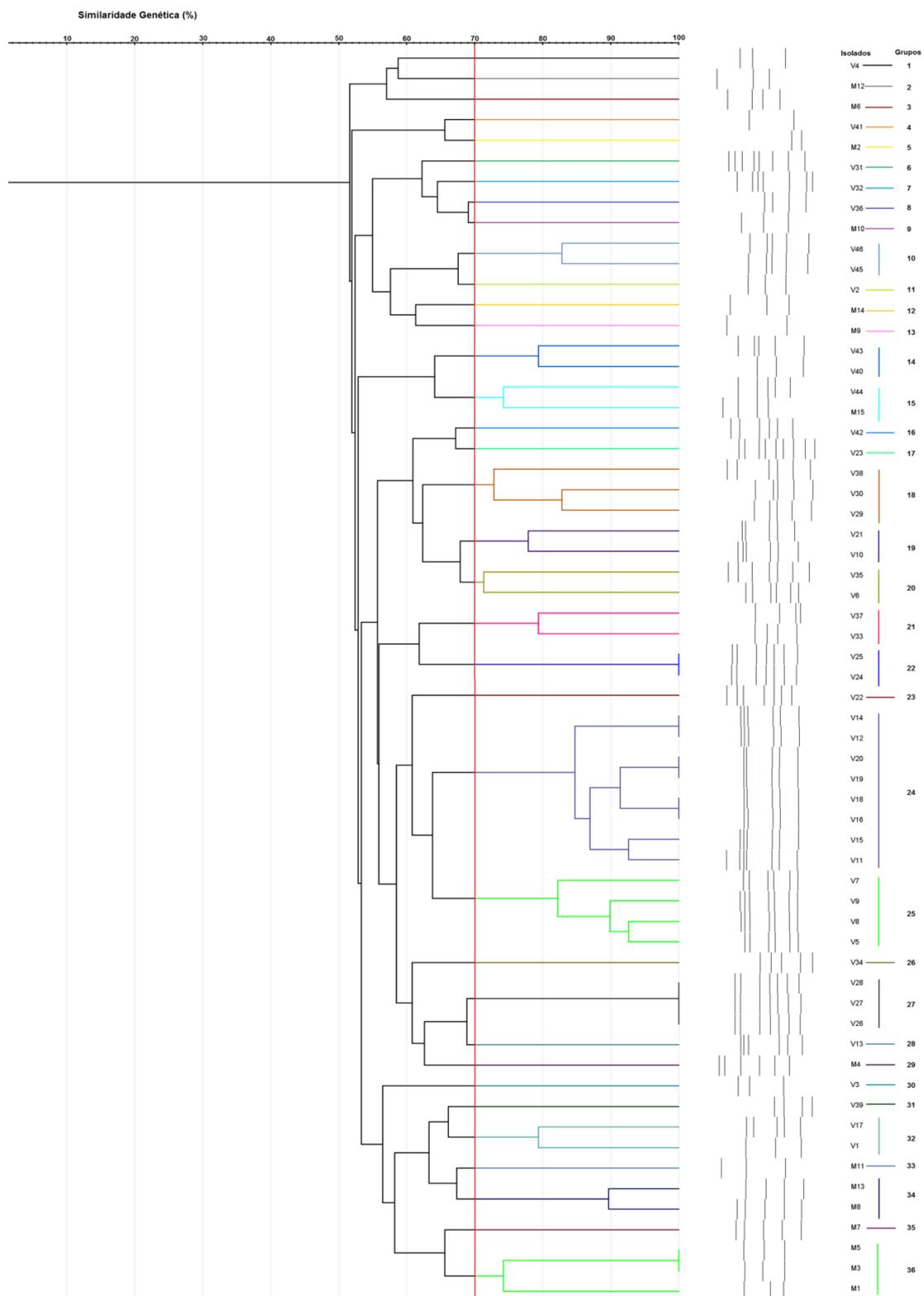


Figura 4. Dendrograma da diversidade gênica dos isolados encontrados nos biofertilizantes Vitaflex (V) e Maxfert (M) construído com base na matriz de similaridade pelo complemento do Coeficiente de Jaccard, com os dados gerados pelo primers BOX, usando o método das médias das distâncias (UPGMA).

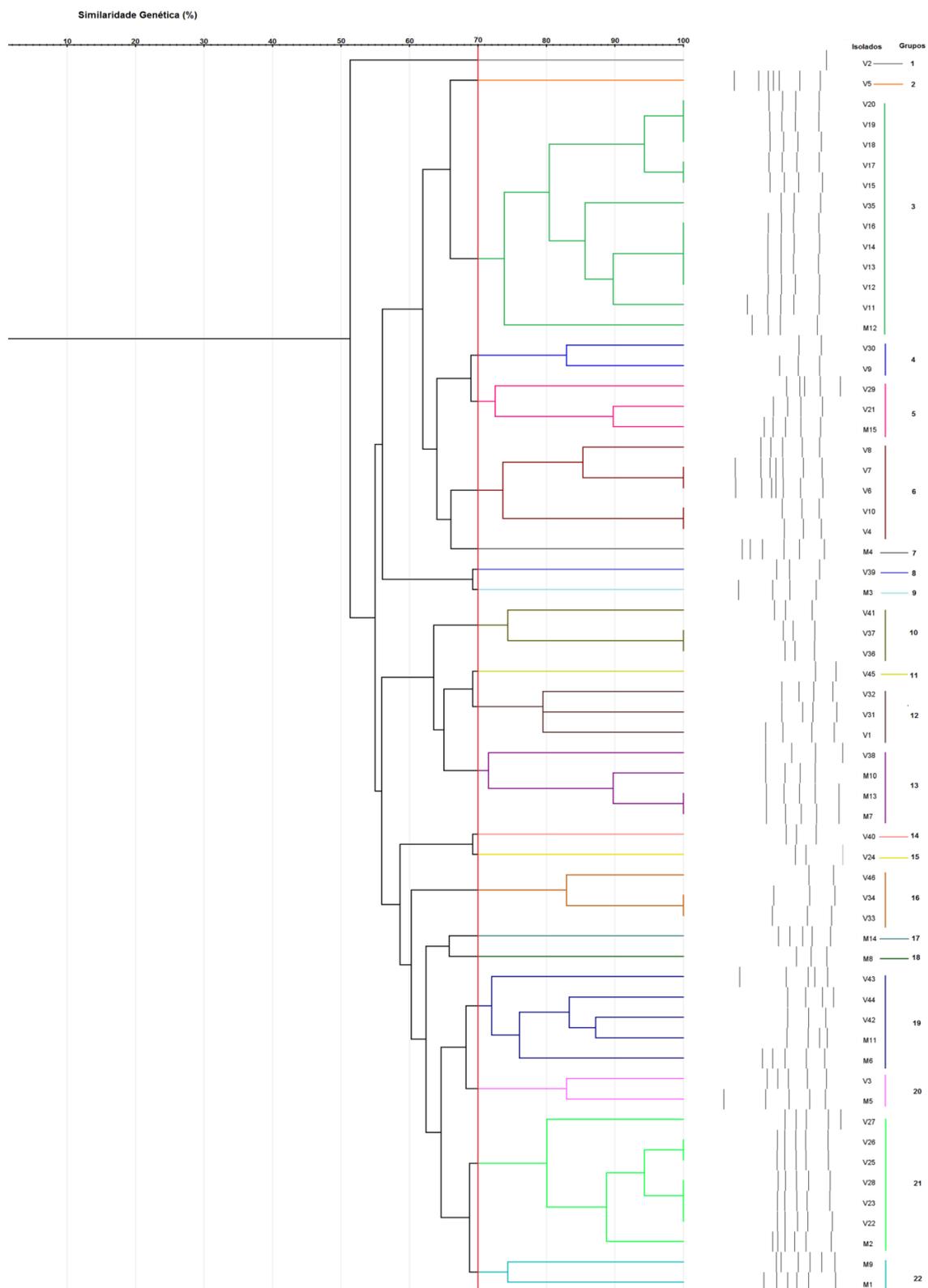


Figura 5. Dendrograma da diversidade gênica dos isolados encontrados nos biofertilizantes Vitaflex (V) e Maxfert (M) construído com base na matriz de similaridade pelo complemento do Coeficiente de Jaccard, com os dados gerados pelo primers ERIC, usando o método das médias das distâncias (UPGMA).

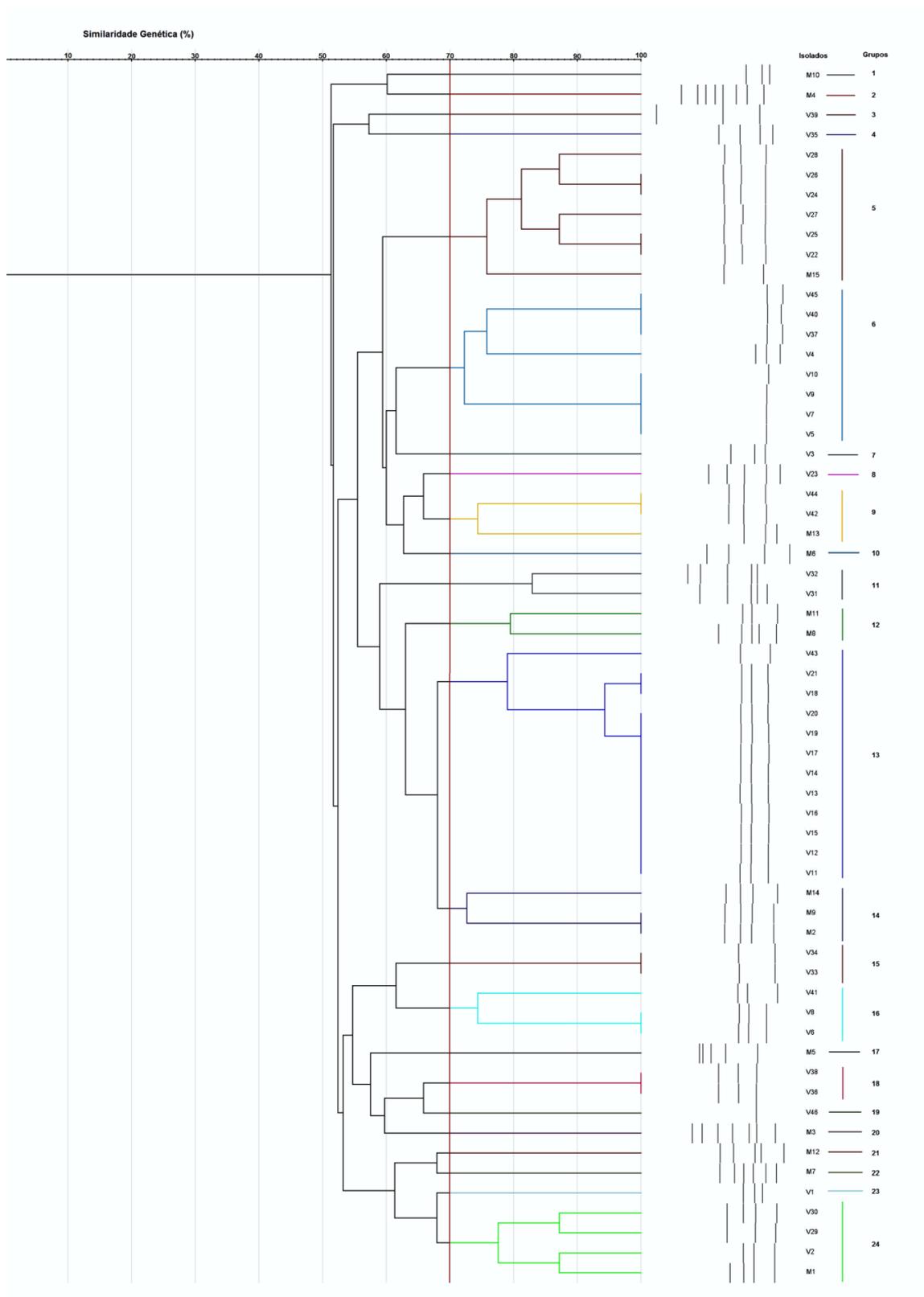


Figura 6. Dendograma da diversidade gênica dos isolados encontrados nos biofertilizantes Vitaflex (V) e Maxfert (M) construído com base na matriz de similaridade pelo complemento do Coeficiente de Jaccard, com os dados gerados pelo primers REP, usando o método das médias das distâncias (UPGMA).

Utilizando 70% de similaridade como ponto de corte, houve diferenças quanto ao número de grupos formados para cada primer. Para o primer BOX houve a formação de 36 clusters, dos quais os grupos 2, 3, 5, 8, 9, 12, 15, 19, 20, 24, 27, 29, 32, 33, 34 e 36 são compostos por isolados presentes nos dois biofertilizantes. Os grupos 1, 4, 6, 7, 10, 11, 14, 16, 17, 18, 21, 22, 23, 25, 26, 28, 30 e 31 são compostos de isolados presentes apenas no Vitaflex. Já os isolados que compõem os grupos 13 e 35 foram encontrados apenas no Maxfert (Figura 4).

Houve a formação de 22 clusters para os primers ERIC. Nos quais, os grupos 3, 5, 7, 9, 12, 13, 17, 18, 19, 20, 21, e 22 são compostos por isolados encontrados nos dois biofertilizantes. Já os grupos 1, 2, 4, 6, 8, 10, 11, 14, 15 e 16 são de isolados presentes apenas no Vitaflex (Figura 5).

Para os primers REP houve a formação de 24 clusters, nos quais os grupos 1, 2, 4, 5, 6, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 18, 21, 22 e 24 foram encontrados nos dois biofertilizantes. Enquanto os grupos 3, 7, 8, 9, 16, 17, 19 e 20 foram encontrados apenas no Vitaflex. Já o grupo 23 foi encontrado apenas no Maxfert (Figura 6).

A diferença no número de grupos formados está relacionada com a distribuição e diversidade dos distintos elementos repetitivos (sequências repetitivas) para cada genoma que são alvos durante a reação de PCR.

As sequências REP (Repetitive Extragenic Palindromic) foram descritas e identificadas na enterobactéria *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium* (HIGGINS et al., 1982). São constituídas de 38 pares de base sendo sequências que estão presentes nas regiões intercistrônicas de diferentes operons (GILSON et al., 1984).

Já os elementos ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) também foram identificados nas regiões intergênicas dentro e entre operons, sendo semelhantes às sequências REP. Entretanto, as sequências ERIC apresentam um maior número de pares de base (124-127) e não estão restritas apenas às regiões transcritas dos genes, estando presentes também em regiões não codificadoras do cromossomo. Frequentemente são localizadas entre genes em operons com a posição variando em relação ao promotor ou terminador nas diferentes repetições (SHARPLES & LLOYD, 1990). Justificando, assim, o número de grupos entre os primers REP e ERIC serem próximos.

Os elementos BOX estão localizados nas regiões intergênicas, podendo formar estruturas *stem-loop* devido a sua simetria palindrômica (OLIVE & BEAN, 1999). Segundo Martins et al. (1992), a localização dos elementos BOX sugere uma possibilidade de que sejam elementos regulatórios. Os autores também reportaram que os elementos BOX não possuem sequências relacionadas com os elementos REP e ERIC.

Ao utilizar os primers REP, ERIC e BOX para estimativa da similaridade dos isolados obtidos nesse estudo, faz-se necessário analisar os três dendogramas em conjunto, a fim de se observar padrões semelhantes, pois quando analisados separadamente são percebidas diferenças na formação dos clusters, não sendo tão informativo quando analisados em conjunto. Dessa forma, para que os isolados sejam considerados similares é necessário que eles estejam juntos nos clusters formados para os três primers no presente estudo (DA SILVA e BEZERRA, 2013).

Com base na análise em conjunto dos três dendogramas gerados (Figuras 4,5 e 6), foi possível observar que os isolados V11, V12, V13, V15, V16, V18, V19 e V20 foram considerados similares a 70%, pois nos três dendogramas gerados, os respectivos isolados, foram agrupados em conjunto (Cluster 24 no BOX; Cluster 3 para o ERIC e Cluster 13 no REP). O mesmo é observado para os isolados V26 e V27 (Clusters 27 no BOX; 21 no ERIC e 5 no REP).

Com base nas características morfológicas e meios de cultura em que se desenvolveram, foi possível observar que os isolados V11, V12, V13, V15, V16, V18, V19 e V20 se desenvolveram em meio BDA, e apresentou semelhanças quanto ao tamanho (média), forma da colônia (circular), tendo variações em relação à superfície ficando entre o liso e o rugoso e na coloração variando do branco para o creme. Outro ponto a ser levado em consideração é que os isolados tratam-se de uma mesma cepa que apresentou variações fenotípicas ao longo dos processos de repicagem.

Já os isolados V26 e V27 desenvolveram-se no meio CL e têm semelhanças quanto ao tamanho (Média), elevação (elevada) e superfície (rugosa) das colônias isoladas e, assim como citado anteriormente, esses dois isolados são produtos de variações fenotípicas de uma mesma bactéria em diferentes condições de cultivo.

Outra informação obtida a partir da análise em conjunto dos dendogramas foi a organização no número de isolados presentes nos dois biofertilizantes. Os isolados M7 e M9 (grupos 7 e 9, respectivamente), que foram encontrados apenas no biofertilizante Maxfert, foram agrupados junto com isolados presentes no Vitaflex ou com isolados encontrados em ambos os biofertilizantes.

Dessa forma, com a análise dos dendogramas foi possível comprovar que todas as bactérias isoladas no Maxfert são provenientes do próprio material de origem por meio do processo de fermentação natural, além de estarem presentes na composição do Vitaflex. Com o auxílio do REP-PCR foi possível verificar que os isolados V4, V5, V7, V8, V9, V33, V34, V37, V39, V40, V41, V45 e V46 estão presentes apenas no biofertilizante Vitaflex, uma vez que foram agrupados junto com isolados encontrados apenas neste biofertilizante.

Nesse sentido, o uso da Rep-PCR possibilitou ampliar o conhecimento sobre a biodiversidade da microbiota presente nos biofertilizantes, além de possibilitar uma triagem genética dos isolados, a partir dos quais, 218 bactérias que foram isoladas nos produtos Vitaflex e Maxfert foram agrupadas em 53 clusters, dos quais 40 grupos estão presentes nos dois biofertilizantes e 13 estão presentes apenas no Vitaflex.

O uso da técnica de Rep-PCR vem sendo descrito na bibliografia para a caracterização da diversidade de bactérias simbióticas e patogênicas à plantas. Segundo Louxs et al. (1994, 1995), o uso dos primers de Rep-PCR promoveu a formação de padrões genômicos distintos em linhagens de *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas campestris* e, *X. oryzae*.

Bouzar et al. (1999) estudaram a diversidade genética de 400 linhagens de *Xanthomonas* spp. de 32 pontos da América Central e Caribe utilizando o Rep-PCR, sendo possível agrupá-las em dois grandes grupos.

O REP-PCR vem promovendo uma melhor compreensão da diversidade genética da microbiota presente na rizosfera, bem como auxiliando na identificação de potenciais microrganismos antagônicos que podem ser utilizados na agricultura brasileira (GAO et al., 2001; MENNA et al., 2009; NGAMAU et al., 2012; KUMAR et al., 2014). A aplicação da técnica de Rep-PCR permite a caracterização de rizobactérias com uma maior segurança, uma vez que essa caracterização não está sujeita a riscos como a ação

do meio ambiente (meio de cultura, temperatura, pH), já que as características genótípicas são as mesmas (GAO et al., 2001; NGAMAU et al., 2012).

Com a triagem genética dos isolados presentes nos biofertilizantes Maxfert e Vitaflex foi possível selecionar representantes (com base em análises visuais dos géis) para a condução de bioensaios a fim de se compreender como os isolados atuam nas relações multitróficas entre patógeno-hospedeiro-antagonista.

Os bioensaios estão sendo conduzidos em casa de vegetação, e com base nos resultados será possível realizar uma compilação total dos dados obtidos da caracterização morfológica, genética e mecanismos de ação na indução de crescimento e controle de fitonematoides, a fim de se confirmar a efetividade dos isolados nos diferentes biofertilizantes.

Dessa forma, será possível que futuramente possa ser realizada uma otimização nos formulados dos biofertilizantes acrescentando de forma isolada ou enriquecendo o produto com cepas específicas que não terão que competir com cepas que não adicionam a capacidade do produto em combater os nematoides.

Nesse sentido, o Rep-PCR fornece um suporte mais concreto nas informações sobre as comunidades microbianas presentes em biofertilizantes, sendo possível compilar essas informações, com características morfológicas e bioquímicas e compreender a forma de atuação das rizobactérias na interação multitrófica entre rizobactérias-hospedeiro-patógenos (NGAMAU et al., 2012).

4 CONCLUSÃO

A caracterização morfológica possibilitou agrupar 218 bactérias isoladas nos biofertilizantes Vitaflex e Maxfert em 61 grupos, sendo dois isolados encontrados no biofertilizante Maxfert, 38 no biofertilizante Vitaflex e 21 presentes em ambos os biofertilizantes.

Os produtos não possuem, em sua composição, bactérias da família *Enterbacteriaceae* e *Pseudomonas* spp. do grupo fluorescente.

A técnica de Rep-PCR possibilitou promover uma triagem genética dos isolados, na qual reorganizou os 61 grupos previamente agrupados em 53 grupos, sendo que 40 isolados estão presentes nos dois biofertilizantes e 13 estão presentes apenas no Vitaflex.

A técnica de Rep-PCR possibilita informações mais concretas sobre as comunidades microbianas presentes nos biofertilizantes, sendo necessário compilar essas características aos mecanismos de ação dos isolados nas interações multitróficas entre patógeno-hospedeiro-antagonista, a fim de se compreender como os produtos atuam no controle os nematoides.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRO HUMUS - AGRO HUMUS: Adubos Orgânicos. Disponível em: <<https://www.agrohumusorganicos.com/>>. Acesso em: 10 de dez. de 2019.

AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. Manual de fitopatologia: princípios e conceitos. **São Paulo**, 2011.

BERG, G.; GRUBE, M.; SCHLOTTER, M.; & SMALLA, K. The plant microbiome and its importance for plant and human health. **Frontiers in microbiology**, v. 5, p. 1, 2014.

BOUZAR, H. et al. Multiphasic analysis of xanthomonads causing bacterial spot disease on tomato and pepper in the Caribbean and Central America: evidence for common lineages within and between countries. **Phytopathology**, v. 89, n. 4, p. 328-335, 1999.

CARON, V. C.; GRAÇAS, J. P.; CASTRO, P. R. C. Condicionadores do solo: ácidos húmicos e fúlvicos. **Piracicaba: ESALQ/USP**, 2015.

CASARRUBIA, S. et al. Ecologically different fungi affect arabidopsis development: contribution of soluble and volatile compounds. **PloS one**, v. 11, n. 12, p. e0168236, 2016.

CHAUHAN, H.; BAGYARAJ, D. J.; SHARMA, A. Plant growth-promoting bacterial endophytes from sugarcane and their potential in promoting growth of the host under field conditions. **Experimental Agriculture**, v. 49, n. 1, p. 43-52, 2013.

COIMBRA, J. L.; CAMPOS, V. P. Efeito de exsudatos de colônias e de filtrados de culturas de actinomicetos na eclosão, motilidade e mortalidade de juvenis do segundo estágio de *M. javanica*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, p. 232-238, 2005.

CONCEIÇÃO, P. M. da et al. Efeito dos ácidos húmicos na inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em sementes de milho. **Ciência Rural**, v. 39, n. 6, p. 1880-1883, 2009.

DA SILVA, R. B.; VALICENTE, F. H. Molecular characterization of *Bacillus thuringiensis* using REP-PCR. **SpringerPlus**, v. 2, n. 1, p. 641, 2013.

DE LEY, P.; BLAXTER, M. L. Systematic position and phylogeny. In: Lee DL, editor. **The biology of nematodes**. London: Taylor & Francis. p 1–30, 2002.

ENGELKIRK, P. G.; ENGELKIRK, J. D. **Burton, microbiologia para as ciências da saúde**. Grupo Gen-Guanabara Koogan, 2012.

FERRÃO, R. G. et al. **Café conilon**. 2.ed. atual e ampl. Vitória, ES: INCAPER, p. 784, 2017.

FRAGOSO, R. R. et al. Interação molecular planta-nematóide. **Embrapa Cerrados-Documentos (INFOTECA-E)**, 2007.

FREITAS, L. G.; OLIVEIRA, R. D. de L.; FERRAZ, S. Introdução à nematologia: ciências agrárias. **Viçosa: UFV**, 84p. (Caderno Didático, 58), 2006.

GAO, J. et al. Genetic diversity of rhizobia isolated from *Astragalus adsurgens* growing in different geographical regions of China. **Journal of Biotechnology**, v. 91, n. 2-3, p. 155-168, 2001.

GILSON, E. et al. A family of dispersed repetitive extragenic palindromic DNA sequences in *E. coli*. **The EMBO journal**, v. 3, n. 6, p. 1417-1421, 1984.

HARE, J. M. Sabouraud agar for fungal growth. In: **Laboratory Protocols in Fungal Biology**. Springer, New York, NY, p. 211-216, 2013

HERAS, J. et al. GelJ—a tool for analyzing DNA fingerprint gel images. **BMC bioinformatics**, v. 16, n. 1, p. 270, 2015.

HIGGINS, C. F. et al. A novel intercistronic regulatory element of prokaryotic operons. **Nature**, v. 298, n. 5876, p. 760-762, 1982.

HORWITZ, W. et al. **Official methods of analysis of AOAC International. Volume I, agricultural chemicals, contaminants, drugs/edited by William Horwitz**. Gaithersburg (Maryland): AOAC International, 1997, 2010.

HUNGRIA, M.; SILVA, K. da. Manual de curadores de germoplasma-microorganismos: rizóbios e bactérias promotoras do crescimento vegetal. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Documentos (INFOTECA-E)**, 2011.

JONES, J. G. et al. Evaluation of nematicides for southern root-knot nematode management in lima bean. **Crop protection**, v. 96, p. 151-157, 2017.

KING, E. O.; WARD, M. K.; RANEY, D. E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. **The Journal of laboratory and clinical medicine**, v. 44, n. 2, p. 301-307, 1954.

KUMAR, A.; KUMAR, A.; PRATUSH, A. Molecular diversity and functional variability of environmental isolates of *Bacillus* species. **SpringerPlus**, v. 3, n. 1, p. 312, 2014.

LIMA, A. S. G., et al. Identification of new isolates of *Bacillus thuringiensis* using rep-PCR products and delta-endotoxin electron microscopy. **Genetics and molecular biology**, v.25, n.2, p.: 225-229, 2002.

MAGRINI, F. E. et al. Características químicas e avaliação microbiológica de diferentes fases de maturação do biofertilizante Bokashi. **Agrarian**, v. 4, n. 12, p. 146-151, 2011.

MARIANO, R. L. R.; SOUZA, E. B. de. Manual de Práticas em Fitobacteriologia. 3º ed. **Recife: Editora da Universidade Federal Rural de Pernambuco**, p. 51-55, 2016.

MARTIN, B. et al. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. **Nucleic acids research**, v. 20, n. 13, p. 3479-3483, 1992.

MENNA, P. et al. Rep-PCR of tropical rhizobia for strain fingerprinting, biodiversity appraisal and as a taxonomic and phylogenetic tool. **Symbiosis**, v. 48, n. 1-3, p. 120-130, 2009.

NARAYAN, A. et al. An efficient and cost-effective method for DNA extraction from athalassohaline soil using a newly formulated cell extraction buffer. **3 Biotech**, v. 6, n. 1, p. 62, 2016.

NGAMAU, C. N. et al. Isolation and identification of endophytic bacteria of bananas (*Musa* spp.) in Kenya and their potential as biofertilizers for sustainable banana production. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n. 34, p. 6414-6422, 2012.

NICOL, J. M. et al. Current nematode threats to world agriculture. In: JONES, J.; CHEYSEN, G.; FENOLL, C. (Ed.), **Genomics and molecular genetics of Plant-Nematode Interactions**. Springer, p. 21-43, 2011.

OLIVE, D. M.; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **Journal of clinical microbiology**, v. 37, n. 6, p. 1661-1669, 1999.

PLATT, H. M. The phylogenetic systematics of free-living nematodes. **The Ray Society**, London, v. 383, 1999.

RADEMAKER, J. L. W.; DE BRUIJIN, F. J. Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer assisted patterns analysis. **In:** Caetano-Anollés G, Gresshoff, PM (eds) *DNA Markes: Protocols, Applications and Overviews*. Willey, New York, pp 151–171, 1997.

RIBEIRO, C. M.; CARDOSO, E. J. B. N. Isolation, selection and characterization of root-associated growth promoting bacteria in Brazil Pine (*Araucaria angustifolia*). **Microbiological Research**, v. 167, n. 2, p. 69-78, 2012.

SALAS-MARINA, M. A. et al. The plant growth-promoting fungus *Aspergillus ustus* promotes growth and induces resistance against different lifestyle pathogens in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 7, p. 686-96, 2011.

SCHMIDELL, W. et al. **Biotechnologia industrial-vol. 2: engenharia bioquímica**. Editora Blucher, 2001.

SCIENTIFIC, Thermo Fisher. NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer V1. 0 User Manual. **Wilmington**, DE, 2009.

SHANGKUAN, Y.-H., et al. Molecular characterization of *Bacillus anthracis* using multiplex PCR, ERIC-PCR and RAPD. **Letters in applied microbiology**, v. 32, n. 3, p.: 139-145, 2001.

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.

SHARPLES, G. J.; LLOYD, R. G. A novel repeated DNA sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosomes. **Nucleic acids research**, v.18, n. 22, p.: 6503-6508, 1990.

SINGH, Mahendra et al. Role of biofertilizers in conservation agriculture. **Conservation Agriculture**. Springer, Singapore, p.113-134, 2016.

SINGH, S. K.; HODDA, M.; ASH, G. J. Plant-parasitic nematodes of potential phytosanitary importance, their main hosts and reported yield losses. **Eppo Bulletin**, v. 43, n. 2, p. 334-374, 2013.

SOUSA, C. P. Segurança alimentar e doenças veiculadas por alimentos: utilização do grupo coliforme como um dos indicadores de qualidade de alimentos. **Revista APS**, v. 9, n. 1, p. 83-88, 2006.

STANIER, R. Y.; PALLERONI, N. J; DOUDOROFF, M. The aerobic pseudomonads a taxonomic study. **Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 159-271, 1966.

VENZON, M.; PAULA JÚNIOR, T. J.; PALLINI, A. Controle alternativo de pragas e doenças. **Viçosa: UFV**, 2005.

VERSALOVIC, J., et al. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in molecular and cellular biology**, v. 5, n. 1, p. 25-40, 1994.

VERSALOVIC, J., et al. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic acids research**, v. 19, n.24, p. 6823-6831, 1991.

VIOLATTI, M. R.; TEBALDI, N. D. Detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* em sementes de soja. **Summa Phytopathologica**, v. 42, n. 3, p. 268-270, 2016.

ZAGO, V. C. P. *Pseudomonas* spp. **fluorescentes-bactérias promotoras de crescimento de plantas e biocontroladoras de fitopatógenos em sistemas de produção agrícola**. Embrapa Agrobiologia, 2000.

CAPÍTULO II: EFICIÊNCIA DE BIOFERTILIZANTES E NEMATICIDAS QUÍMICOS NO MANEJO DE *Meloidogyne exigua* EM CAFEIEIRO ARÁBICA.

RESUMO

Os fitonematoides são responsáveis por 45% das perdas na cultura cafeeira, sendo que 75% dessas perdas são ocasionadas pelo nematoide das galhas *Meloidogyne* Goeldi. Entre as espécies, o *M. exigua* ganha destaque por sua ampla distribuição nas regiões produtoras de café arábica. Devido à complexidade do manejo em campo e à alta toxicidade de produtos químicos que visam seu manejo, tem-se pesquisado técnicas alternativas para a redução populacional desse patógeno no campo. Com base no exposto, objetivou-se no presente estudo avaliar o efeito isolado e combinado de diferentes nematicidas químicos e biofertilizantes no manejo de *M. exigua* em lavoura comercial de café arábica na região de Iúna, sul do Espírito Santo. O experimento foi conduzido em delineamento de blocos casualizados no esquema fatorial 9 x 2, em que foram estudados os efeitos de nove produtos: (T1- Testemunha (controle negativo); T2- Rugby (15 L/ha) (Controle positivo); T3- Nimitz (1,0 L/ha); T4- Vitaflex (10 L/ha); T5- Maxfert (20 L/ha); T6- Vitaflex 10 L/ha + Nimitz (1,0 L/ha); T7- Maxfert 20 L/ha + Nimitz 1,0 L/ha; T8- Vitaflex 10 L/ha + Maxfert 20 L/ha e T9- Vitaflex 10 L/ha + Maxfert 20 L/ha + Nimitz 1,0 L/ha); em duas épocas de avaliação: antes da aplicação dos produtos (população inicial) e 45 dias após a aplicação dos produtos (45 DAA). As amostras foram acondicionadas e levadas para o Laboratório de Nematologia (NEMATUFES) para processamento, extração e quantificação juvenis de *M. exigua*. A aplicação isolada do Nimitz, Vitaflex e Maxfert apresentou maior redução do nematoide na raiz, enquanto a aplicação isolada de Maxfert e a combinação entre Vitaflex + Maxfert promoveram maior redução do nematoide no solo. A combinação entre Vitaflex + Nimitz e Maxfert + Nimitz também apresentou resultados satisfatórios quando comparados com a testemunha, o que permitiu constatar a possibilidade do uso combinado entre nematicidas sintéticos e biofertilizantes para o manejo *M. exigua*.

Palavras chave: Nematóide das galhas, *Coffea arabica*, Controle biológico, Controle químico.

ABSTRACT

Phytophagous nematodes are responsible for 45% of the losses in the coffee crop, and 75% of these losses are caused by the *Meloidogyne* Goeldi gall nematode. Among the species, *M. exigua* stands out for its wide distribution in the Arabica coffee producing regions. Due to the complexity of handling in the field and the high toxicity of chemicals aimed at its management, alternative techniques have been investigated to reduce the population of this pathogen in the field. Based on the above, the objective of the present study was to evaluate the isolated and combined effect of different chemical nematicides and biofertilizers in the management of *M. exigua* in commercial Arabica coffee plantations in the region of Iúna, southern Espírito Santo. The experiment was conducted in a randomized block design in a 9 x 2 factorial scheme, in which the effects of nine products were studied: (T1- Witness (negative control); T2- Rugby (15 L / ha) (positive control); T3 - Nimitz (1.0 L / ha); T4- Vitaflex (10 L / ha); T5- Maxfert (20 L / ha); T6- Vitaflex 10 L / ha + Nimitz (1.0 L / ha); T7 - Maxfert 20 L / ha + Nimitz 1.0 L / ha; T8- Vitaflex 10 L / ha + Maxfert 20 L / ha and T9- Vitaflex 10 L / ha + Maxfert 20 L / ha + Nimitz 1.0 L / ha); in two evaluation periods: before the application of the products (initial population) and 45 days after the application of the products (45 DAA). The samples were packaged and taken to the Nematology Laboratory (NEMATUFES) for processing, extraction and quantification of *M. exigua* juveniles. The isolated application of Nimitz, Vitaflex and Maxfert showed a greater reduction of the root nematode, while the isolated application of Maxfert and the combination of Vitaflex + Maxfert promoted a greater reduction of the nematode in the soil. The combination of Vitaflex + Nimitz and Maxfert + Nimitz also presented satisfactory results when compared with the control, which allowed to verify the possibility of the combined use between synthetic nematicides and biofertilizers for the management of *M. exigua*.

Key words: Root-Knot Nematode, *Coffea arabica*, Biological control, Chemical control.

1 INTRODUÇÃO

O café é um dos principais produtos dentro do cenário agrícola brasileiro. O estado do Espírito Santo ocupa o segundo lugar em produção, sendo responsável por 22,06% da produção nacional e também o terceiro maior produtor de café arábica no país (CONAB, 2019). A cultura do cafeeiro arábica gera em torno de 150 mil empregos diretos e indiretos, sendo a principal fonte de renda de 80% das propriedades rurais capixabas localizadas em terras frias e montanhosas, sendo o município de Iúna um dos maiores produtores do estado (INCAPER, 2018).

Os fitonematoides estão entre os principais problemas fitossanitários que acometem a cultura do cafeeiro (CONTARATO et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2016), o que se deve principalmente ao seu difícil controle e diagnose imprecisa, pois os sintomas indiretos são, muitas vezes, associados a deficiências nutricionais pelos agricultores (KIMANI et al., 2002).

As perdas ocasionadas ao cafeeiro por fitonematoides chegam a 45%, destas, 75% são ocasionadas por fitonematoides do gênero *Meloidogyne* Goeldi, também conhecido como nematoide das galhas. Entre as espécies desse gênero, *M. exigua* representa um sério problema para a cafeicultura, pois contribui como fator limitante para a obtenção de alta qualidade para o cafeeiro arábica (BARBOSA et al., 2004).

O uso de nematicidas sintéticos é uma das táticas de manejo mais empregadas para a redução populacional de *Meloidogyne* spp, por apresentar resultados rápidos (DONG; ZHANG, 2006; KEARN et al., 2014).

A maioria dos nematicidas presentes no mercado inibe a acetilcolinesterase, promovendo a paralisia dos nematoides e levando-os à morte por inanição. Entretanto, esses produtos são considerados altamente tóxicos para humanos e para o meio ambiente, sendo que a maioria deles não tem especificidade em sua toxicidade (JONES et al., 2017). Por essa razão, muitos nematicidas foram proibidos de serem comercializados no Brasil (HUSAIN et al., 2010).

Com o propósito de disponibilizar aos agricultores produtos químicos efetivos para o manejo de fitonematoides, novos ingredientes ativos com ação nematicida e baixa toxicidade vêm sendo desenvolvidos. O Fluensulfone ou MCW-2 (5-cloro-2- (3,4,4-

trifluorobut-3-f enilsulfonil) -1,3-tiazole), membro do grupo Tioéster Fluoroalquilo, é um exemplo desses produtos que possui baixa toxicidade a organismos não-alvo (OKA et al., 2009; KEARN et al., 2014).

Outra possibilidade racional e sustentável para o manejo de fitonematoides é o controle biológico, que vem ganhando destaque por promover um menor impacto ambiental e reduzindo o uso de nematicidas nas plantações de café (TOLARDO et al., 2019). Nesse controle biológico, as rizobactérias estão entre os principais microrganismos utilizados para o manejo de *Meloidogyne* spp. (VAZ et al., 2011; ARAÚJO et al., 2012), uma vez que liberam endotoxinas que interferem negativamente no ciclo reprodutivo dos fitonematoides, principalmente na ovoposição e eclosão de juvenis, além de auxiliar no crescimento das plantas pela produção de fitormônios e compostos orgânicos voláteis (COVs) (RAMAMOORTHY, 2001; SALAS-MARINA et al., 2011; CASARRUBIA et al., 2016).

As rizobactérias estão presentes naturalmente nos solos. Entretanto, a adição de matéria orgânica ao solo pode influenciar positivamente sua população, o que potencializa o controle biológico. Essas bactérias podem também ser introduzidas em áreas agrícolas pela aplicação/uso de produtos biológicos (VENZON et al., 2005).

Além de nematicidas de baixa toxicidade e das rizobactérias, os biofertilizantes surgiram há alguns anos como uma nova possibilidade para tornar o manejo de fitonematoides mais efetivo no campo. Esses biofertilizantes são compostos bioativos formados a partir do processo de fermentação microbiológica de compostos orgânicos de origem animal e/ou vegetal. Ao serem aplicados no campo, os biofertilizantes atuam positivamente no crescimento vegetativo e no manejo de patógenos (SINGH et al., 2016).

O Vitaflex e o Maxfert são produtos de uso agrícola registrados no Brasil como biofertilizantes. Eles são bioestimulantes orgânicos provenientes do processo de fermentação natural de melão de cana e, recentemente, foi descoberto que possuem ação nematicida e, por isso, vêm sendo utilizados para o manejo de nematoides de plantas (AGRO HUMUS, 2019).

O manejo integrado de fitonematoides consiste na utilização conjunta de medidas para a redução populacional de fitonematoides. Nesse sentido, deve-se considerar a inclusão de

novos ingredientes ativos, como o Fluensulfone, que possui baixa toxicidade para organismos não-alvo e sua possível associação sinérgica com biofertilizantes como Maxfert e Vitaflex, podendo-se assim, com essa combinação de medidas de manejo, promover uma otimização do manejo de *M. exigua* em lavouras infestadas.

Objetivou-se no presente estudo avaliar o efeito isolado e da combinação de diferentes nematicidas químicos e biofertilizantes no manejo de *M. exigua* em lavoura comercial de café arábica na região de Iúna, sul do Espírito Santo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em uma lavoura comercial de cafeeiro arábica cv. Catuai 44 com 23 anos de idade cultivada em espaçamento 3,0 x 1,5, localizada em Córrego Bonsucesso no município de Iúna-ES, latitude 20°17'38.2"Sul, longitude 41°30'02.9"Oeste e altitude de 435 m, com o solo classificado como Latossolo Vermelho-Amarelo distrófico de textura argilosa com ocorrência natural de *M. exigua*.

O experimento foi conduzido em delineamento de blocos casualizados no esquema fatorial 9 x 2, em que foram estudados os efeitos de nove produtos: (T1- Testemunha (controle negativo); T2- Rugby (15 L/ha) (Controle positivo); T3- Nimitz (1,0 L/ha); T4- Vitaflex (10 L/ha); T5- Maxfert (20 L/ha); T6- Vitaflex 10 L/ha + Nimitz (1,0 L/ha); T7- Maxfert 20 L/ha + Nimitz 1,0 L/ha; T8- Vitaflex 10 L/ha + Maxfert 20 L/ha e T9- Vitaflex 10 L/ha + Maxfert 20 L/ha + Nimitz 1,0 L/ha); em duas épocas de avaliação: antes da aplicação dos produtos (população inicial) e 45 dias após a aplicação dos produtos (45 DAA). O experimento constou de quatro blocos num total de 72 parcelas experimentais, cada uma constituída por oito plantas analisando as seis plantas centrais.

A aplicação dos produtos foi realizada utilizando um aplicador costal, com um volume de calda de 16 L/ha, aplicando-se a 50 cm da projeção da copa na parte de cima da linha de plantio aplicando um drench de 100 mL por planta em meia lua.

Antes da instalação do experimento, foi realizada a coleta de solo e raízes para a quantificação da população inicial de *M. exigua* presente na área. Posteriormente, 45 dias após a aplicação dos produtos foram retiradas amostras de solo e raiz de 0 cm a 30 cm de profundidade na região da rizosfera, totalizando 1kg de solo e 100g de raiz de

cada planta. Essas amostras foram identificadas e acondicionadas em sacos plásticos e levadas para o Laboratório de Nematologia (NEMATUFES) para processamento, extração e quantificação juvenis de *M. exigua*.

A extração de nematoides do solo foi feita segundo metodologia de Jenkins (1964) e das raízes pela técnica de Hussey e Barker (1973) modificada por Bonetti e Ferraz (1981).

A análise estatística dos dados foi feita com o uso do pacote ExpDes.pt (FERREIRA; CAVALCANTI; NOGUEIRA, 2013) do software R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2019), sendo as estimativas das variâncias comparadas pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2017). Constatando-se que as variâncias dos tratamentos não foram homogêneas, procedeu-se à transformação nos dados utilizando-se a transformação $\sqrt{x - 1}$, que possibilitou uma homogeneização das variâncias dos tratamentos. A comparação das médias entre os tratamentos deu-se pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade e os resultados apresentados em tabela.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 2, estão expostos os valores médios referentes ao efeito dos tratamentos isolados ou combinados no número total de nematoides presentes em 10 g de raiz ou em 100 g de solo, antes da aplicação dos produtos (População inicial) e 45 dias após a aplicação dos produtos (DAA) em condições de campo, assim como a comparação entre os tratamentos.

Tabela 2. Efeito de nematicidas químicos (Rugby e Fluensulfone 40EC) e biofertilizantes (Vitaflex e Maxfert) aplicados isoladamente ou em associação sobre a população de *M. exigua* parasitando o cafeeiro cv. Catuaí 44 no município de Iúna, ES.

(Continua)

| Tratamentos (*) | N° Total de nematóides/ 10g de raiz | | | N° Total de nematóides/ 100g de solo | | |
|--------------------|-------------------------------------|------------|----------------|--------------------------------------|------------|----------------|
| | População Inicial(**) | 45 DAA(**) | Redução (%) | População Inicial(**) | 45 DAA(**) | Redução (%) |
| T1 | 42,29bA | 42,36aA | - | 13,52aA | 12,22aA | - |
| T2 | 32,51cA | 22,02cB | 32,27 | 11,59bA | 7,20bB | 37,88 |

Tabela 3. Efeito de nematicidas químicos (Rugby e Fluensulfone 40EC) e biofertilizantes (Vitaflex e Maxfert) aplicados isoladamente ou em associação sobre a população de *M. exigua* parasitando o cafeeiro cv. Catuaí 44 no município de Iúna, ES.

(Conclusão)

| Tratamentos (*) | N° Total de nematóides/ 10g de raiz | | | N° Total de nematóides/ 100g de solo | | |
|--------------------|-------------------------------------|------------|----------------|--------------------------------------|------------|----------------|
| | População Inicial(**) | 45 DAA(**) | Redução (%) | População Inicial(**) | 45 DAA(**) | Redução (%) |
| T3 | 58,66aA | 26,80bB | 54,31 | 14,46aA | 10,97aB | 24,14 |
| T4 | 41,05bA | 20,66cB | 49,67 | 14,50aA | 9,28bB | 36,00 |
| T5 | 36,68cA | 18,91cB | 48,45 | 16,55aA | 9,19bB | 44,47 |
| T6 | 38,27bA | 25,17bB | 34,23 | 12,02bA | 9,68bB | 19,47 |
| T7 | 33,40cA | 25,88bB | 22,51 | 11,24bA | 9,53bA | 15,21 |
| T8 | 24,63dA | 19,66cA | 20,18 | 14,00aA | 7,73bB | 44,79 |
| T9 | 19,78dA | 15,40dA | 22,14 | 8,26cA | 9,01bA | - |

Legenda: Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, minúscula na coluna (comparação entre tratamentos) e maiúscula na linha (comparação entre os dias de coleta) pelo teste de Scott-Knott ($p > 0,05$);

(*) T1- Testemunha (controle negativo); T2- Rugby (15 L/ha) (Controle positivo); T3- Nimitz (1,0 L/ha); T4- Vitaflex (10 L/ha); T5- Maxfert (20 L/ha); T6- Vitaflex 10 L/ha + Nimitz 1,0 L/ha; T7- Maxfert 20 L/ha + Nimitz 1,0 L/ha; T8- Vitaflex 10 L/ha + Maxfert 20 L/ha e T9- Vitaflex 10 L/ha + Maxfert 20 L/ha + Nimitz 1,0 L/ha.

(**) Valores originais transformados em $\sqrt{x - 1}$

Quando os dados do nível populacional dos tratamentos foram comparados entre si aos 45 DAA, percebe-se que todos reduziram a população de *M. exigua* tanto no sistema radicular quanto no solo (Tabela 2).

Para o número de nematoides nas raízes, os tratamentos que mais reduziram foram o Nimitz (T3) (54,31%) seguido do Vitaflex (T4) (49,67%) e do Maxfert (T5) (48,45%). Já para a redução do número de nematoides do solo os melhores tratamentos foram o Vitaflex + Maxfert (T8) (44,79%) e o Maxfert (T5) (44,47%) (Tabela 3).

Os tratamentos menos efetivos para a redução de nematoides nas raízes foram o Vitaflex + Maxfert (T8) (20,18%), o Vitaflex + Maxfert + Nimitz (T9) (22,14%) e o Maxfert + Nimitz (T7) (22,51%). No solo, os tratamentos menos efetivos foram o Maxfert + Nimitz (T7) (15,21%) e o Vitaflex + Nimitz (T6) (19,47%) (Tabela 3).

Porém quando se compara a população dos nematoides nas raízes na avaliação aos 45 DAA em relação à população inicial, percebe-se que somente o Vitaflex + Maxfert (T8) e o Vitaflex + Maxfert + Nimitz (T9) não foram efetivos na redução populacional de *M. exigua*. Para a avaliação no solo, os tratamentos que não apresentaram efeito foram o Maxfert + Nimitz (T7) e o Vitaflex + Maxfert + Nimitz (T9) (Tabela 3).

O uso dos nematicidas Rugby (T2) e Nimitz (T3) apresentou redução na população de *M. exigua* 45 DAA (Tabela 2). Sendo que o Rugby proporcionou uma redução de 32,27% para o sistema radicular e 37,88% para o solo enquanto o Nimitz obteve uma redução de 54,31% no sistema radicular e 24,14% para o solo (Tabela 2). Segundo Cortes et al. (2014), os nematicidas Rugby e Nimitz comportaram-se de maneira semelhante e efetiva na redução da reprodução do nematoide, conforme foi observado no presente estudo.

O Vitaflex e o Maxfert 45 DAA apresentaram resultados semelhantes ao Rugby, que é um dos nematicidas recomendados para o controle de fitonematoides para a cultura do café. O uso de biofertilizantes para o manejo de fitonematoides vem sendo estudado nos últimos anos, o que pode ser explicado pelos elevados riscos à saúde humana e ao ambiente causado pelos nematicidas comerciais e pela busca por produtos que promovam menor impacto ambiental (RODRIGUES et al., 2016; JONES et al., 2017).

Alguns autores afirmam que o uso de biofertilizantes pode reduzir de forma significativa o número de nematoides no solo e nos sistema radicular, diminuído também o número de galhas, massas de ovos e de fêmeas (MAHGOOB e EL-TAYEB, 2010; EL-SHENNAWY et al., 2012; YOUSSEF e EISSA, 2014; YOUSSEF et al., 2015; YOUSSEF e LASHEIN, 2015; JIANG et al., 2018).

O sucesso para o manejo de fitonematoides por meio de biofertilizantes está relacionado aos metabolitos produzidos por bactérias, como compostos voláteis, ácidos graxos, sulfeto de hidrogênio, enzimas, hormônios, álcool e compostos fenólicos. Tais produtos podem ser tóxicos para os nematoides ou podem suprimir indiretamente a população de nematoides por meio da modificação da rizosfera (YOUSSEF e EISSA, 2014).

A aplicação de Vitaflex + Maxfert (T8) não apresentou diferenças estatística quando comparado com as suas aplicações isoladamente (T4 e T5, respectivamente), assim como ao controle positivo (T2).

A associação desses diferentes biofertilizante (T8) implicou em reduções no número de *M. exigua* de 20,18% e 44,79% nas raízes e no solo, respectivamente (Tabela 3). Segundo Youssef et al. (2015), a associação entre diferentes microrganismos promove uma alteração na rizosfera por meio da co-toxidade, o que resulta na redução no número de fitonematoides. Possivelmente, pode ter havido uma interação sinérgica entre o Vitaflex e o Maxfert em relação à redução no número de *M. exigua* presentes no solo 45 DAA. Uma vez que, com base nos resultados obtidos no primeiro capítulo, os dois biofertilizantes possuem em sua composição grupos de bactérias semelhantes que podem atuar de diferentes formas nas interações multitróficas entre o hospedeiro-patógeno-antagonista.

O processo de colonização das raízes das plantas hospedeiras por rizobactérias ocorre por meio de múltiplas etapas que envolvem genes e metabólitos das bactérias (GARCIA et al., 2015). Entre esses metabólitos estão agentes antimicrobianos que atuam no controle biológico, o que pode explicar a redução de *M. exigua* em café arábica na presente pesquisa.

As combinações Vitaflex + Nimitz (T6) reduziram a população de *M. exigua* nas raízes e solo em 34,23% e 19,47%, respectivamente, e Maxfert + Nimitz (T7) em 22,15% e 15,21%, respectivamente, quando comparado à testemunha.

A associação entre controle químico e biológico é reportada na bibliografia. Segundo Gowen e Tzortzakakis (1994) alguns organismos antagonistas a fitonematoides não são afetados por nematicidas como Aldicarb, Carbofuran, Mirol, Forate, Oxamyl, sendo possível viabilizar o uso combinado entre controle químico e biológico. A eficiência do uso combinado de produtos biológicos e químicos, em alguns casos, deve-se ao fato de que alguns nematicidas possuem efeito nematostático paralisando os fitonematoides e expondo-os a antagonistas, fazendo com que esses agentes biocontroladores de nematoides aumentem suas eficiências (SIDDIQUI & MAHMOOD, 1999).

É importante lembrar que apenas uma avaliação (45 dias) após a aplicação dos produtos não é suficiente para validação da pesquisa. Por esse motivo, é importante ressaltar que o trabalho continua sendo desenvolvido no campo, novas coletas já foram feitas e já estão sendo processadas, e pelo menos duas colheitas serão acrescentadas à essa pesquisa.

4. CONCLUSÃO

A aplicação isolada e combinada de nematicidas químicos e biofertilizantes foram eficientes na redução populacional de *M. exigua* em lavoura comercial de café arábica 45 DAA. A aplicação isolada do Nimitz, Vitaflex e Maxfert apresentou maior redução do nematoide na raiz, enquanto a aplicação isolada de Maxfert e a combinação entre Vitaflex + Maxfert promoveram maior redução do nematoide no solo.

O uso dos nematicidas Rugby e Nimitz reduziu a população de *M. exigua* 45 DAA uma vez que ambos se comportam de maneira semelhante e efetiva na redução de nematoides.

Os biofertilizantes Vitaflex e Maxfert aplicados isolados ou combinados reduziram a população de *M. exigua*, sendo uma nova opção para o manejo em cafeeiro arábica.

A combinação entre biofertilizantes e nematicidas de baixa toxicidade promoveu reduções na população dos nematoides em cafeeiro arábica possibilitando em novas alternativas para o manejo de *M. exigua* em lavouras comerciais de cafeeiro arábica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRO HUMUS - AGRO HUMUS: Adubos Orgânicos. Disponível em: <<https://www.agrohumusorganicos.com/>>. Acesso em: 10 de dez. de 2019.

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

BARBOSA, D. H. S. G. et al. Field estimates of coffee yield losses and damage threshold by *Meloidogyne exigua*. **Nematologia Brasileira**, v. 28, n. 1, p. 49-54, 2004.

BONETTI, J. I. S.; 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.

CASARRUBIA, S. et al. Ecologically different fungi affect arabidopsis development: contribution of soluble and volatile compounds. **PloS one**, v. 11, n. 12, p. e0168236, 2016.

CONAB, COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira: café. **Monitoramento agrícola-Safra 2019**, v. 5, n. 2, 2019.

CONTARATO, C. C. et al. Reaction of cultivar coffee 'Vitoria INCAPER 8142' of conillon to parasitism of *Meloidogyne exigua*. **Idesia**, v. 32, n. 1, p. 93-97, 2014.

CORTE, G. D. et al. Eficiência do novo nematicida fluensulfone 480 EC (Nimitz™) no controle de *Meloidogyne exigua* em *Coffea arabica* L. **Anais... XXXII Congresso Brasileiro De Pesquisas Cafeeiras**, Serra Negra, São Paulo, p. 321, 2014.

DONG, L. Q.; ZHANG, K. Q. Microbial control of plant-parasitic nematodes: a five-party interaction. **Plant and Soil**, v. 288, p.31-45, 2006.

EL-SHENNAWY, M. Z. et al. Biological control of the disease complex on potato caused by root-knot nematode and Fusarium wilt fungus. 2012.

FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI, P. P.; NOGUEIRA, D. A. ExpDes.pt: Pacote Experimental Designs (Portuguese). R package version 1.2.0. 2018.

GARCIA, T. V.; KNAAK, N.; FIUZA, L. M. Bactérias endofíticas como agentes de controle biológico na orizicultura. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 82, 2015.

GIRI, R.; DUDEJA, S. S. Root colonization of root and nodule endophytic bacteria in legume and non legume plants grown in liquid medium. **Journal of Microbiology**, v. 1, n. 6, p. 75-82, 2013.

GOWEN, S. R.; TZORTZAKAKIS, E. Biological control of *Meloidogyne* spp. with *Pasteuria penetrans* 1. **EPP0 Bulletin**, v. 24, n. 2, p. 495-500, 1994.

HUSAIN, K.; ANSARI, R. A.; FERDER, L. Pharmacological agents in the prophylaxis/treatment of organophosphorous pesticide intoxication **Journal of Experimental Biology**. v. 48, p. 642-650, 2010.

HUSSEY, R. S; BARKER, K. R. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. **Plant Disease Reporter**, v. 57, p.1025-1028, 1973.

INCAPER. Cafeicultura – Café Arabica. {online}. Disponível em: <<https://incaper.es.gov.br/cafeicultura-arabica>>. Acesso em 10/08/2019.

JENKINS, W. R. A rapid centrifugal – flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Report**, v. 48, p. 692, 1964.

JIANG, C. H. et al. Evaluation of root-knot nematode disease control and plant growth promotion potential of biofertilizer Ning shield on *Trichosanthes kirilowii* in the field. **Brazilian journal of microbiology**, v. 49, n. 2, p. 232-239, 2018.

JONES, J. G. et al. Evaluation of nematicides for southern root-knot nematode management in lima bean. **Crop protection**, v. 96, p. 151-157, 2017.

KEARN, J. et al. Fluensulfone is a nematicide with a mode of action distinct from anticholinesterases and macrocyclic lactones. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 109, p. 44-57, 2014.

KIMANI, M.; LITTLE, T.; VOS, J. G. M. Introduction to coffee management through discovery learning. **CAB International. African Regional Centre, Nairobi, Kenya**, p. 2, 2002.

MAHGOOB, A. E. A.; EL-TAYEB, T. S. Biological Control of the Root-Knot Nematode, *Meloidogyne incognita* on Tomato Using Plant Growth Promoting Bacteria. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 20, n. 2, 2010.

OKA, Y.; SHUKER, S.; TKACHI, N. Nematicidal efficacy of MCW-2, a new nematicide of the fluoroalkenyl group, against the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. **Pest Management Science: formerly Pesticide Science**, v. 65, n. 10, p. 1082-1089, 2009.

OLIVEIRA, C.; M.; G.; de. et al. **Diagnose de fitonematoides**. Campinas, SP. Millennium Editora, 2016.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: A Language and Environment for Statistical Computing, v 55, p. 275–86. 2017.

RAMAMOORTHY, V. et al. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. **Crop Protection**, v.20, n.2, p.1-20, 2001.

RODRIGUES, L. L. et al. Management of *Meloidogyne javanica* with biological pesticides and oils in a lettuce field. **Nematoda**, v.3, p.01-09, 2016.

SALAS-MARINA, M. A. et al. The plant growth-promoting fungus *Aspergillus ustus* promotes growth and induces resistance against different lifestyle pathogens in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 7, p. 686-96, 2011.

SIDDIQUI, Z. A.; MAHMOOD, I. Role of bacteria in the management of plant parasitic nematodes: a review. **Bioresource technology**, v. 69, n. 2, p. 167-179, 1999.

SINGH, M. et al. Role of biofertilizers in conservation agriculture. In: **Conservation Agriculture**. Springer, Singapore, p.113-134, 2016.

TOLARDO, A. L. et al. Biological control: isolated and in mixtures and genetic control of *Meloidogyne exigua* in coffee. **Coffee Science**, Lavras, v. 14, n. 2, p. 147 - 156, 2019.

VAZ, M. V. et al. Controle biológico de *Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne incognita* com *Bacillus subtilis*. **Perquirere**, v. 8, p. 203-212, 2011.

VENZON, M.; PAULA JÚNIOR, T. J.; PALLINI, A. Controle alternativo de pragas e doenças. **Viçosa: UFV**, 2005.

YOUSSEF, M. M. A.; EISSA, M. F. M. Biofertilizers and their role in management of plant parasitic nematodes. A review. **Journal of Biotechnology and Pharmaceutical Research**, v. 5, n. 1, p. 1-6, 2014.

YOUSSEF, M. M. A.; EL-GHONAIMY, A.; M.; EL-NAGDI, W. M. A. Evaluation of some commercial bacterial biofertilizers and isolates against root knot nematode, *Meloidogyne incognita* infesting green bean, *Phaseolus vulgaris*. **Scientia Agriculturae**, v. 10, n. 1, p. 49-54, 2015.

YOUSSEF, M. M. A.; LASHEIN, A. M. S. Effect of some commercial biofertilizers and a biocide on root knot nematode, *Meloidogyne incognita* infesting date palm in a newly reclaimed soil in Egypt. **Middle East Journal of Applied Sciences**, v. 5, p. 143-147, 2015.

ANEXOS

Tabela 4. Caracterização morfológica de colônias isoladas de bactérias presentes nos biofertilizantes Vitaflex (V) e Maxfert (M) desenvolvidas em meio Kado.

(Continua)

| Grupos | Características Morfológicas | | | | | | | N° de Isolados | | | |
|--------|------------------------------|-------|----------|------------|--------|-----|-------|----------------|----------|---------|-------|
| | Tamanho | Forma | Elevação | Superfície | Brilho | Cor | Borda | King B | Vitaflex | Maxfert | Total |
| 1 | M | I | A | R | B | Br | O | - | 12 | 5 | 17 |
| 2 | G | C | A | R | B | C | O | - | 5 | 3 | 8 |
| 3 | P | I | A | L | B | T | L | - | 5 | 6 | 11 |
| 4 | M | C | E | CR | O | C | O | - | 2 | 4 | 6 |

Tabela 5. Caracterização morfológica de colônias isoladas de bactérias presentes nos biofertilizantes Vitaflex (V) e Maxfert (M) desenvolvidas em meio Kado.

(Continuação)

| Grupos | Características Morfológicas | | | | | | | N° de Isolados | | | |
|--------|------------------------------|-------|----------|------------|--------|-----|-------|----------------|----------|---------|-------|
| | Tamanho | Forma | Elevação | Superfície | Brilho | Cor | Borda | King B | Vitaflex | Maxfert | Total |
| 5 | M | C | E | R | B | CA | L | - | 1 | 2 | 3 |
| 6 | P | C | A | L | O | C | Li | - | 2 | 2 | 4 |
| 7 | G | I | A | R | O | Br | L | - | 0 | 1 | 1 |
| 8 | P | C | Cx | L | O | BC | Li | - | 12 | 3 | 15 |
| 9 | G | C | A | R | B | C | O | - | 0 | 1 | 1 |

Tabela 5. Caracterização morfológica de colônias isoladas de bactérias presentes nos biofertilizantes Vitaflex (V) e Maxfert (M) desenvolvidas em meio Kado.

(Continuação)

| Características Morfológicas | | | | | | | | N° de Isolados | | | |
|------------------------------|---------|-------|----------|------------|--------|-----|-------|----------------|----------|---------|-------|
| Grupos | Tamanho | Forma | Elevação | Superfície | Brilho | Cor | Borda | King B | Vitaflex | Maxfert | Total |
| 10 | M | C | Cx | L | B | CT | Li | - | 5 | 1 | 6 |
| 11 | M | C | E | L | B | C | F | - | 1 | 1 | 2 |
| 12 | P | C | Cx | L | O | A | Li | - | 8 | 4 | 12 |
| 13 | M | I | E | L | O | C | L | - | 2 | 1 | 3 |
| 14 | M | I | A | L | O | C | O | - | 2 | 1 | 3 |

Tabela 5. Caracterização morfológica de colônias isoladas de bactérias presentes nos biofertilizantes Vitaflex (V) e Maxfert (M) desenvolvidas em meio Kado.

(Continuação)

| Grupos | Características Morfológicas | | | | | | | N° de Isolados | | | |
|--------|------------------------------|-------|----------|------------|--------|-----|-------|----------------|----------|---------|-------|
| | Tamanho | Forma | Elevação | Superfície | Brilho | Cor | Borda | King B | Vitaflex | Maxfert | Total |
| 15 | G | C | E | L | B | Tr | Li | - | 1 | 1 | 2 |
| 16 | M | C | E | R | B | Br | O | - | 1 | 1 | 2 |
| 17 | G | I | Co | L | B | BT | Li | - | 1 | 0 | 1 |
| 18 | M | I | A | R | O | Br | L | - | 1 | 0 | 1 |
| 19 | P | I | A | R | O | BT | L | - | 1 | 0 | 1 |

Tabela 5. Caracterização morfológica de colônias isoladas de bactérias presentes nos biofertilizantes Vitaflex (V) e Maxfert (M) desenvolvidas em meio Kado.

(Continuação)

| Grupos | Características Morfológicas | | | | | | | | N° de Isolados | | |
|--------|------------------------------|-------|----------|------------|--------|-----|-------|--------|----------------|---------|-------|
| | Tamanho | Forma | Elevação | Superfície | Brilho | Cor | Borda | King B | Vitaflex | Maxfert | Total |
| 20 | M | I | Cr | R | O | Br | L | - | 3 | 0 | 3 |
| 21 | M | C | E | L | B | Tr | O | - | 2 | 0 | 2 |
| 22 | P | I | E | R | O | C | L | - | 2 | 0 | 2 |
| 23 | P | C | Co | L | O | T | Li | - | 1 | 0 | 1 |
| 24 | M | C | E | R | B | T | L | - | 2 | 0 | 2 |

Tabela 5. Caracterização morfológica de colônias isoladas de bactérias presentes nos biofertilizantes Vitaflex (V) e Maxfert (M) desenvolvidas em meio Kado.

(Continuação)

| Grupos | Características Morfológicas | | | | | | | N° de Isolados | | | |
|--------|------------------------------|-------|----------|------------|--------|-----|-------|----------------|----------|---------|-------|
| | Tamanho | Forma | Elevação | Superfície | Brilho | Cor | Borda | King B | Vitaflex | Maxfert | Total |
| 25 | M | C | A | L | O | C | L | - | 2 | 0 | 2 |
| 26 | M | C | A | R | O | C | L | - | 1 | 0 | 1 |
| 27 | M | C | Cr | L | B | T | Li | - | 1 | 0 | 1 |
| 28 | G | C | A | L | O | C | Li | - | 1 | 0 | 1 |
| 29 | M | C | A | R | O | C | O | - | 9 | 0 | 9 |

Tabela 5. Caracterização morfológica de colônias isoladas de bactérias presentes nos biofertilizantes Vitaflex (V) e Maxfert (M) desenvolvidas em meio Kado.

(Continuação)

| Grupos | Características Morfológicas | | | | | | | N° de Isolados | | | |
|--------|------------------------------|-------|----------|------------|--------|-----|-------|----------------|----------|---------|-------|
| | Tamanho | Forma | Elevação | Superfície | Brilho | Cor | Borda | King B | Vitaflex | Maxfert | Total |
| 30 | M | C | A | R | O | Br | L | - | 2 | 0 | 2 |
| 31 | M | C | A | R | O | Br | O | - | 2 | 0 | 2 |
| 32 | M | C | E | R | O | C | O | - | 1 | 0 | 1 |
| 33 | M | C | E | L | B | C | Li | - | 4 | 2 | 6 |
| 34 | M | C | E | L | B | CT | Li | - | 7 | 3 | 10 |

Tabela 5. Caracterização morfológica de colônias isoladas de bactérias presentes nos biofertilizantes Vitaflex (V) e Maxfert (M) desenvolvidas em meio Kado.

(Continuação)

| Grupos | Características Morfológicas | | | | | | | | N° de Isolados | | |
|--------|------------------------------|-------|----------|------------|--------|-----|-------|--------|----------------|---------|-------|
| | Tamanho | Forma | Elevação | Superfície | Brilho | Cor | Borda | King B | Vitaflex | Maxfert | Total |
| 35 | M | I | A | R | O | BC | O | - | 1 | 0 | 1 |
| 36 | G | C | Cx | L | B | Br | Li | - | 10 | 2 | 12 |
| 37 | M | C | A | R | O | C | O | - | 7 | 0 | 7 |
| 38 | M | I | E | R | B | Br | L | - | 2 | 0 | 2 |
| 39 | M | C | A | R | O | C | L | - | 1 | 0 | 1 |

Tabela 5. Caracterização morfológica de colônias isoladas de bactérias presentes nos biofertilizantes Vitaflex (V) e Maxfert (M) desenvolvidas em meio Kado.

(Continuação)

| Grupos | Características Morfológicas | | | | | | | | N° de Isolados | | |
|--------|------------------------------|-------|----------|------------|--------|-----|-------|--------|----------------|---------|-------|
| | Tamanho | Forma | Elevação | Superfície | Brilho | Cor | Borda | King B | Vitaflex | Maxfert | Total |
| 40 | M | C | A | R | O | C | O | - | 1 | 0 | 1 |
| 41 | M | C | E | R | O | Br | O | - | 1 | 0 | 1 |
| 42 | M | I | E | R | B | C | L | - | 3 | 1 | 4 |
| 43 | M | C | A | R | O | C | O | - | 5 | 3 | 8 |
| 44 | G | C | E | L | O | C | L | - | 1 | 0 | 1 |

Tabela 5. Caracterização morfológica de colônias isoladas de bactérias presentes nos biofertilizantes Vitaflex (V) e Maxfert (M) desenvolvidas em meio Kado.

(Continuação)

| Grupos | Características Morfológicas | | | | | | | N° de Isolados | | | |
|--------|------------------------------|-------|----------|------------|--------|-----|-------|----------------|----------|---------|-------|
| | Tamanho | Forma | Elevação | Superfície | Brilho | Cor | Borda | King B | Vitaflex | Maxfert | Total |
| 45 | M | C | A | L | O | C | Li | - | 4 | 0 | 4 |
| 46 | M | C | E | L | B | C | Li | - | 2 | 0 | 2 |
| 47 | M | C | Cx | L | B | C | Li | - | 2 | 1 | 3 |
| 48 | P | C | A | L | O | C | O | - | 1 | 0 | 1 |
| 49 | P | C | Cx | L | B | C | O | - | 3 | 0 | 3 |

Tabela 5. Caracterização morfológica de colônias isoladas de bactérias presentes nos biofertilizantes Vitaflex (V) e Maxfert (M) desenvolvidas em meio Kado.

(Continuação)

| Grupos | Características Morfológicas | | | | | | | | N° de Isolados | | |
|--------|------------------------------|-------|----------|------------|--------|-----|-------|--------|----------------|---------|-------|
| | Tamanho | Forma | Elevação | Superfície | Brilho | Cor | Borda | King B | Vitaflex | Maxfert | Total |
| 50 | M | C | E | L | B | C | O | - | 3 | 3 | 6 |
| 51 | M | C | E | L | B | C | O | - | 2 | 0 | 2 |
| 52 | M | C | Cx | L | B | C | O | - | 3 | 0 | 3 |
| 53 | P | C | E | L | B | C | L | - | 1 | 0 | 1 |
| 54 | P | C | Cx | L | B | A | Li | - | 3 | 0 | 3 |

Tabela 5. Caracterização morfológica de colônias isoladas de bactérias presentes nos biofertilizantes Vitaflex (V) e Maxfert (M) desenvolvidas em meio Kado.

(Continuação)

| Grupos | Características Morfológicas | | | | | | | N° de Isolados | | | |
|--------|------------------------------|-------|----------|------------|--------|-----|-------|----------------|----------|---------|-------|
| | Tamanho | Forma | Elevação | Superfície | Brilho | Cor | Borda | King B | Vitaflex | Maxfert | Total |
| 55 | P | I | E | L | B | CT | L | - | 1 | 0 | 1 |
| 56 | M | C | E | L | B | C | L | - | 1 | 0 | 1 |
| 57 | G | C | Ce | R | B | CT | F | - | 1 | 0 | 1 |
| 58 | M | C | E | L | O | Br | L | - | 1 | 0 | 1 |

Tabela 6. Caracterização morfológica de colônias isoladas de bactérias presentes nos biofertilizantes Vitaflex (V) e Maxfert (M) desenvolvidas em meio Kado.

(Conclusão)

| Grupos | Características Morfológicas | | | | | | | N° de Isolados | | | |
|--------|------------------------------|-------|----------|------------|--------|-----|-------|----------------|----------|---------|-------|
| | Tamanho | Forma | Elevação | Superfície | Brilho | Cor | Borda | King B | Vitaflex | Maxfert | Total |
| 59 | P | C | Cx | L | B | CA | Li | - | 2 | 0 | 2 |
| 60 | P | C | E | L | O | C | Li | - | 1 | 0 | 1 |
| 61 | PP | C | Cx | L | B | Tr | O | - | 1 | 0 | 1 |

Legenda: **Tamanho:** M- Média; G- Grande; P- Pequena; PP- Puriforme. **Forma:** C- Circular; I- Irregular; **Elevação:** A- Achatada; E- Elevada; Cx- Convexa; Co- Côncava; Cr-Cateriforme; Ce- Centro Elevado. **Superfície:** R- Rugosa; L- Lisa; CR- Centro Lisa e Borda Rugosa. **Brilho:** B- Brillante; O- Opaca. **Cor:** Br- Branca; C- Creme; T- Translúcida; CA- Creme Amarelada; BC- Branco Creme; CT- Creme Translúcida; A- Amarela; Tr- Transparente; BT- Branca Translúcida. **Borda:** O- Ondulada; L- Lobada; Li- Lisa; F- Filamentosa.

Tabela 7. Concentração e pureza de Ácidos Nucléicos de representantes de grupos de isolados formados a partir da caracterização morfológica

(Continua)

| Grupos | Representante | Concentração de Ácidos Nucléicos (ng/μl) | 260/280 | 260/230 |
|---------------|----------------------|---|----------------|----------------|
| 1 | M1 | 178.1 | 1.89 | 2.11 |
| 2 | M2 | 176.6 | 1.89 | 2.08 |
| 3 | M3 | 311 | 1.98 | 2.32 |
| 4 | M4 | 712.2 | 1.96 | 1.86 |
| 5 | M5 | 446.7 | 1.92 | 2.22 |
| 6 | M6 | 115 | 1.91 | 2.14 |
| 7 | M7 | 422.1 | 1.88 | 1.95 |
| 8 | M8 | 178.6 | 1.89 | 1.87 |
| 9 | M9 | 102.5 | 1.91 | 1.95 |
| 10 | M10 | 203.9 | 1.88 | 1.92 |
| 11 | M11 | 321.4 | 1.91 | 2.24 |
| 12 | M12 | 1000.3 | 1.91 | 1.98 |

Tabela 8. Concentração e pureza de Ácidos Nucléicos de representantes de grupos de isolados formados a partir da caracterização morfológica

(Continuação)

| Grupos | Representante | Concentração de Ácidos Nucléicos (ng/μl) | 260/280 | 260/230 |
|---------------|----------------------|---|----------------|----------------|
| 13 | M13 | 222 | 1.88 | 1.96 |
| 14 | M14 | 246.6 | 1.89 | 2.12 |
| 15 | M15 | 242.1 | 1.89 | 1.71 |
| 16 | V1 | 162.2 | 1.84 | 2.56 |
| 17 | V2 | 245.7 | 1.96 | 1.3 |
| 18 | V3 | 146.2 | 1.27 | 2.92 |
| 19 | V4 | 51.4 | 1.9 | 5.29 |
| 20 | V5 | 123.8 | 1.86 | 2.57 |
| 21 | V6 | 256.1 | 1.86 | 1.76 |
| 22 | V7 | 69.2 | 1.88 | 1.96 |
| 23 | V8 | 269.2 | 1.49 | 1.02 |
| 24 | V9 | 223.8 | 1.86 | 1.9 |
| 25 | V10 | 84.3 | 1.82 | 1.89 |

Tabela 8. Concentração e pureza de Ácidos Nucléicos de representantes de grupos de isolados formados a partir da caracterização morfológica

(Continuação)

| Grupos | Representante | Concentração de Ácidos Nucléicos (ng/μl) | 260/280 | 260/230 |
|--------|---------------|---|---------|---------|
| 26 | V11 | 402.4 | 1.91 | 1.97 |
| 27 | V12 | 450.3 | 1.9 | 2.2 |
| 28 | V13 | 533 | 1.91 | 2.13 |
| 29 | V14 | 345.5 | 1.92 | 1.95 |
| 30 | V15 | 509 | 1.85 | 1.95 |
| 31 | V16 | 365.3 | 1.94 | 2.04 |
| 32 | V17 | 455 | 1.91 | 2.03 |
| 33 | V18 | 389.5 | 1.9 | 2.23 |
| 34 | V19 | 385.7 | 1.93 | 2.02 |
| 35 | V20 | 284.2 | 1.93 | 2.19 |
| 36 | V21 | 171.9 | 1.95 | 2.11 |
| 37 | V22 | 869.7 | 1.9 | 1.93 |
| 38 | V23 | 226.5 | 1.93 | 1.86 |

Tabela 8. Concentração e pureza de Ácidos Nucléicos de representantes de grupos de isolados formados a partir da caracterização morfológica

(Continuação)

| Grupos | Representante | Concentração de Ácidos Nucléicos (ng/μl) | 260/280 | 260/230 |
|---------------|----------------------|---|----------------|----------------|
| 39 | V24 | 759.4 | 1.91 | 2.01 |
| 40 | V25 | 1181.6 | 1.91 | 1.64 |
| 41 | V26 | 580.7 | 1.9 | 1.89 |
| 42 | V27 | 1004.5 | 1.85 | 1.51 |
| 43 | V28 | 1479.5 | 1.87 | 1.93 |
| 44 | V29 | 45.9 | 1.99 | 1.73 |
| 45 | V30 | 69.6 | 1.91 | 2.13 |
| 46 | V31 | 250.6 | 1.93 | 2.17 |
| 47 | V32 | 360.4 | 1.91 | 2.11 |
| 48 | V33 | 516.3 | 1.92 | 2.33 |
| 49 | V34 | 330.7 | 1.96 | 2.29 |
| 50 | V35 | 529.1 | 1.9 | 2.12 |

Tabela 9. Concentração e pureza de Ácidos Nucléicos de representantes de grupos de isolados formados a partir da caracterização morfológica

| Grupos | Representante | Concentração de Ácidos Nucléicos (ng/μl) | (Conclusão) | |
|--------|---------------|---|-------------|---------|
| | | | 260/280 | 260/230 |
| 51 | V36 | 327 | 1.97 | 2.42 |
| 52 | V37 | 76.3 | 1.95 | 2.19 |
| 53 | V38 | 169.5 | 2.03 | 2.46 |
| 54 | V39 | 306.9 | 1.94 | 1.56 |
| 55 | V40 | 364.5 | 1.92 | 2.31 |
| 56 | V41 | 151.4 | 1.91 | 2.03 |
| 57 | V42 | 53 | 1.95 | 1.25 |
| 58 | V43 | 92.9 | 1.86 | 1.15 |
| 59 | V44 | 524.7 | 1.97 | 1.43 |
| 60 | V45 | 93.1 | 1.86 | 0.8 |
| 61 | V46 | 24.9 | 1.9 | 1.93 |

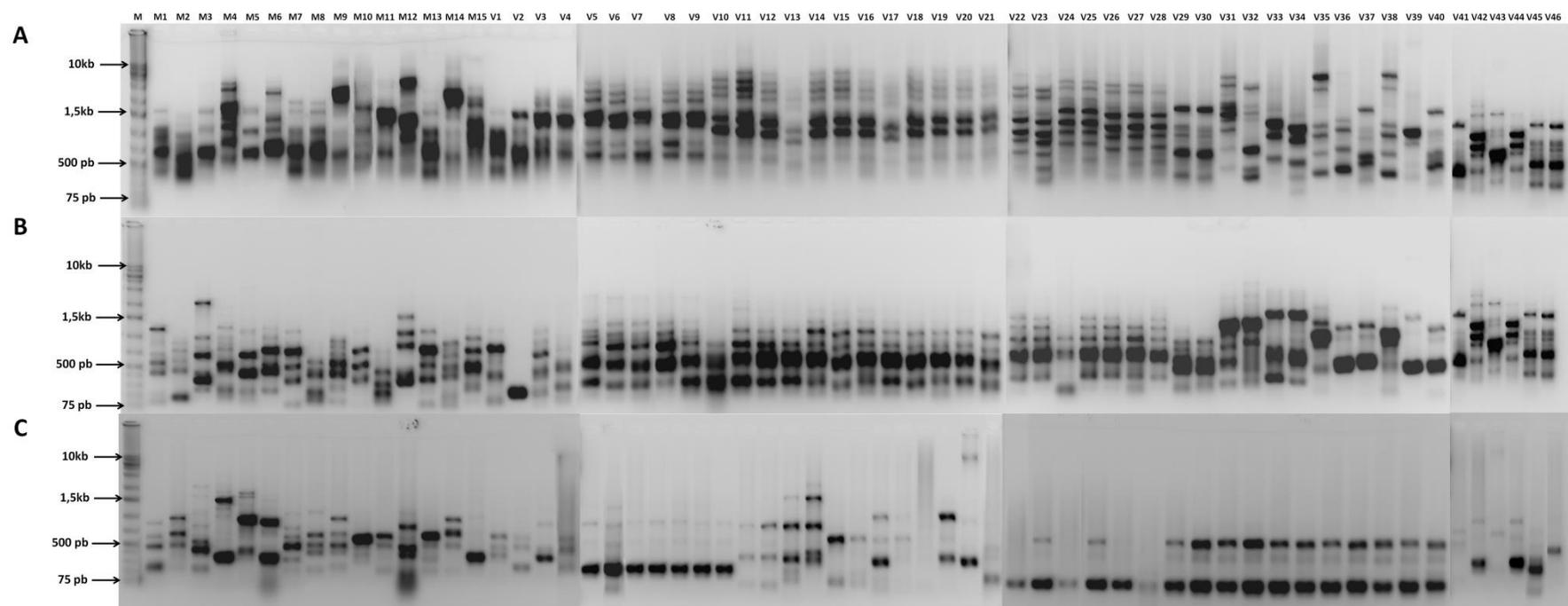


Figura 7. Rep-PCR de todos os representantes de isolados presentes no Vitaflex (V) e Maxfert (M). (A) BOX; (B) ERIC; (C) REP. A primeira canaleta com a letra M indica o Marcador 1 kb Plus DNA Ladder (Cellco Biotecnologia)