

**AURÉLIO CARNEIRO SOARES MOREIRA**

**MECANISMOS DE AÇÃO E EFICIÊNCIA DE *Bacillus amyloliquefaciens*  
CEPA BaNCT02 NO CONTROLE DE *Meloidogyne incognita***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Everaldo Antônio Lopes

Coorientadores: Liliane Evangelista Visôto  
Carlos Marcelo Silveira Soares

**RIO PARANAÍBA - MINAS GERAIS  
2023**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Rio Paranaíba**

T

M838m  
2023  
Moreira, Aurélio Carneiro Soares, 1995-  
Mecanismos de ação e eficiência de *Bacillus  
amyloliquefaciens* cepa BaNCT02 no controle de  
*Meloidogyne incognita* / Aurélio Carneiro Soares Moreira. –  
Rio Paranaíba, MG, 2023.  
63 f.: il. (algumas color.).

Orientador: Everaldo Antônio Lopes.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Viçosa, Fitopatologia, 2023.

Referências bibliográficas: f. 57-63.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvcrp.2023.002>

1. Controle biológico. 2. Fitonematoides. 3. Bactéria..  
I. Lopes, Everaldo Antônio, 1979-. II. Universidade Federal  
de Viçosa. Fitopatologia. Mestrado em Agronomia  
(Produção Vegetal). III. Título.


**AURÉLIO CARNEIRO SOARES MOREIRA**

**MECANISMOS DE AÇÃO E EFICIÊNCIA DE *Bacillus amyloliquefaciens*  
CEPA BaNCT02 NO CONTROLE DE *Meloidogyne incognita***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.


APROVADA: 30 de junho de 2023

Assentimento:

Documento assinado digitalmente  
 AURELIO CARNEIRO SOARES MOREIRA  
Data: 12/07/2023 09:50:40-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Aurélio Carneiro Soares Moreira  
Autor

Documento assinado digitalmente  
 EVERALDO ANTONIO LOPES  
Data: 12/07/2023 10:24:24-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Everaldo Antônio Lopes  
Orientador

*A Deus,  
À minha família,  
Aos meus amigos,  
Dedico.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus e minha família pelo apoio e compreensão durante todos estes anos de formação. Ao meu Pai e minha Mãe pela educação e ensinamentos da vida. E a meu irmão pelo companheirismo. Com muito carinho, agradeço.

Ao programa de Pós-Graduação em Agronomia (Produção Vegetal) da Universidade Federal de Viçosa – Campus Rio Paranaíba pela oportunidade de desenvolver esta dissertação e aos conhecimentos gerados.

A FAPEMIG e CNPq, o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Ao professor e orientador Everaldo Lopes pela oportunidade de desenvolver esta pesquisa, pelos ensinamentos, paciência e amizade que me proporcionaram crescimento profissional e pessoal.

Aos professores Liliane Visôto e Márcio Soares, pelos ensinamentos e apoio para desenvolver parte deste trabalho.

Ao Carlos Marcelo e Cícero pela confiança em mim depositada e por todos os ensinamentos transmitidos, grande parte do profissional que sou hoje devo a vocês.

A NOAA Brasil pela oportunidade, confiança, apoio nesse projeto e a toda equipe: Lucas, Mateus, Douglas, Guilherme T., Brenno, Saulo, Afonso, João, Victor, Luís, Richard, Thaigoru, Juliana, Carla, Maria Clara, Guilherme C., Laura, Jéssica, Arthur, César e Brunna, pelo companheirismo, pela ajuda mútua em diversos experimentos e pelos momentos de alegria que me proporcionaram.

Aos colegas de mestrado, Augusto, Mateus, Caroline, Martinho, Jader, Phelipe e Daniel, pelo companheirismo nos dias intermináveis no CIP, pelo aprendizado e momentos de descontração. Aos membros do Grupo de Pesquisa em Fitopatologia

Anton de Bary - UFV, Maria Luiza e Lara, pela ajuda nos experimentos no CIP. Deixo aqui meu obrigado pelos dois anos em que fiz parte desse grupo.

A EPAMIG e em especial ao Professor Maurício Coelho pela disponibilização da área para condução do experimento em campo.

Aos professores e pesquisadores Willian, Silvino, Márcio e Leticia do Laboratório de Nematologia, do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultra estrutural e da Central de Análises e Prospecção Química, ambos da UFLA, por todo o conhecimento compartilhado e apoio.

Enfim, a todos aqueles que de uma forma ou outra contribuíram para esse trabalho.  
Obrigado!

*“Tudo o que temos que decidir é o que fazer com o tempo  
que nos foi dado”*

**John R. R. Tolkien**

## RESUMO

MOREIRA, Aurélio Carneiro Soares, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2023. **Mecanismos de ação e eficiência de *Bacillus amyloliquefaciens* cepa BaNCT02 no controle de *Meloidogyne incognita*.** Orientador: Everaldo Antônio Lopes. Coorientadores: Liliane Evangelista Visôto e Carlos Marcelo Silveira Soares.

Em função da multiplicidade e especificidade nos quais espécies de *Bacillus* podem controlar fitonematoides, é importante estudar os eventuais mecanismos de ação de cada cepa, de modo a potencializar a sua aplicação e eficiência no campo. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi esclarecer os possíveis mecanismos de ação e eficiência de *Bacillus amyloliquefaciens* cepa BaNCT02 contra *Meloidogyne incognita*. No Capítulo I foi identificado mecanismos de ação da bactéria sobre *M. incognita*, entre eles: I) Formação de biofilme na rizosfera de soja; II) Produção de compostos orgânicos voláteis, com efeito de 71,0% na mortalidade de J<sub>2</sub> e 77,3% na inibição na eclosão de J<sub>2</sub>, entre eles o 2-undecanona e 2-heptanona; III) Atividade nematicida direta com efeito de 97,2% na mortalidade de J<sub>2</sub> e 83,2% na inibição na eclosão de J<sub>2</sub>, devido à produção de protease e quitinase; IV) Efeito de repelência em sementes tratadas com a bactéria. A indução de resistência pela cepa BaNCT02 não foi confirmada, após experimento com raiz bipartida. No Capítulo II, a eficácia da cepa BaNCT02 no controle de *M. incognita* foi verificada em casa de vegetação e campo. No experimento em casa de vegetação, houve redução de 47,1% e 47,9% nos números de J<sub>2</sub> g raiz<sup>-1</sup> e número total de fitonematoides g raiz<sup>-1</sup>, aos 50 dias após plantio (DAP) respectivamente. Aos 100 DAP, parcelas tratadas com bactérias tiveram reduções de 50,5% no número de J<sub>2</sub> g raiz<sup>-1</sup>, 56,0% número de J<sub>2</sub> em 200 cm<sup>3</sup> de solo e 54,8% no número total de fitonematoides em 200 cm<sup>3</sup> de solo. O tratamento com a bactéria reduziu o fator de reprodução em 52,9% e aumentou a produtividade em 153 kg ha<sup>-1</sup>, em relação ao controle não tratado. Nenhum tratamento aumentou a massa seca de parte aérea e das raízes das plantas. Em condições de campo, tratamentos com a bactéria apresentaram redução de 33,7% no número de J<sub>2</sub> g raiz<sup>-1</sup> e 44,0% no número total de fitonematoides por g raiz<sup>-1</sup>, aos 50 DAP. Desta forma, a cepa BaNCT02 de *Bacillus amyloliquefaciens* controla *M. incognita* pelos mecanismos formação de biofilme, produção de protease e quitinase, produção de compostos orgânicos voláteis e repelência. E, conseqüentemente, reduz a infecção e fator de

reprodução de *M. incognita* na cultura da soja, resultando no incremento de produtividade.

Palavras-chave: Controle biológico. Fitonematoides. Bactéria.

## ABSTRACT

MOREIRA, Aurélio Carneiro Soares, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June 2023. **Mechanisms of action and efficiency of *Bacillus amyloliquefaciens* strain BaNCT02 in the control of *Meloidogyne incognita*.** Advisor: Everaldo Antônio Lopes. Co-advisors: Liliane Evangelista Visôto and Carlos Marcelo Silveira Soares.

Due to the multiplicity and specificity in which *Bacillus* species can control plant parasitic nematodes, it is important to study the eventual mechanisms of action of each strain, in order to enhance its application and efficiency in the field. Therefore, the objective of this work was to elucidate the possible mechanisms of action and efficiency of *Bacillus amyloliquefaciens* strain BaNCT02 against *Meloidogyne incognita*. In Chapter I, mechanisms of action of the bacteria on *M. incognita* were identified, including: I) Biofilm formation in the soybean rhizosphere; II) Production of volatile organic compounds, with an effect of 71.0% on J<sub>2</sub> mortality and 77.3% on J<sub>2</sub> hatching inhibition, including 2-undecanone and 2-heptanone; III) Direct nematicidal activity with an effect of 97.2% on J<sub>2</sub> mortality and 83.2% on J<sub>2</sub> hatching inhibition, due to protease and chitinase production; IV) Effect of repellency on seeds treated with the bacteria. Resistance induction by the BaNCT02 strain was not confirmed after an experiment with split root system. In Chapter II, the effectiveness of the BaNCT02 strain in controlling *M. incognita* was verified in the greenhouse and field. In the greenhouse experiment, there was a reduction of 47.1% and 47.9% in the numbers of J<sub>2</sub> g root<sup>-1</sup> and total number of plant-parasitic nematodes g root<sup>-1</sup>, at 50 days after planting (DAP) respectively. At 100 DAP, plots treated with bacteria had reductions of 50.5% in the number of J<sub>2</sub> g root<sup>-1</sup>, 56.0% in the number of J<sub>2</sub> in 200 cm<sup>3</sup> of soil and 54.8% in the total number of nematodes in 200 cm<sup>3</sup> of soil. Treatment with the bacteria reduced the reproduction factor by 52.9% and increased productivity by 153 kg ha<sup>-1</sup>, compared to the untreated control. No treatment increased the dry mass of shoots and roots of plants. Under field conditions, treatments with the bacteria showed a reduction of 33.7% in the number of J<sub>2</sub> g root<sup>-1</sup> and 44.0% in the total number of plant parasitic nematodes per g root<sup>-1</sup> at 50 DAP. Thus, the BaNCT02 strain of *Bacillus amyloliquefaciens* controls *M. incognita* through biofilm formation, protease and chitinase production, production of volatile organic compounds and repellency. And, consequently, it reduces the infection and reproduction factor of *M. incognita* in soybean, resulting in increased productivity.

Keywords: Biological control. Plant-parasitic nematodes. Bacterium.

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL .....	13
CAPÍTULO I - Mecanismos de ação de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> cepa BaNCT02 no controle de <i>Meloidogyne incognita</i> .....	15
RESUMO .....	15
ABSTRACT .....	16
INTRODUÇÃO .....	17
MATERIAL E MÉTODOS .....	18
Microrganismo .....	18
Formação de Biofilme .....	19
Produção de inóculo de <i>M. incognita</i> .....	20
Indução de resistência .....	21
Repelência de <i>B. amyloliquefaciens</i> cepa BaNCT02 a J <sub>2</sub> de <i>M. incognita in vitro</i> .....	23
Produção de compostos orgânicos voláteis de <i>B. amyloliquefaciens</i> com efeito nematocida .....	24
Identificação de compostos orgânicos voláteis de <i>B. amyloliquefaciens</i> cepa BaNCT02 com GC/MS .....	25
Detecção da atividade nematocida direta de <i>B. amyloliquefaciens</i> cepa BaNCT02 sobre <i>M. incognita in vitro</i> .....	27
Determinação de proteases produzido por <i>B. amyloliquefaciens</i> cepa BaNCT02 .....	27
Determinação de quitinase produzido por <i>B. amyloliquefaciens</i> cepa BaNCT02 .....	28
Determinação da concentração de proteína totais produzido por <i>B. amyloliquefaciens</i> cepa BaNCT02 .....	30
Análise estatística .....	30
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	31
Formação de biofilme por <i>B. amyloliquefaciens</i> cepa BaNCT02 .....	31
Indução de resistência .....	32
Produção de COVs por <i>B. amyloliquefaciens</i> cepa BaNCT02 e efeito sob <i>M. incognita in vitro</i> .....	33
Produção de protease e quitinase por <i>B. amyloliquefaciens</i> cepa BaNCT02 .....	36
Detecção da atividade nematocida direta de <i>B. amyloliquefaciens</i> cepa BaNCT02 sobre J <sub>2</sub> e ovos de <i>M. incognita in vitro</i> .....	37

Efeito de quimiotaxia pelo <i>B. amyloliquefaciens</i> cepa BaNCT02 em <i>M. incognita</i> .....	39
CONCLUSÕES .....	40
CAPÍTULO II - Eficiência de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> cepa BaNCT02 no controle de <i>Meloidogyne incognita</i> em soja .....	
RESUMO .....	41
ABSTRACT .....	42
INTRODUÇÃO .....	43
MATERIAL E MÉTODOS .....	44
Efeito de <i>B. amyloliquefaciens</i> cepa BaNCT02 no controle de <i>M. incognita</i> em soja cultivada em casa de vegetação .....	44
Efeito de <i>B. amyloliquefaciens</i> cepa BaNCT02 no controle do nematoide das galhas e produtividade de soja em condições de campo.....	46
Análise estatística .....	48
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	48
Efeito de <i>B. amyloliquefaciens</i> cepa BaNCT02 no controle de <i>M. incognita</i> em soja cultivada em casa de vegetação .....	48
Efeito de <i>B. amyloliquefaciens</i> cepa BaNCT02 no controle do nematoide das galhas e produtividade de soja em condições de campo.....	53
CONCLUSÃO .....	56
REFERÊNCIAS.....	57

## INTRODUÇÃO GERAL

O potencial produtivo dos cultivos agrícolas é afetado por inúmeros fatores bióticos e abióticos. Dentre os fatores bióticos, os fitonematoides são responsáveis por danos em todo o mundo em diversas culturas, incluindo batata, milho, café, tabaco, soja, tomate, citros, dentre outros. Mais de 4100 espécies de fitonematoides causam prejuízos na agricultura, agrupadas em 128 gêneros (Ferraz e Brown, 2016). A maioria dos fitonematoides habita o solo e ataca o sistema radicular das plantas (Machado et al., 2012). Estima-se que as perdas causadas por fitonematoides chegam a 78 bilhões de dólares por ano (Fourie et al., 2017; Lima et al., 2017).

Os nematoides das galhas pertencentes ao gênero *Meloidogyne* são os principais fitonematoides causadores de danos nas culturas agrícolas, devido seu alto grau de polifagia e distribuição cosmopolita (Adam et al., 2014). O ataque de *Meloidogyne* sp. no campo ocorre em reboleiras e as plantas atacadas apresentam sintomas de nanismo, murcha, clorose e amarelecimento generalizado. O juvenil de segundo estágio (J<sub>2</sub>) do nematoide das galhas eclode, penetra nas raízes e estabelece sítios de alimentação próximo aos feixes vasculares. Ao se alimentar, os fitonematoides injetam toxinas esofagianas que causam hipertrofia das células, causando o engrossamento das raízes – as galhas - que origina o nome popular do nematoide (Ferraz e Brown, 2016). As injúrias causadas durante a infecção dos fitonematoides favorecem a entrada de fungos e bactérias que causam doenças em plantas (Machado et al., 2012).

Por serem habitantes de solo e possuírem ampla gama de hospedeiros, o controle dos nematoides das galhas é difícil. Dentre as opções de manejo de fitonematoides, o uso de controle biológico tem aumentado em vários países, principalmente considerando os aspectos de eficiência e de menor impacto ambiental dessa estratégia (Cawoy, 2011; Gao et al., 2016). O controle biológico com bactérias colonizadoras do sistema radicular, as rizobactérias, pode ser um método eficiente mostrando resultados similares ou até superiores aos químicos (Galbieri e Belot, 2016). Essas bactérias produzem substâncias, que podem ser voláteis, enzimas hidrolíticas e compostos secundários capazes de inibir a embriogênese do ovo e eclosão de J<sub>2</sub>, matar juvenis, diminuir ovoposição afetando a reprodução dos fitonematoides. Algumas bactérias podem produzir substâncias que ativam genes nas plantas, que induzem as plantas a resistência sistêmica a patógenos. Além disso, os

fitonematoides são orientados por substâncias exsudadas pelas raízes das plantas, em um processo conhecido como quimiotaxia. Com a colonização das raízes pelas rizobactérias ocorre a transformação dos exsudados, causando a desorientação dos fitonematoides e, ao não encontrarem as raízes, eles podem morrer de inanição (Machado et al., 2012).

Em função da multiplicidade de mecanismos nos quais espécies de *Bacillus* podem controlar fitonematoides, é importante estudar como cepas com eventuais chances de exploração comercial atuam, de modo a otimizar a sua aplicação e eficiência no campo. Em estudos preliminares, a cepa BaNCT02 de *B. amyloliquefaciens* demonstrou eficiência na redução populacional de *Meloidogyne* spp. e *Pratylenchus* spp. na cultura da soja em campo (dados não publicados). No entanto, torna-se necessário entender quais os mecanismos de ação dessa cepa sobre tais fitonematoides. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar os eventuais mecanismos de ação e a eficiência da cepa BaNCT02 de *B. amyloliquefaciens* sobre *M. incognita*.

## **CAPÍTULO I - Mecanismos de ação de *Bacillus amyloliquefaciens* cepa BaNCT02 no controle de *Meloidogyne incognita***

### **RESUMO**

A utilização de bactérias como agentes de controle biológico tem se tornado frequente devido à sua eficácia e ao baixo impacto ambiental. Neste sentido, várias bactérias têm sido estudadas para seu potencial efeito nematicida, principalmente do gênero *Bacillus*. A eficácia dessas bactérias no controle do nematoide de galhas foi avaliada em vários estudos. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi identificar os eventuais mecanismos de ação de *Bacillus amyloliquefaciens* cepa BaNCT02 sobre *Meloidogyne incognita*. Avaliou-se a formação de biofilme pela cepa através de microscopia eletrônica de varredura, quimiotaxia e o efeito de metabólitos voláteis e não voláteis sobre juvenis e ovos. Além disso, procedeu-se a determinação da atividade específica de enzimas com efeito nematicidas e a identificação de voláteis em cromatografia gasosa. Dentre os mecanismos, foi identificada a formação de biofilme na rizosfera de soja; produção de compostos orgânicos voláteis, entre eles o 2-undecanona e 2-heptanona, com efeito de 71,0% na mortalidade de J<sub>2</sub> e 77,3% na inibição na eclosão de J<sub>2</sub>; atividade nematicida direta com efeito de 97,2% na mortalidade de J<sub>2</sub> e 83,2% na inibição na eclosão de J<sub>2</sub>. Foi identificada a produção de enzimas hidrolíticas, entre eles a produção de protease e quitinase. Também foi observado efeito de repelência em sementes tratadas com a cepa BaNCT02 em relação a sementes não tratadas. Portanto, o *B. amyloliquefacines* cepa BaNCT02 forma biofilme no sistema radicular de soja, produz enzimas hidrolíticas e compostos orgânicos voláteis com efeito de repelência e ação nematicida contra *M. incognita*.

Palavras-chave: Controle biológico. Enzimas hidrolíticas. Compostos orgânicos voláteis.

**Mechanisms of action of *Bacillus amyloliquefaciens* strain BaNCT02  
in the control of *Meloidogyne incognita***

**ABSTRACT**

The use of bacteria as biological control agents has become frequent due to their effectiveness and low environmental impact. In this sense, several bacteria have been studied for their potential nematicidal effect, mainly from the genus *Bacillus*. The effectiveness of these bacteria in controlling root-knot nematodes has been evaluated in several studies. Thus, the objective of this work was to identify the eventual mechanisms of action of *Bacillus amyloliquefaciens* strain BaNCT02 on *Meloidogyne incognita*. Biofilm formation by the strain was evaluated by scanning electron microscopy, chemotaxis, and the effect of volatile and non-volatile metabolites on juveniles and eggs. In addition, the determination of specific activity of enzymes with nematicidal effect and the identification of volatiles in gas chromatography. Among the mechanisms, biofilm formation in the soybean rhizosphere was identified; production of volatile organic compounds, including 2-undecanone and 2-heptanone, with a 71.0% effect on J<sub>2</sub> mortality and 77.3% on J<sub>2</sub> hatching inhibition; direct nematicidal activity with an effect of 97.2% on J<sub>2</sub> mortality and 83.2% on J<sub>2</sub> hatching inhibition. The production of hydrolytic enzymes was identified, including the production of protease and chitinase. A repellency effect was also observed in seeds treated with the BaNCT02 strain in relation to untreated seeds. Therefore, the *B. amyloliquefacines* strain BaNCT02 forms a biofilm in the soybean root system, produces hydrolytic enzymes and volatile organic compounds with repellent effect and nematicidal action against *M. incognita*.

Keywords: Biological control. Hydrolytic enzymes. Volatile organic compounds.

## INTRODUÇÃO

As rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPRs – ‘Plant Growth-Promoting Rhizobacteria’) são bactérias presentes na rizosfera com a capacidade de interagir com as raízes das plantas. Promovem crescimento de plantas e podem produzir substâncias antagonistas, modificando o ambiente e afetando de forma direta ou indireta os patógenos do solo, incluindo bactérias, fungos e fitonematoides (Machado et al., 2012; Ferreira, 2015).

O emprego de bactérias como tática de manejo populacional de fitonematoides vem ganhando espaço na agricultura. As bactérias não causam danos ao meio ambiente e desequilíbrio na microbiota do solo e não deixam resíduos em pós-colheita. Quanto à eficiência, o uso de bactérias vem mostrando resultados similares ou até superiores aos produtos químicos (Galbieri e Belot, 2016). A atividade nematicida das bactérias ocorre por indução de resistência, antibiose, interferência na orientação do patógeno, produção de metabólitos secundários e de voláteis (Ferraz e Brown, 2016). Os nematicidas biológicos, a base de bactérias disponíveis no mercado, apresentam em suas formulações cepas de *Bacillus*, *Pasteuria* e *Pseudomonas* (Agrofit, 2023).

Em geral, bactérias do gênero *Bacillus* produzem proteases e quitinases com efeito nematicida, que degradam componentes importantes da cutícula do ovo dos nematoides (Niu et al., 2010). Além de enzimas, espécies de *Bacillus* podem produzir substâncias com ação supressora sobre fitonematoides, incluindo ácidos orgânicos, lipídeos, cetonas e álcoois. Estes compostos se espalham pelos poros no solo e podem inibir o desenvolvimento dos fitonematoides ou matá-los (Etschmann et al., 2002; Campos et al., 2010; Yin et al., 2021). A espécie *B. amyloliquefaciens*, por exemplo, pode produzir substâncias nematicidas, incluindo plantazolicina, dipeptídeos e quitinases (Abdel-Salam et al., 2018; Engelbrecht et al., 2018).

De acordo com Santos (2018), o primeiro relato de *Bacillus amyloliquefaciens* foi feito por Fukumoto em 1943 como uma linhagem de *Bacillus subtilis*. Apenas em 1977, Priest et al. descreveram *B. amyloliquefaciens* como uma nova espécie. Essa bactéria é gram-positiva, mede de 0,7 a 3,0  $\mu\text{m}$ , vive em ambientes anaeróbicos de forma facultativa e forma endósporos. Há registros da presença dessa espécie em inúmeros sistemas, incluindo solo, alimentos, plantas, fermentações, entre outros (Santos, 2018). Alguns autores relatam que *B. amyloliquefaciens* são produtores de

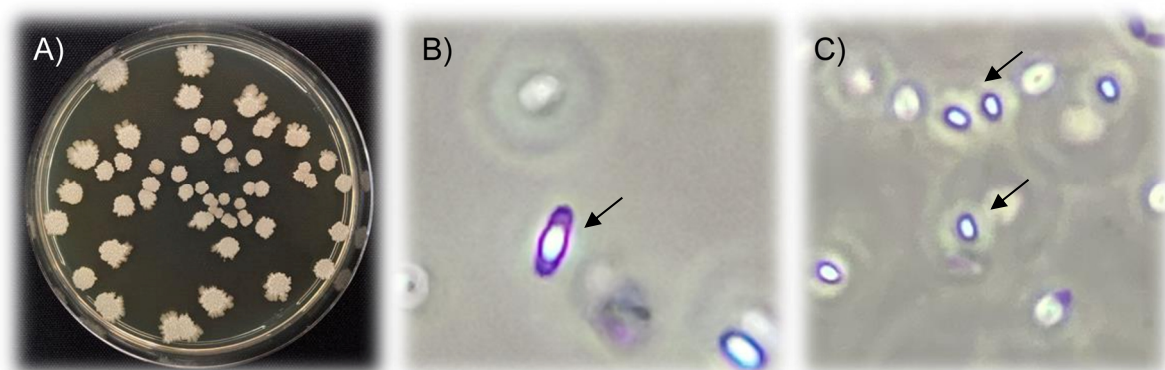
inúmeras enzimas, como por exemplo:  $\alpha$ -amilase, protease, serino protease, isoamilase, fosfatase alcalina, galactonase, malanase, xilanase (Priest et al., 1977; Santos, 2018).

Na literatura há inúmeros estudos sobre o potencial uso de *Bacillus* no manejo de patógenos na agricultura (Munif et al., 2001; Padgham e Sikora, 2007; Pinho, 2010; Zeriouh et al., 2013; Xu et al., 2014; Araújo; Amaral, 2021). Porém, cada cepa isolada tem seus mecanismos de ação específicos. Sendo assim, é necessário o estudo de cada cepa, para otimizar a eficiência de uso no controle de fitonematoides. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar os eventuais mecanismos de ação da cepa BaNCT02 de *B. amyloliquefaciens* sobre *M. incognita*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Microorganismo

A amostra foi coletada do solo de uma área de preservação permanente (APP) pertencente à Fazenda Recanto, município de Patos de Minas – MG. O bioma predominante é o Cerrado, formação florestal Cerradão. Após coleta, a amostra de solo foi suspendida em solução salina estéril e uma alíquota da solução foi plaqueada, após choque térmico, em ágar nutriente, isolando as colônias das bactérias obtidas. A cepa BaNCT02 de *B. amyloliquefaciens* (Figura 1) utilizada nesse projeto, foi previamente identificada por sequenciamento por Next Generation Sequencing, pertence à empresa Nooa Ciência e Tecnologia Agrícola. A bactéria foi avaliada em suspensão concentrada com concentração  $1,0 \times 10^9$  unidade formadora de colônia em um mililitro (UFC mL<sup>-1</sup>). O meio utilizado para cultivo da cepa é exclusivo da empresa detentora, sendo este não divulgado.



**Figura 1** - *Bacillus amyloliquefaciens* cepa BaNCT02. A) Unidades formadoras de colônias em TSA (Tryptone Soy Agar). B) Esporângio com seu endósporo. C) Exósporos, observado em microscópio com objetiva 100x /1.25 oil Ph3.

### Formação de Biofilme

Para avaliação da formação de biofilme por *B. amyloliquefaciens* cepa BaNCT02, sementes de soja foram submetidas à desinfestação em NaClO 2,5% e álcool 70%, por um e dois minutos (min), respectivamente, seguido de lavagem em água estéril. Em seguida foi feito o tratamento das sementes com a suspensão concentrada com  $1 \times 10^9$  UFC mL<sup>-1</sup>, que foram colocadas em placas de Petri preenchidas com ágar-água para germinação das sementes por três dias em Biochemical Oxygen Demand (B.O.D.) à 25 °C.

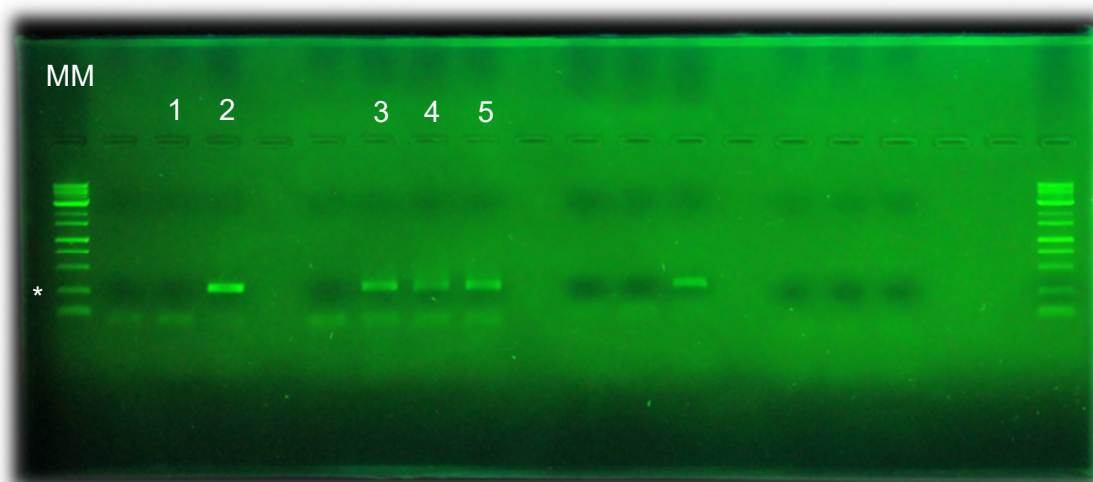
As amostras foram fixadas em solução Karnovsky (glutaraldeído 2,5% e formaldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,05M pH 7,5). Após o tempo mínimo de 24 horas (h) da fixação, os tecidos foram lavados em tampão cacodilato de sódio 0,05M pH 7,5 por três vezes de 10 minutos. Em seguida, as amostras foram desidratadas com soluções de concentrações crescentes de acetona (25, 50, 75, 90 e 100%, 10 min cada). O tratamento com a solução 100% foi realizado três vezes, 10 min, seguido de secagem utilizando aparelho de ponto crítico. Foram metalizados com ouro utilizando aparelho sputtering e observadas em microscópio eletrônico de varredura de campo de emissão Tescan Clara no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultra estrutural da Universidade Federal de Lavras, nas condições de 9 mm de distância de trabalho, 15 KeV e 86 pA (Moreira et al., 2022).

### Produção de inóculo de *M. incognita*

O inóculo de *M. incognita* foi adquirido na empresa GeneticSeeds and Biocontrol, localizada em Uberlândia – MG. O patógeno, foi multiplicado em plantas de jiló (*Solanum aethiopicum*) mantidas em vasos em casa de vegetação, com solo previamente autoclavado a 120°C por uma hora, por duas vezes. Os ovos/J<sub>2</sub> foram extraídos das raízes utilizando-se a técnica de Boneti e Ferraz (1981).

Para confirmação da espécie de nematoide, foi realizada a reação em cadeia da polimerase (PCR) com conjunto de primers específicos (Kiewnick et al. 2013). Dez fêmeas foram coletadas em raízes de jiló e transferidas para tubos contendo 15 µL de água livre de nuclease e 3 µL de tampão 5X GoTaq®. Em seguida, cada tubo recebeu cinco esferas de vidro de um milímetro de diâmetro. As amostras foram agitadas em amalgamador (Dentomat®, Modelo 600 BR, Degussa, Alemanha) por 30 segundos a 50/60 Hz para rompimento da cutícula do nematoide. Em seguida, 2 µL de proteinase-K (100 mg mL<sup>-1</sup>) foram adicionados aos tubos, seguido de incubação em termociclador por 60 °C por 60 minutos; 95 °C por 15 minutos e, por fim, a 15 °C por 2 min. O DNA extraído foi armazenado em a -20 °C até o momento da análise.

A reação de PCR foi realizada conforme descrito por Kiewnick et al. (2013), com uso dos primers MI2F4/MIR1, específico para a espécie *M. incognita*. Após a amplificação, o produto da PCR foi aplicado em gel de agarose 1% em tampão TBE 1X, corado com 0,7 µL de SyberSafe (10.000 x, Invitrogen, Carlsbad, USA) e submetido à eletroforese por aproximadamente 1 h e 30 min, a 45 V, 119 W, e 301 mA). Marcador molecular de 100 pb (DNA Ladder RTU, Kasvi, Curitiba/PR, Brasil, foi usado para comparação da massa molecular dos amplicons. O gel foi analisado em transluminador de luz UV e fotografado. Confirmado ser *M. incognita* (Figura 2), devido ao aparecimento de bandas típicas de 300 pb (Kiewnick et al. 2013).



**Figura 2** – Bandas de 300 pares em gel de agarose típicas de *Meloidogyne incognita* após reação de cadeia de polimerase com os primers MI2F4/MIR1 (Kiewnick et al. 2013). MM = marcador molecular de 100 pb. Poço 1 = Controle negativo. Poço 2 = Controle positivo. Poços 3, 4, e 5 amostras com 10 fêmeas cada. \* Banda de 300 pb.

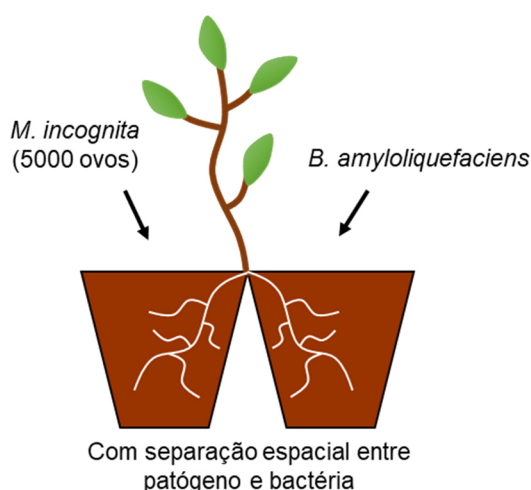
### Indução de resistência

Para avaliação do eventual efeito da bactéria na indução de resistência ao nematoide das galhas, foi usada a técnica da raiz bipartida, conforme proposto por Fabry et al. (2007). Foram utilizadas sementes de tomate (cv. Santa Clara) em bandejas de isopor contendo substrato Carolina Padrão® e cultivadas em casa de vegetação. Após 20 dias, plântulas com aproximadamente 10 centímetros de altura, foram retiradas do substrato e preparadas para desenvolver sistema radicular bipartido. Para isso, a raiz pivotante foi eliminada por meio de uma secção transversal. A partir da eliminação da raiz pivotante, as raízes laterais foram divididas em duas partes iguais, sendo as pontas resultantes inseridas em dois vasos, para separação espacial.

Foi utilizado solo peneirado e areia previamente autoclavado na proporção de 9:1, respectivamente. Foi realizada análise química e física do solo (Tabela 2). As correções da fertilidade foram feitas conforme as exigências da cultura do tomate. Em seguida, a mistura foi disposta em vasos com capacidade de cinco litros com quatro quilos da mistura. O período de enraizamento foi de aproximadamente sete dias (Figura 3).

Após o enraizamento, foi feita a aplicação da suspensão bacteriana na concentração de  $1 \times 10^9$  UFC mL<sup>-1</sup>, na dose de 400 mL ha<sup>-1</sup>, sete dias antes ou no

mesmo dia da inoculação do nematoide, com separação espacial entre os tratamentos e o patógeno (Figura 3). A aplicação foi realizada com pulverizador costal elétrico calibrada com pressão de 58 psi, ponta de pulverização tipo leque AD 11002 e vazão de 9 mL seg<sup>-1</sup>, perfazendo o volume de calda de 150 L ha<sup>-1</sup>. As plantas foram inoculadas com cinco mL de suspensão aquosa contendo 5000 ovos de *M. incognita*, aplicada no solo com auxílio de pipeta automática, em dois orifícios de dois centímetros de profundidade, localizados a dois centímetros do colo da planta. O delineamento experimental adotado foi em blocos casualizados, compostos por três tratamentos e oito repetições, totalizando 24 unidades experimentais, conforme a Tabela 1.



**Figura 3** - Técnica de raiz bipartida em tomateiro inoculado com *Meloidogyne incognita* e que receberam aplicações de *Bacillus amyloliquefaciens*. Adaptado de Fabry et al. (2007).

**Tabela 1** - Tratamentos envolvendo a aplicação combinada de *Bacillus amyloliquefaciens* cepa BaNCT02 e de *Meloidogyne incognita* em tomateiro para avaliação de indução de resistência.

Tratamento	Aplicação de <i>B. amyloliquefaciens</i> cepa BaNCT02
T <sub>1</sub>	Sete dias antes da inoculação com <i>M. incognita</i>
T <sub>2</sub>	No dia da inoculação com <i>M. incognita</i>
T <sub>3</sub>	Inoculação apenas de <i>M. incognita</i>

A extração dos fitonematoides das raízes foi realizada aos 50 dias após inoculação dos nematoides, como descrito por Boneti e Ferraz (1981). A quantificação dos nematoides foi realizada com auxílio de microscópio (Nikon, Modelo Eclipse E200). Este teste foi realizado com oito repetições.

**Tabela 2** – Características químicas e textura do solo utilizado para condução de experimentos em casa de vegetação.

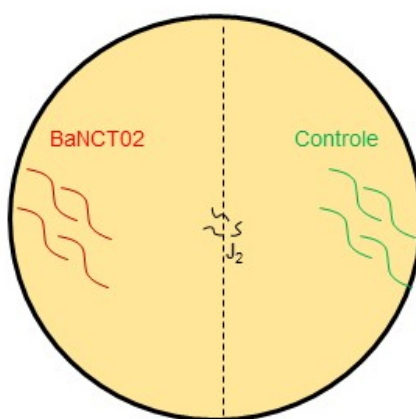
<b>pH</b>	<b>P-Mel</b>	<b>P-rem</b>	<b>K<sup>+</sup></b>	<b>Ca<sup>2+</sup></b>	<b>Mg<sup>2+</sup></b>	<b>Al<sup>3+</sup></b>	<b>H + Al</b>
.....H <sub>2</sub> O.....	.....mg dm <sup>-3</sup> .....		.....cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> .....				
5,84	6,80	9,59	338,49	3,40	1,48	0,03	2,89
<b>SB</b>	<b>t</b>	<b>T</b>	<b>V</b>	<b>m</b>	<b>Areia</b>	<b>Silte</b>	<b>Argila</b>
.....cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> .....		.....%.....		.....g kg <sup>-1</sup> .....			
5,75	5,78	8,64	66,55	0,52	292	208	500
<b>B</b>	<b>Cu</b>	<b>Fe</b>	<b>Mn</b>	<b>Zn</b>	<b>S</b>	<b>M.O.</b>	<b>COT</b>
.....mg dm <sup>-3</sup> .....						.....dag kg <sup>-3</sup> .....	
0,38	1,92	31,45	40,43	5,94	12,07	3,00	1,74

### Repelência de *B. amyloliquefaciens* cepa BaNCT02 a J<sub>2</sub> de *M. incognita* *in vitro*

Para avaliação do efeito de repelência da bactéria a *M. incognita*, radículas de feijão ficaram embebidas por três horas em água destilada (controle) ou em suspensão bacteriana na concentração de  $1 \times 10^9$  UFC mL<sup>-1</sup>, ambos foram colocados em béquer de 250 mL preenchidos com 50 mL do tratamento (Yin et al., 2021). Em seguida, as raízes foram cortadas em seções de aproximadamente um centímetro e transferidas para placas de Petri de dez centímetros de diâmetro contendo 0,5% de ágar-água (Masler e Rogers, 2011). Na borda do lado esquerdo, no terço médio da placa de Petri, foram colocadas as raízes embebidas na bactéria. Na borda do lado direito, no terço médio, foram colocadas as raízes não tratadas. Para obtenção de juvenis, os ovos foram extraídos (Boneti e Ferraz, 1981) e incubados em câmara de eclosão a temperatura ambiente. Os juvenis foram descartados após as primeiras 24 horas e utilizados somente os juvenis eclodidos entre 48 e 72 horas. No centro da placa foi adicionado 100 µL de água esterilizada contendo de 10 - 20 J<sub>2</sub> de *M. incognita*. As placas foram mantidas em incubadora a 28 °C no escuro. Após doze horas foi contado, com auxílio de microscópio invertido, o número de J<sub>2</sub> em cada seção da placa. Os dados foram usados na Equação 1.

$$PN(\%) = \frac{NNS.100}{NTN} \quad [1]$$

em que: PN (%) refere-se a percentagem de nematoides, NNS número de nematoides na seção da esquerda (efeito neutro) ou número de nematoides a direita (repelente) e NTN é número total de nematoides na unidade experimental amostrada. Os fitonematoides que migraram para o lado direito foram considerados como repelidos pela bactéria, já os que se movimentaram para lado esquerdo foram considerados atraídos pela bactéria (Figura 4). Este teste foi realizado com oito repetições e conduzido duas vezes.



**Figura 4** – Modelo da montagem do ensaio para avaliação do efeito de repelência ou atração de *Meloidogyne incognita* a raízes de feijão tratadas ou não com *Bacillus amyloliquefaciens* cepa BaNCT02.

### **Produção de compostos orgânicos voláteis de *B. amyloliquefaciens* com efeito nematicida**

Para avaliar o efeito de metabólitos orgânicos voláteis (COVs) produzidos por *B. amyloliquefaciens* cepa BaNCT02 sobre J<sub>2</sub> de *M. incognita*, foi usado método descrito por Silva et al. (2019). Foi utilizado tubo Supelco<sup>®</sup>, sendo estes preenchidos com 35 mL de ágar-nutriente e, em seguida, foi introduzido um eppendorf (sem tampa) de 2 mL. Após o preparo do Supelco<sup>®</sup>, foi feita a adição de 100 µL de água estéril (controle) ou suspensão contendo *B. amyloliquefaciens* (1x10<sup>9</sup> UFC mL<sup>-1</sup>) no meio ágar-nutriente. Dentro do eppendorf foram adicionados 100 µL de água esterilizada contendo 20-30 J<sub>2</sub> de *M. incognita*. Os tubos foram lacrados e mantidos por 48 horas a 25 °C. Este teste foi realizado com oito repetições e conduzido duas vezes.

O mesmo procedimento foi realizado para avaliação do efeito dos COVs de *B. amyloliquefaciens* cepa BaNCT02 na eclosão de juvenis, onde foi utilizado de 20 – 30 ovos de *M. incognita* em cada tubo. A avaliação de percentagem de eclosão de juvenis

foi realizada após incubação por 16 dias a 25 °C. Este teste foi realizado com oito repetições e conduzido duas vezes.

Para a avaliação de taxa de mortalidade, os J<sub>2</sub> foram transferidos dos eppendorf para poços de placa de Elisa de 96 poços. Em seguida, foi adicionado uma alíquota de 10 µL de hidróxido de sódio (1 M) sobre os J<sub>2</sub> e, após trinta segundos, foi contabilizado o número de J<sub>2</sub> mortos (imóveis) e vivos (móveis) (Chen e Dickson, 2000). A transformação dos dados para porcentagem foi realizada conforme Equação 2.

$$TX(\%) = \frac{NNM.100}{NTN} \quad [2]$$

em que: TX (%) refere-se a porcentagem de taxa de mortalidade, NNM número de nematoides mortos e NTN é número total de nematoides na unidade experimental amostrada.

Para a avaliação de porcentagem de eclosão, os ovos e juvenis foram transferidos dos eppendorf para poços de placa de Elisa de 96 poços. A transformação dos dados para porcentagem foi realizada conforme Equação 3.

$$PE(\%) = \frac{NJ.100}{NO} \quad [3]$$

em que: PE (%) refere-se a porcentagem de eclosão, NO número de ovos e NJ é número juvenis na unidade experimental amostrada.

O delineamento adotado foi inteiramente casualizados, composto por dois tratamentos, sendo T<sub>1</sub> -Controle (água estéril) e T<sub>2</sub> – *B. amyloliquefaciens* cepa BaNCT02, com oito repetições, totalizando 16 unidades experimentais. O experimento foi conduzido duas vezes.

### **Identificação de compostos orgânicos voláteis de *B. amyloliquefaciens* cepa BaNCT02 com GC/MS**

Com a confirmação de que a cepa BaNCT02 de *B. amyloliquefaciens* produz COVs com efeito nematocida em ovos e J<sub>2</sub> de *M. incognita*, procedeu-se a identificação das possíveis moléculas bioativas. Para a identificação dos COVs produzidos pelo

BaNCT02, foi utilizado um tubo Supelco®, preenchidos com 5 mL de ágar-nutriente (Tabela 3). Após o preparo do tubo foram adicionados 100 µL da suspensão contendo *B. amyloliquefaciens* ( $1 \times 10^9$  UFC mL<sup>-1</sup>). Os frascos foram lacrados e preparados em triplicata e acondicionados em B.O.D por 48 horas a 25 °C. Triplicatas do controle, contendo apenas 5 mL do meio de cultura, foram preparadas da mesma forma que as amostras.

**Tabela 3** - Descrição dos reagentes utilizados no meio de cultura ágar-nutriente.

Descrição	Quantidade (1000 mL H <sub>2</sub> O)
Ágar	20 g
Cloreto de sódio (NaCl)	8 g
Peptona	5 g
Extrato de carne	3 g

Para a identificação das moléculas voláteis foi utilizado o GC-MS da Central de Análises e Prospecção Química, do Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras – UFLA, como proposto por Adams (2007). Os COVs foram extraídos por SPME no modo headspace, utilizando a fibra DVB/CAR/PDMS (divinilbenzeno, carboxen e polidimetilsiloxano). A extração foi realizada à 45 °C por 30 minutos. Para a separação e identificação dos COVs foi utilizado o cromatógrafo a gás acoplado à espectrometria de massas (GC-MS QP 2010 Ultra) (Shimadzu, Japão), equipado com injetor automático de líquidos e gases automático AOC-5000 e uma coluna SBL-5 (5% fenil e 95% dimetilsiloxano) de 30 mm x 0,25 mm x 0,25 µm. O injetor, interface e a fonte de íons foram aquecidas à 250 °C, 240 °C e 200 °C, respectivamente, sendo a injeção realizada no modo *splitless*. Como gás de arraste foi usado He 5.0 a 1,0 mL min<sup>-1</sup>. A programação da temperatura do forno do GC foi de 40 °C até 150 °C a 3 °C min<sup>-1</sup> e então até 240 °C a 10 °C min<sup>-1</sup>.

Para identificar os COVs produzidos pela bactéria foi utilizado o software Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System (AMDIS) v. 2.63, e os cromatogramas dos picos das amostras gerado foram comparados com os espectros de padrões da National Institute of Standards and Technology (NIST) (Souza et al., 2022). Para a comparação entre os espectros de massas foram considerados somente picos em que a similaridade entre os espectros foi maior que 80%. Solução padrão de alcanos (C6-C20) foi analisada nas mesmas condições das amostras para calcular o índice de retenção de cada pico do cromatograma, os quais

foram comparados com valores da literatura (ADAMS) e da NIST. Não foram identificados COVs emitidos apenas pelo meio de cultura.

### **Detecção da atividade nematicida direta de *B. amyloliquefaciens* cepa BaNCT02 sobre *M. incognita* *in vitro***

A suspensão bacteriana a  $1,0 \times 10^9$  UFC mL<sup>-1</sup> foi centrifugada a 9000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e filtrado em membrana de nitrocelulose com poro de 0,45 µm. Posteriormente, aplicou-se 100 µL em uma cavidade de uma placa de Elisa de 96 poços juntamente com 20 a 30 J<sub>2</sub> de *M. incognita* em 100 µL de água esterilizada. As placas foram incubadas por 48 h a 25°C (Gao et al., 2016).

Após esse período, os nematoides mortos foram contabilizados. Para tal, foi adicionado uma alíquota de 10 µL de hidróxido de sódio (1 M) sobre os J<sub>2</sub> e, após trinta segundos, foi contabilizado o número de J<sub>2</sub> mortos (imóveis) e vivos (móveis) (Chen e Dickson, 2000). Cada tratamento teve oito repetições e o experimento foi conduzido duas vezes. Além da avaliação do efeito dos metabólitos em juvenis, foi realizado a mesma metodologia para avaliação do efeito na eclosão de juvenis. O delineamento adotado foi inteiramente casualizados, composto por dois tratamentos, sendo T<sub>1</sub>-Controle (água estéril) e T<sub>2</sub> – *B. amyloliquefaciens* cepa BaNCT02, com oito repetições, totalizando 16 unidades experimentais e foi conduzido duas vezes.

### **Determinação de proteases produzido por *B. amyloliquefaciens* cepa BaNCT02**

#### Obtenção do extrato enzimático

Para a análise da atividade proteolítica, *B. amyloliquefaciens* cepa BaNCT02 foi cultivado em meio líquido, composto por 5 g de extrato de carne, 15 g de peptona, 5 g de NaCl, 5 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,2 g de CaCl<sub>2</sub> e adicionado 1000 mL de água destilada. Posteriormente o pH foi ajustado para 7,0. Em seguida, o meio foi fracionado em três erlenmeyers, onde a bactéria foi inoculada e mantida por 72 horas, a 130 rpm a 30 °C. Foram transferidas alíquotas de 2 mL para microtubos nos tempos de 24, 48 e 72 horas. Para a obtenção do extrato enzimático, as amostras foram centrifugadas a

12000 g por 10 minutos para separação das células e, o sobrenadante foi utilizado para as análises.

#### Atividade enzimática

A atividade proteolítica foi determinada segundo a metodologia de Charney, Tomarelli et al., 1947, usando como substrato a solução de azocaseína 0,2%. Nesta análise, a reação foi iniciada incubando-se 60 µL da amostra (extrato enzimático) com 50 µL da solução de azocaseína à 37 °C por 30 min. Para paralisar a reação, foi adicionado 240 µL de ácido tricloroacético a 10%, homogeneizado em vórtex e mantido em repouso por 15 minutos em banho de gelo. Posteriormente, a amostra foi centrifugada a 8000 g por 5 minutos e 240 µL do sobrenadante foram transferidos para um microtubo, onde foram adicionados 280 µL de solução de NaOH 1M. Paralelamente, foi feito um tubo controle contendo 50 µL de tampão de Tris- HCl 0,1 M pH 8,0 e 60 µL de extrato enzimático e um tubo branco com 50 µL da solução de azocaseína e 60 µL de tampão de Tris-HCl 0,1 M pH 8,0. A determinação da absorbância das amostras foi realizada a 440 nm.

#### **Determinação de quitinase produzido por *B. amyloliquefaciens* cepa BaNCT02**

A produção de quitinase pela cepa BaNCT02 de *B. amyloliquefaciens* foi avaliada através do método do ácido dinitrosalicílico (DNS), segundo Miller, 1959. Este determina presença de açúcar redutor, N-acetil-glicosamina (NAG), que é o produto final da hidrólise da solução coloidal de quitina.

#### Preparo dos reagentes para a determinação da atividade enzimática

Para o preparo do reagente DNS, 10 g de ácido dinitrosalicílico foram dissolvidos em 20 mL de NaOH 2 M. A solução foi misturada a 70 °C. Paralelamente foi preparada uma solução com 300 g de tartarato de sódio e potássio em 500 mL de água destilada. A solução de DNS foi adicionada lentamente a solução de tartarato e o volume final foi completado para 1000 mL com água destilada.

O preparo de quitina coloidal foi feito conforme proposto por Souza et al. (2009), onde 5 g de quitina em pó (Sigma®) foram adicionados a 60 mL de ácido clorídrico 37% (HCl) e mantidos a temperatura ambiente sob agitação vigorosa durante 1 hora. A preparação foi então filtrada em lã de vidro para reter frações da quitina que não foram dissolvidas, sendo adicionada depois a 200 mL de etanol 50%, também sob agitação vigorosa. Por fim, adicionou-se 1 L de água destilada para a lavagem da quitina. Após a decantação da quitina, a água destilada foi trocada constantemente até atingir um pH próximo a 7 (pH alcançado 6,3). A quitina coloidal foi estocada em geladeira à 4 °C.

#### Obtenção do extrato enzimático

A ativação da cepa foi realizada em 10 mL de meio líquido infusão cerebro-coração (BHI) por 24 h, a 30°C, a 150 rpm. Em seguida, foi realizado a semeadura da bactéria em meio ágar Yamaguchi (Tabela 4) (1,5% ágar) e incubado por 24 h a 30 °C. Posteriormente, uma UFC da bactéria foi transferida para 10 mL de meio líquido Yamaguchi e incubada por 24 h, a 150 rpm a 30 °C. Esse pré-inoculo foi transferido para 90 mL de meio líquido Yamaguchi e incubado novamente por 120 h, a 150 rpm a 30 °C. Nos períodos de 0, 24, 48, 72, 96 e 120 h, 5 mL da cultura foram coletados e centrifugados a 10.000 g, por 15 min, para a determinação da atividade enzimática. O mesmo volume retirado (5 mL) foram repostos aos frascos de cultivo da bactéria. Todos os procedimentos dessa etapa foram conduzidos em câmara de fluxo laminar e todos os materiais autoclavados.

**Tabela 4** – Descrição dos reagentes utilizados no meio de cultura Yamaguchi.

<b>Descrição</b>	<b>Quantidade (% m/v)</b>
Extrato de levedura	0,4
Triptona	0,2
Sulfato de Mg (MgSO <sub>4</sub> )	0,5
Fosfato monobásico de potássio (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0,12
Fosfato dibásico de potássio (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	0,28
Quitina coloidal	1,5

## Atividade Enzimática

Para determinar a atividade enzimática, uma curva padrão de N-acetilglicosamina (Sigma®) foi realizada com o reagente DNS. As concentrações de acetilglicosamina foram: 50, 100, 300, 400 e 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Os valores da atividade foram expressos em unidade (U), onde 1 U representa 1  $\mu\text{mol}$  de açúcar redutor liberados por hora de reação.

A reação enzimática foi feita conforme proposto por Lima et al. (2001), onde 1 mL de extrato enzimático foi homogeneizado a 1 mL de quitina coloidal 0,5% tampão fosfato 50 mM, pH 7,4. A mistura reacional foi incubada a 37 °C em banho maria por 6 horas. Após esse período, 200  $\mu\text{L}$  da reação foram transferidos para microtubos contendo 1 mL do reagente DNS. Essa mistura foi submetida a banho fervente 100 °C por 10 minutos. O branco foi composto por 1 mL do meio Yamaguchi estéril e 1 mL de solução de quitina coloidal a 0,5% tampão fosfato 50 mM, pH 7,4. A leitura das absorbâncias foi realizada a 550 nm.

### **Determinação da concentração de proteína totais produzido por *B. amyloliquefaciens* cepa BaNCT02**

Para a determinação das proteínas totais presentes nos extratos enzimáticos de proteases e quitinases foi utilizado o método de Bradford (Bradford, 1976). Foram adicionados 700  $\mu\text{L}$  de água destilada em 200  $\mu\text{L}$  da solução de Bradford e 100  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático. Em seguida, a mistura foi homogeneizada em vórtex e colocada em repouso em temperatura ambiente por dez minutos. O controle (branco) foi composto por 800  $\mu\text{L}$  de água destilada e 200  $\mu\text{L}$  da solução de Bradford. Em seguida foi realizada a avaliação em espectrofotômetro a 595 nm.

### **Análise estatística**

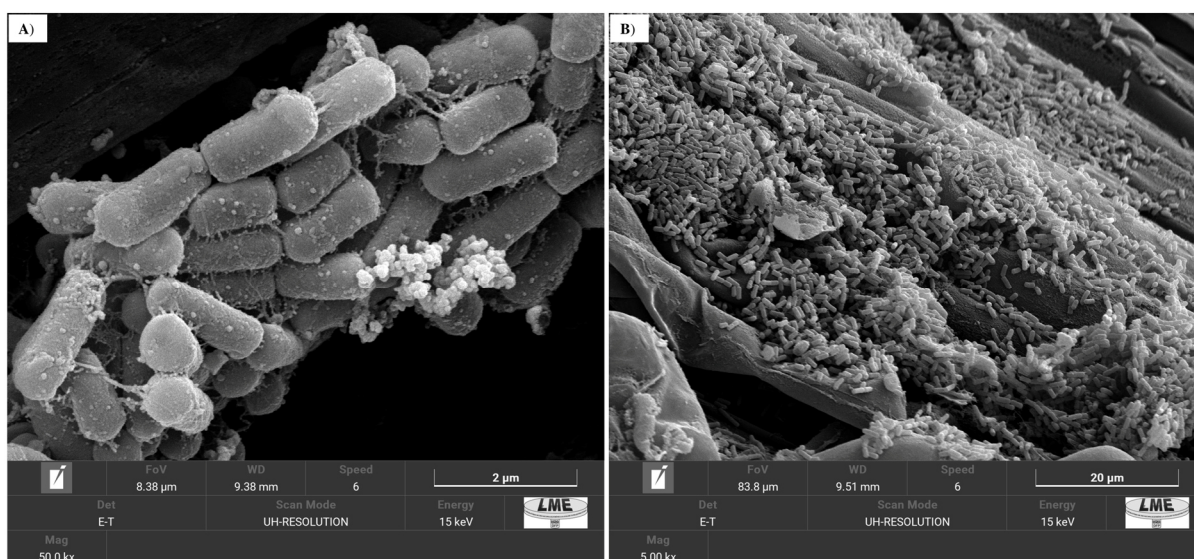
Os dados foram submetidos aos testes de Levene (Med), Jaque-Bera, aditividade e ESD para avaliação das condições de homogeneidade das variâncias, normalidade dos resíduos, aditividade do modelo e presença de outliers, respectivamente. Os dados foram submetidos à análise de variância ( $p = 0,05$ ). As

diferenças entre as médias foram avaliadas pelo teste de Tukey ( $p = 0,05$ ). Todas as análises estatísticas foram realizadas com auxílio do SPEED Stat 2.6 (Carvalho et al. 2020).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Formação de biofilme por *B. amyloliquefaciens* cepa BaNCT02

Foi observado que a cepa BaNCT02 de *B. amyloliquefaciens* coloniza as radículas de soja, formando biofilme (Figura 5). Com isso, ocorre a interferência no processo de sinalização para eclosão de juvenis, reconhecimento e infecção de fitonematoides. O sistema radicular das plantas exsuda substâncias (açúcares,  $\text{CO}_2$ , hormônios, aminoácidos) que induzem a eclosão de juvenis e atraem os patógenos até a rizosfera. A formação do biofilme por bactérias no sistema radicular das plantas pode interferir no reconhecimento das raízes pelos fitonematoides, reduzindo assim a infecção e reprodução. Paralelamente, a eclosão de juvenis de fitonematoides pode ser reduzida devido a mudança da conformação dos exsudados das raízes que atuam como sinalizadores para que ocorra a eclosão (Tian, et al., 2007; Ferraz e Brown, 2016; Gao, et al., 2016).



**Figura 5** – Micrografia eletrônica de varredura: Biofilme bacteriano do agente de controle biológico *Bacillus amyloliquefaciens* cepa BaNCT02 no rizoplano de soja. A) Colônia de *B. amyloliquefaciens* (Magnificação: 50 kx, Barra de escala: 2  $\mu\text{m}$ ) B) Formação de biofilme pela cepa BaNCT02 em radículas de soja (Magnificação: 5 kx, Barra de escala: 20  $\mu\text{m}$ ). Laboratório de Microscopia Eletrônica – UFLA.

O processo de germinação das sementes algumas substâncias como amidos e carboidratos são exsudadas e servem de alimento para as rizobactérias, que irão colonizar as raízes (Ferraz et al., 2010). O biofilme é formado pela adesão de células a uma superfície, seguido pela multiplicação celular e agregação das células em massas, que por sua vez formam a matriz extracelular. Esta matriz é composta por uma variedade de moléculas secretadas pelas células bacterianas, principalmente polissacarídeos e proteínas. O biofilme oferece algumas vantagens para as células que o formam, tais como proteção contra estresses abióticos, resistência a antibióticos e à dessecação (Kavamura et al., 2012; Tortora, et al. 2012).

Os solos agrícolas são compostos por uma extensa comunidade de organismos que atuam em inúmeros processos, incluindo decomposição de restos culturais, formação de agregados, parasitismo de plantas e controle biológico de insetos e patógenos. Essa biota é composta principalmente por bactérias, protozoários, nematoides e fungos. Algumas bactérias colonizadoras da rizosfera são benéficas às plantas, por induzir crescimento vegetal e inibirem a ação de patógenos (Niu et al., 2006; Barreto, 2009). Em relação as plantas, a presença de biofilme bacteriano podem proteger contra patógenos, como fungos, bactérias e fitonematoides (Zerouh et al., 2013; Xu et al., 2014). Yin et al. (2021), relataram que plantas de pepino tratadas com *B. cereus* cepa Bc-cm103 reduz a infecção de *M. incognita* devido a formação de biofilme pela bactéria.

### **Indução de resistência**

A aplicação de *B. amyloliquefaciens* cepa BaNCT02 sete dias antes ou no dia da inoculação com *M. incognita* não reduziu o número de fitonematoides em tomateiro com sistema radicular bipartido (Tabela 5). Esse resultado sugere que a cepa BaNCT02 não induz a resistência sistêmica a *M. incognita* em tomateiros. Esses dados não corroboram com Burkett-Cadena et al. (2008), que relataram em seu trabalho que *B. amyloliquefaciens* cepa FZB42 atua na indução de resistência sistêmica em plantas contra patógenos e promove crescimento de plantas de tomate. Os autores observaram que essa cepa produz metabólitos secundários com efeito contra fitonematoides, principalmente lipopeptídeos, surfactinas, iturina A e fengicinas. A aplicação conjunta de *Pseudomonas putida*, *Pantoea agglomerans*,

*Cedeca davisae* e *Enterobacter* spp. também induz a resistência sistêmica a *M. incognita* em tomateiro (Munif et al., 2001).

A indução de resistência tem início quando moléculas produzidas pela bactéria indutora se ligam às moléculas receptoras nas células da planta (Silva et al., 2008). No caso do isolado BaNCT02, possivelmente a bactéria não produz compostos que ativam mecanismos de resistência de tomateiro a fitonematoides. Logo, os mecanismos de ação da bactéria envolvem substâncias com efeito direto sobre *M. incognita*.

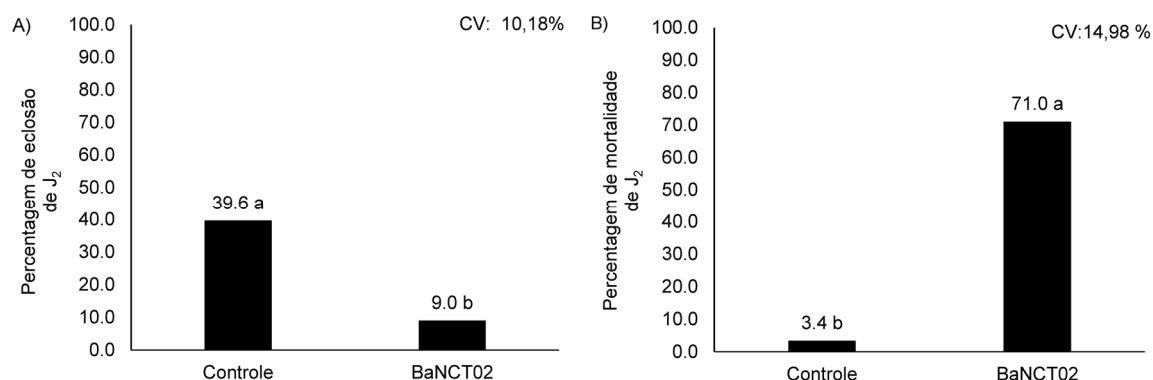
**Tabela 5** – Efeito da indução de resistência por *Bacillus amyloliquefaciens* cepa BaNCT02 contra *Meloidogyne incognita* na cultura do tomate.

Aplicação BaNCT02	Dose (mL ha <sup>-1</sup> )	J <sub>2</sub> g raiz <sup>-1</sup>	Ovo g raiz <sup>-1*</sup>	Total g raiz <sup>-1</sup>
Controle	-	34,3 Ns	2,1 Ns	36,4 Ns
7 dias antes	400	23,9	0,0	23,9
0 dias	400	28,0	0,2	28,2
CV (%)		53,9	273,5	50,2

Ns.: não significativo. \* Para a variável ovos g de raiz<sup>-1</sup> os dados foram transformados pelo método de Box-Cox  $\gamma = 0,5$ .

### **Produção de COVs por *B. amyloliquefaciens* cepa BaNCT02 e efeito sob *M. incognita in vitro***

A cepa BaNCT02 de *B. amyloliquefaciens* produziu COVs que inibiram a eclosão e causaram a morte de J<sub>2</sub> de *M. incognita in vitro* (Figura 6). A eclosão de J<sub>2</sub> foi de apenas 9% na presença dos COVs da bactéria em comparação com controle que obteve aproximadamente 40% de eclosão aos 16 dias (Figura 6A). COVs de *B. amyloliquefaciens* cepa BaNCT02 mataram 71% dos J<sub>2</sub> de *M. incognita* após 48 h (Figura 6B).

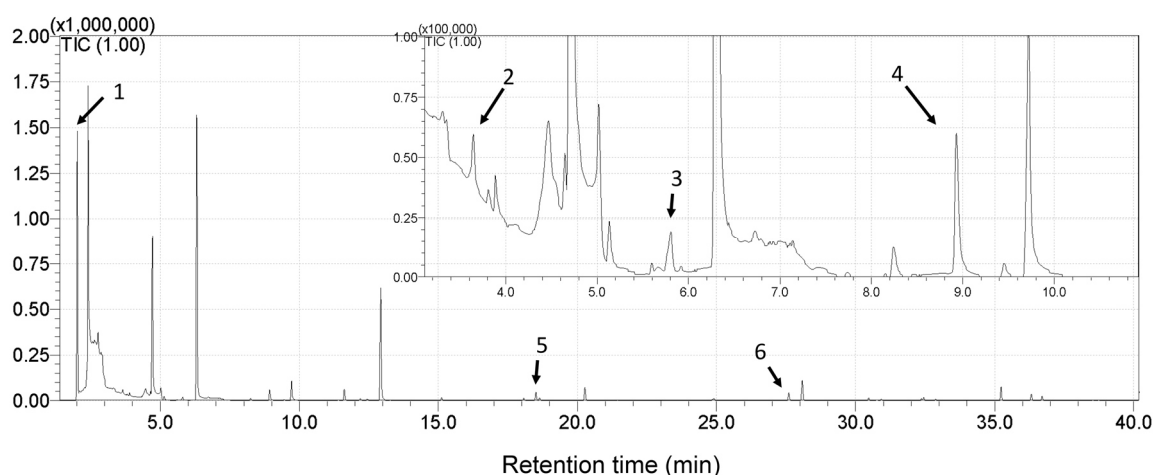


**Figura 6** – Efeito de compostos orgânicos voláteis (COVs) produzidos por *Bacillus amyloliquefaciens* cepa BaNCT02 em *Meloidogyne incognita*. A) Percentagem de inibição da eclosão de J<sub>2</sub> de *Meloidogyne incognita*, após 16 dias em contato com os COVs B) Percentagem de mortalidade de J<sub>2</sub> de *Meloidogyne incognita*, após 48 horas em contato com os COVs. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste F a 5% de probabilidade. \* Para a variável Percentagem de eclosão de J<sub>2</sub> os dados foram transformados pelo método de raiz cúbica.

Os COVs podem ser liberados por fungos, bactérias, plantas e resíduos orgânicos (Silva et al., 2019). Eles são solúveis em água, possuem baixo peso molecular e alta eficiência no controle de fitonematoides. A volatilidade permite que esses compostos sejam transportados para locais distantes através de macroporos presentes no solo, aumentando a área de controle. A solubilidade em água ajuda na distribuição uniforme do COVs para as camadas mais profundas do solo. E o baixo peso molecular permite a penetração mais fácil e rápido nas membranas celulares, o que aumenta a eficiência do composto (Pinho, 2010).

As bactérias podem produzir COVs, incluindo terpenos, pirazinas, pirróis, aldeídos, álcoois, cetonas, ácidos orgânicos e lipídeos (Niu et al., 2010). Os COVs se difundem no solo através dos macroporos, resultando um efeito fumigante, inibindo o desenvolvimento de patógenos e até mesmo sua morte (Yin et al., 2021). Por exemplo, a bactéria *Pseudomonas putida* produz COVs identificados como dimetil-dissulfeto, 2-nonanona, 2-octanona e 2-undecanona que inibem diferentes estádios de *M. incognita* (Zhai et al., 2018).

Nesse estudo foram identificados seis COVs produzidos pelo *B. amyloliquefaciens* cepa BaNCT02, dos quais um ou mais compostos podem ter potencial efeito nematicida. O dióxido de carbono foi o COV mais intenso dentre os identificados, enquanto os demais compostos apresentaram pequena intensidade no cromatograma (Figura 7 e Tabela 6).



**Figura 7** - Cromatograma dos compostos orgânicos voláteis produzidos por *Bacillus amyloliquefaciens* cepa BaNCT02, indicando os compostos identificados, com ampliação entre 3 e 11 minutos. Picos não numerados também estavam presentes no cromatograma do controle.

Números dos compostos correspondem à identificação apresentada na Tabela 5.

**Tabela 6** - Compostos orgânicos voláteis produzidos pela bactéria *Bacillus amyloliquefaciens* cepa BaNCT02 e identificados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, através da microextração em fase sólida (SPME-CG-MS).

	tr	Composto	IR exp	IR teórico	CAS
1	2,07	dióxido de carbono	x	x	124 - 38 - 9
2	3,63	2-pentanona	688	685	107-87-9
3	5,72	ácido 2-metilpropanóico	800	790	79-31-2
4	8,91	2-heptanona	886	889	110-43-0
5	18,62	2-nonanol	1102	1101	628-99-9
6	27,59	2-undecanona	1287	1294	112 - 12 - 9

tr: tempo de retenção. IR exp: índice de retenção experimental. IR teórico: índice de retenção teórico. CAS: registro da substância química.

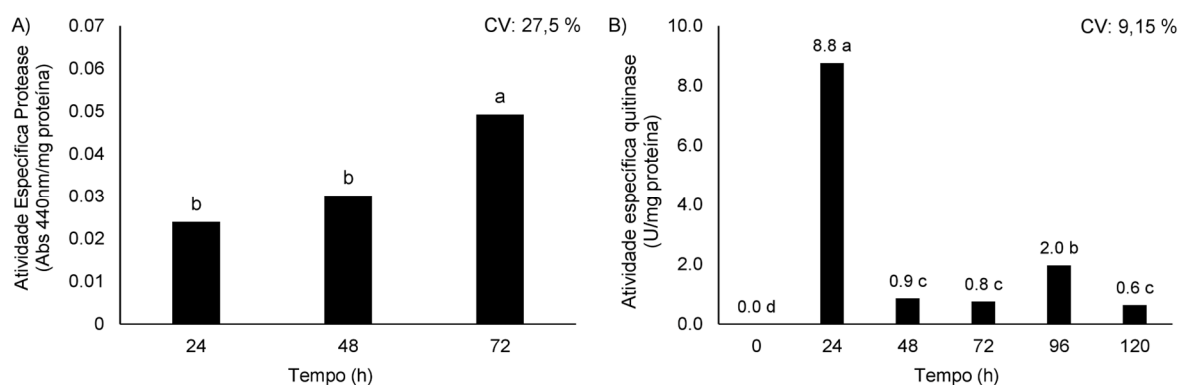
Huang et al. (2010) realizaram um estudo similar com *B. megaterium* cepa YFM3.25, com o intuito de identificar os COVs produzidos pela bactéria com efeito nematicida. Foram identificados 17 compostos, entre eles o 2-undecanona que causou 100% de mortalidade de *J2* e inibição na eclosão de *M. incognita*. Nesse mesmo sentido, Gu et al. (2007) relataram ação nematicida de 100% de 2-undecanona contra *Bursaphelenchus xylophilus*. Também há relatos que o composto 2-heptanona, produzido pela cepa GJ-7 de *B. velezensis*, possui efeito nematicida em *J2* e ovos de *M. hapla* (Wu et al., 2023).

No presente trabalho, foi detectada a produção de 2-undecanona e 2-heptanona por *B. amyloliquefaciens* cepa BaNCT02, que podem ser um dos possíveis responsáveis pelo efeito nematicida contra *M. incognita*. Para os demais compostos

não foi encontrado na literatura relatos de efeito nematicida, sendo assim necessário estudos com estes COVs de forma isolada e seu efeito em fitonematoides.

### Produção de protease e quitinase por *B. amyloliquefaciens* cepa BaNCT02

A cepa BaNCT02 de *B. amyloliquefaciens* possui atividade proteolítica com 24, 48 e 72 horas. Ao analisar a atividade específica da protease, se nota que a maior atividade foi com 72 horas após inoculação, quando comparado com 24 e 48 horas (Figura 8A). A cepa BaNCT02 também apresentou atividade da enzima quitinase com 24, 48, 72, 96 e 120 horas após inoculação, sendo a maior atividade com 24 horas (Figura 8B).



**Figura 8** – Atividade de protease e quitinase por *Bacillus amyloliquefaciens* cepa BaNCT02. A) Atividade específica de protease com 24, 48 e 72 horas. B) Atividade específica quitinase ao longo de 120 horas. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

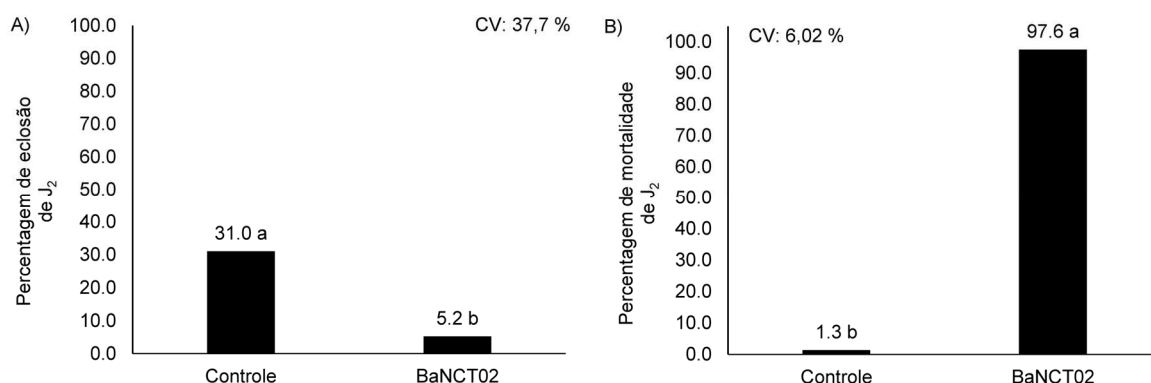
A cutícula dos juvenis de fitonematoides são constituídas por colágenos que tem função estrutural, proteínas solúveis, principalmente glicoproteínas e lipídeos que selecionam a entrada e saída de substâncias. Além disso, a cutícula é recoberta por uma fina membrana proteica de proteção (Niu et al., 2006). Os ovos de fitonematoides são compostos por três camadas que promovem proteção a fatores externos. A primeira camada (camada externa) é rica em proteínas denominada vitelínica. A camada intermediária é composta por quitinas que confere resistência física a casca dos ovos. E por último, a camada interna é composta por lipídeos que seleciona a entrada e saída de substâncias (Araújo; Amaral, 2021). Estudos evidenciaram que bactérias do gênero *Bacillus* produzem enzimas como as proteases que inibem a

eclosão de juvenis e que degradam as proteínas presentes na cutícula de *M. incognita* causando sua morte (Niu et al., 2010; Engelbrecht et al., 2018).

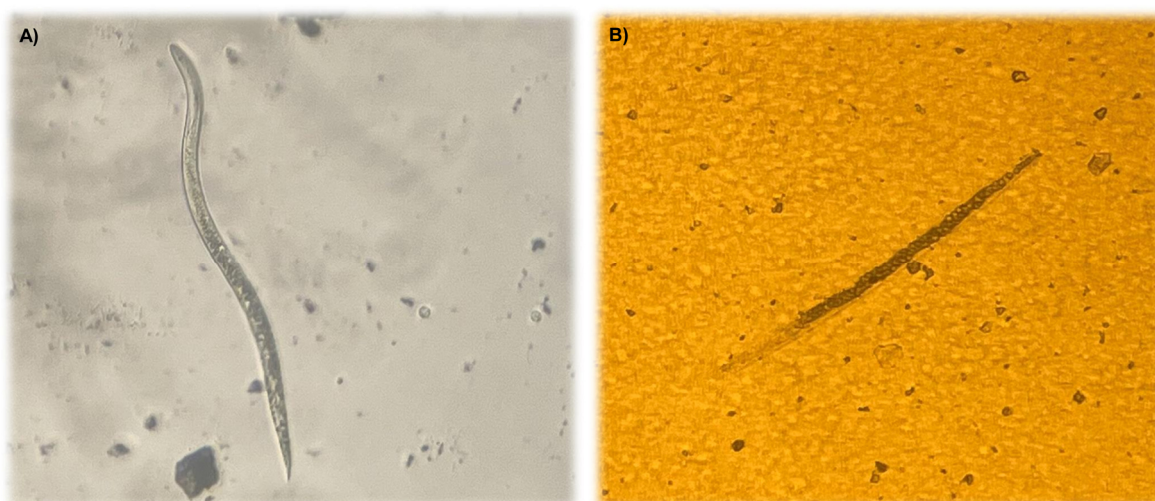
A produção de quitinase por agentes de controle biológico de fitonematoides pode ser um mecanismo de ação desejável, uma vez que a cutícula e a casca de ovos de nematoides possuem quitina em sua composição, principalmente a casca do ovo (Araújo e Amaral, 2021). Algumas cepas de *B. amyloliquefaciens* produzem quitinase, como relatado por Abdel-Salam et al. (2018). Da mesma forma, Alexandre (2018) relatou em seu estudo 13 isolados bacterianos produtores de quitinase. De acordo com Niu et al. (2006), a atividade nematicida dos microrganismos não é devido a um único fator, mas sim a uma complexa gama de fatores patogênicos como voláteis, proteases, quitinases e produção de outros metabólitos. Desta forma, podemos afirmar que a cepa BaNCT02 é produtora das enzimas hidrolíticas protease e quitinase, com grande potencial de atividade nematicida.

#### **Detecção da atividade nematicida direta de *B. amyloliquefaciens* cepa BaNCT02 sobre J<sub>2</sub> e ovos de *M. incognita* *in vitro***

O isolado BaNCT02 de *B. amyloliquefaciens* apresentou atividade nematicida direta sob ovos e J<sub>2</sub> de *M. incognita* (Figura 9). A bactéria inibiu a eclosão de J<sub>2</sub> em 83,22% em relação ao controle (Figura 9A) e matou 97,6% de juvenis (Figura 9B). Desta forma, podemos afirmar que a cepa BaNCT02 de *B. amyloliquefaciens* produz metabólitos com efeito nematicida sobre J<sub>2</sub> de *M. incognita*. Tais substâncias causaram danos à cutícula e no interior de J<sub>2</sub> de *M. incognita*, conforme foi observado em J<sub>2</sub> que permaneceram por 72 h em contato com o sobrenadante do cultivo de *B. amyloliquefaciens* cepa BaNCT02 (Figura 10).



**Figura 9** - Efeito do contato direto de *Meloidogyne incognita* com sobrenadante de *Bacillus amyloliquefaciens* cepa BaNCT02. A) Percentagem de eclosão de J<sub>2</sub> de *Meloidogyne incognita* após 16 dias em contato direto. B) Percentagem de mortalidade de J<sub>2</sub> de *Meloidogyne incognita* após 48 horas em contato direto. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste F a 5% de probabilidade.



**Figura 10** - Juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita* em placas de Elisa de 96 poços, observado em microscópio com objetivas invertidas 20x /0.40. A) Juvenil de segundo estágio de *M. incognita* em água. B) Juvenil de segundo estágio de *M. incognita* após 72 horas em contato com sobrenadante da cepa BaNCT02 de *Bacillus amyloliquefaciens*.

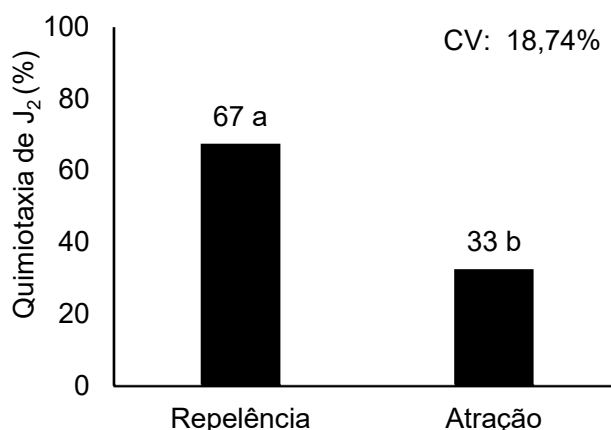
Bactérias do gênero *Bacillus* produzem inúmeras substâncias que possuem efeito nematicida (Machado et al., 2012; Abbsi et al., 2013; Ferreira, 2015). Naves et al. (2004) avaliaram 40 isolados de bactérias endofíticas e o filtrado de duas cepas deles mataram 90% de J<sub>2</sub> de *M. javanica* e inibiu a eclosão de 80%. Da mesma forma, sobrenadante do cultivo de *B. megaterium* inibiu a eclosão de *M. graminicola* em 60% (Padgham e Sikora, 2007).

No presente estudo, não identificamos substância(s) com efeito nematicida direto sobre *M. incognita*. É possível que a produção de quitinases e proteases

produzidas pela bactéria (Figuras 8) possa ter resultado na ação nematicida observada no experimento. Jamal et. al (2017) relataram que *B. amyloliquefaciens* cepa Y1 inibiu a eclosão e matou J<sub>2</sub> de *M. incognita*. O principal composto produzido pela bactéria com potencial efeito nematicida foi identificado como Ciclo (D-Pro-L-Leu).

### Efeito de quimiotaxia pelo *B. amyloliquefaciens* cepa BaNCT02 em *M. incognita*

Os juvenis de *M. incognita* foram repelidos por *B. amyloliquefaciens* cepa BaNCT02 (Figura 11). Em média, 67% dos juvenis foram repelidos em raízes de feijoeiro tratadas com a bactéria, em comparação com raízes não tratadas. Isso pode ter ocorrido devido as substâncias produzidas pela bactéria, a exemplo das COVs (Figura 6) e compostos não voláteis (Figura 9).

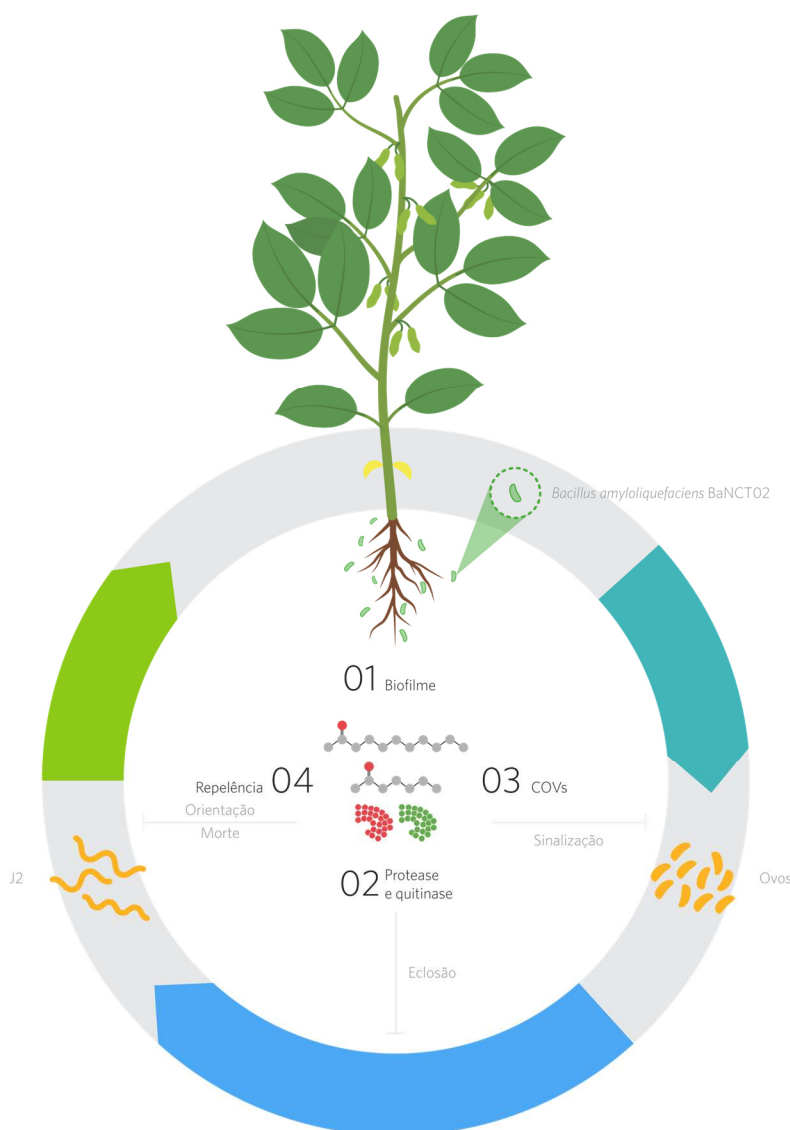


**Figura 11** – Efeito de quimiotaxia de J<sub>2</sub> de *Meloidogyne incognita* a raízes de feijão tratadas com *Bacillus amyloliquefaciens* cepa BaNCT02 as 12 horas após inoculação. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste F a 5% de probabilidade.

Espécies de *Bacillus* produzem substâncias que podem repelir fitonematoides. Yin et al. (2021) constataram o efeito de repelência de *B. cereus* cepa Bc-cm103 em raízes de pepino de 95,6% em relação ao controle, com *M. incognita*, possivelmente devido à produção de COVs. Nesse mesmo sentido, Hu et al. (2017) observaram que J<sub>2</sub> de *M. incognita* foram repelidos por raízes de tomate inoculadas com *B. cereus* quando comparado com raízes sem a bactéria.

## CONCLUSÕES

A cepa BaNCT02 de *B. amyloliquefaciens* possui quatro mecanismos de ação contra *M. incognita*: formação de biofilme; produção COVs com efeito nematicida (2-undecanona e 2-heptanona); produção das enzimas protease e quitinase, e efeito de repelência (Figura 12).



**Figura 12** – Mecanismos de ação de *Bacillus amyloliquefaciens* cepa BaNCT02 no controle de *Meloidogyne incognita*.

## CAPÍTULO II - Eficiência de *Bacillus amyloliquefaciens* cepa BaNCT02 no controle de *Meloidogyne incognita* em soja

### RESUMO

O controle biológico com *Bacillus* pode ser alternativa eficaz no manejo de espécies de *Meloidogyne*. A aplicação de *Bacillus* spp. no tratamento de sementes e em sulco de plantio de soja, além de reduzir a população de *Meloidogyne*, pode aumentar a produção de grãos. Para verificar a eficiência da cepa BaNCT02 de *Bacillus amyloliquefaciens* no controle de *M. incognita* em soja, foram conduzidos experimentos em casa de vegetação e campo. A população de fitonematoides em raiz e solo, o fator de reprodução, a promoção de crescimento e produtividade da soja foram avaliados. No ensaio em casa de vegetação, houve redução de 47,1% e 47,9% no número de J<sub>2</sub> e número total de fitonematoides g raiz<sup>-1</sup>, respectivamente, aos 50 dias após plantio (DAP). Já aos 100 DAP, houve redução de 50,5% no número de J<sub>2</sub> g raiz<sup>-1</sup>, 56,0% número de J<sub>2</sub> 200 cm<sup>3</sup> de solo e 52,9% o fator de reprodução. O aumento da produtividade foi equivalente a 153 kg ha<sup>-1</sup>. Em campo, o tratamento com a bactéria reduziu em 33,7% e 44,0% o número de J<sub>2</sub> e número total de fitonematoides g raiz<sup>-1</sup>, respectivamente, aos 50 DAP. Desta forma, conclui-se que a cepa BaNCT02 de *B. amyloliquefaciens* controla *M. incognita* na cultura da soja.

Palavras-chave: Controle biológico. Nematóide das galhas. *Glycine max*.

**Efficiency of *Bacillus amyloliquefaciens* strain BaNCT02 in  
the control of *Meloidogyne incognita* in soybean**

**ABSTRACT**

Biological control with *Bacillus* can be an effective alternative in the management of *Meloidogyne*. The application of *Bacillus* spp. in seed treatment and in soybean planting furrows, besides reducing the *Meloidogyne* population, it can increase grain production. To verify the efficiency of the BaNCT02 strain of *Bacillus amyloliquefaciens* in the control of *M. incognita* in soybean, experiments were carried out in a greenhouse and in the field. The population of plant-parasitic nematodes in the root and soil, the reproduction factor, the growth promotion, and productivity of soybean were assessed. In the greenhouse, there was a reduction of 47.1% and 47.9% in the number of J<sub>2</sub> and total number of plant-parasitic nematodes g root<sup>-1</sup>, respectively, at 50 days after planting (DAP). At 100 DAP, there was a reduction of 50.5% in the number of J<sub>2</sub> g root<sup>-1</sup>, 56.0% in the number of J<sub>2</sub> 200 cm<sup>3</sup> of soil and 52.9% in the reproduction factor. The increase in productivity was equivalent to 153 kg ha<sup>-1</sup>. In the field, the treatment with the bacteria reduced by 33.7% and 44.0% the number of J<sub>2</sub> and the total number of plant parasitic nematodes g root<sup>-1</sup>, respectively, at 50 DAP. Thus, it is concluded that the BaNCT02 strain of *B. amyloliquefaciens* controls *M. incognita* in soybean.

Keywords: Biological control. Root-knot nematode. *Glycine max*.

## INTRODUÇÃO

Os fitonematoides do gênero *Meloidogyne* causam prejuízos em várias culturas agrícolas em todo o mundo. Esses fitonematoides reduzem a qualidade de algumas culturas, além de reduzir a absorção de água e nutrientes, ocasionando, em alguns casos, a morte da planta. Além disso, aumenta a predisposição das plantas a outros patógenos (Pinho, 2010).

O manejo de nematoides é dificultado por serem habitantes de solo, possuírem ampla gama de hospedeiros e, em alguns casos, alta variabilidade genética (Ferraz e Brown, 2016). De acordo com Alcanfor et al. (2001), outro fator que dificulta seu manejo é sua cutícula pouco permeável, dificultando a ação de produtos químicos e biológicos.

Assim, a redução da população de nematoides no solo depende da integração de várias táticas de controle, incluindo controle biológico, uso de variedades resistentes, plantas antagonistas, rotação de cultura e controle químico (Helena et al., 2006). Nos últimos anos, inúmeras pesquisas com intuito de identificar inimigos naturais dos fitonematoides vem sendo realizadas no mundo (Araújo et al., 2002; Terefe et al., 2008; Fernandes et al, 2014; Szilagyi-Zecchin et al, 2015; Basyony e Abo-Zaid, 2018; Mazzuchelli et al., 2020; Gowda et al. 2022). As bactérias são um dos principais organismos com potencial de exploração comercial para o controle de fitonematoides. Algumas bactérias presentes na rizosfera impedem a penetração de nematoides, induzem resistência em plantas e produzem substâncias nematotóxicas (Nunes et al., 2010).

Bactérias do gênero *Bacillus* liberam metabólitos com efeito deletério em diferentes etapas no desenvolvimento de fitonematoides, podendo atuar na embriogênese do ovo, eclosão, sobrevivência de juvenis e reprodução (Machado et al., 2012). Produtos classificados como nematicidas e fungicidas a base de bactérias *Bacillus amyloliquefaciens* já estão comercialmente disponíveis para os agricultores. No Brasil, os produtos contendo a bactéria são recomendados para o tratamento de sementes, aplicação foliar e em sulco de plantio. Esses produtos já possuem registro no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), e tem como praga alvo vários patógenos de plantas, tais como: *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne javanica*, *Pratylenchus brachyurus*, *Rotylenchus reniformis*, *Heterodera glycines* e *Sclerotinia sclerotiorum* (Agrofit, 2023).

Após a identificação dos mecanismos de ação da cepa BaNCT02 de *B. amyloliquefaciens*, descrito no capítulo anterior, é relevante a validação com ensaios em casa de vegetação, o que possibilita verificar efeito em condições controladas e principalmente as implicações no fator de reprodução de fitonematoides. Além disso, em condições de campo, é possível validar o efeito na redução de infecção do patógeno e a resposta na produtividade da cultura. A partir dos resultados obtidos, será possível concluir a eficácia da cepa BaNCT02 de *B. amyloliquefaciens* no controle de nematoides, bem como o seu potencial nematicida.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Efeito de *B. amyloliquefaciens* cepa BaNCT02 no controle de *M. incognita* em soja cultivada em casa de vegetação

O experimento foi conduzido na casa de vegetação da empresa NOOA BRASIL, localizada na rodovia BR 365 - Km 428 (latitude: 18°44'10,17" S e longitude: 46°40'7,21" O), no município Patos de Minas-MG. Foi utilizado solo e areia (9:1 v/v) previamente peneirado e autoclavado a 120 °C durante uma hora, por duas vezes. O solo foi submetido para análise química e física (Tabela 7). Após o preparo, o solo foi homogeneizado com auxílio de betoneira e colocado em vasos plásticos de 8 L de capacidade, preenchidos com seis kg de solo, os quais foram mantidos em casa de vegetação.

**Tabela 7** - Características químicas e textura do solo utilizado para condução de experimentos em casa de vegetação.

<b>pH</b>	<b>P-Mel</b>	<b>P-rem</b>	<b>K<sup>+</sup></b>	<b>Ca<sup>2+</sup></b>	<b>Mg<sup>2+</sup></b>	<b>Al<sup>3+</sup></b>	<b>H + Al</b>
.....H <sub>2</sub> O.....	.....mg dm <sup>-3</sup> .....			.....cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> .....			
5,84	6,80	9,59	338,49	3,40	1,48	0,03	2,89
<b>SB</b>	<b>t</b>	<b>T</b>	<b>V</b>	<b>m</b>	<b>Areia</b>	<b>Silte</b>	<b>Argila</b>
.....cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> .....			.....%		.....g kg <sup>-1</sup> .....		
5,75	5,78	8,64	66,55	0,52	292	208	500
<b>B</b>	<b>Cu</b>	<b>Fe</b>	<b>Mn</b>	<b>Zn</b>	<b>S</b>	<b>M.O.</b>	<b>COT</b>
.....mg dm <sup>-3</sup> .....						.....dag kg <sup>-3</sup> .....	
0,38	1,92	31,45	40,43	5,94	12,07	3,00	1,74

Os ovos de *M. incognita* foram extraídos conforme descrito por Boneti e Ferraz (1981). No momento da semeadura, o solo de cada vaso foi infestado com 5000 ovos e J<sub>2</sub> de *M. incognita*. A aplicação da suspensão de nematoides foi realizada em três orifícios de cinco centímetros de profundidade, a cerca de três centímetros da semente (Fernandes et al., 2014).

O delineamento adotado foi blocos casualizados, constituído por três tratamentos e 16 repetições, totalizando 54 unidades experimentais (Tabela 8). As doses utilizadas foram previamente determinadas em outros experimentos (dados não divulgados). Em cada vaso foi semeado quatro sementes de soja CZ37B43 IPRO (ciclo tardio; suscetível a *Meloidogyne*), e posteriormente foi realizado o desbaste para duas plantas por vaso.

**Tabela 8** – Descrição dos tratamentos dos experimentos avaliando o efeito de *Bacillus amyloliquefaciens* cepa BaNCT02 no controle de *Meloidogyne incognita* em soja cultivada em casa de vegetação e campo.

Tratamentos	Forma de aplicação	Dose
Controle não tratado	-	-
<i>B. amyloliquefaciens</i> BaNCT02	TS	4 (ml kg <sup>-1</sup> )
<i>B. amyloliquefaciens</i> BaNCT02	Sulco	400 (ml ha <sup>-1</sup> )

TS: Tratamento de sementes

A cepa BaNCT02 de *B. amyloliquefaciens*, que foi usado neste projeto, pertence à empresa Nooa Ciência e Tecnologia Agrícola. A bactéria foi avaliada em suspensão concentrada com concentração 1,0 x 10<sup>9</sup> UFC/ml para aplicação em tratamento de semente (TS) e sulco de plantio. A aplicação em sulco foi realizada com pulverizador costal elétrico calibrado com pressão de 58 psi, ponta de pulverização tipo leque AD 11002 e vazão de 9 mL seg<sup>-1</sup>. Os sulcos foram abertos com três centímetros de profundidade e as sementes distribuídas manualmente. Em seguida, a aplicação da suspensão bacteriana foi realizada com vazão equivalente a 150 L ha<sup>-1</sup>. Para o tratamento de sementes de soja, 1000 g de sementes foram acondicionados em sacos plásticos (30 x 20 centímetros), seguido da aplicação da suspensão bacteriana com uso de pipeta automática e agitação manual, visando homogeneização da suspensão com as sementes.

Para determinar a quantidade de nematoides no solo e nas raízes, as coletas foram realizadas aos 50 e 100 dias após o plantio. Em cada vaso, o solo foi

homogeneizado e coletado uma amostra de aproximadamente 300 g. Os nematoides foram extraídos do solo pela técnica de Jenkins (1964). A extração e quantificação dos nematoides nas raízes foi realizada pelo método proposto por Boneti e Ferraz (1981), sendo utilizada toda a raiz presente em cada vaso. O fator de reprodução foi avaliado através da relação entre a população final (solo e raiz) e inicial de nematoides (5000 J<sub>2</sub>/ovos) (Oostenbrink, 1966).

A massa seca de parte aérea foi determinada usando duas plantas por vaso no estágio V<sub>4</sub> (terceira folha trifoliolada completamente aberta). Cada órgão da planta foi acondicionado, separadamente, em sacos de papel, e a secagem das diferentes partes da planta foi realizada utilizando-se o método padrão de secagem em estufa com circulação de ar forçada, a 65 °C, até peso constante. Paralelamente foi feita a quantificação da massa fresca de raiz, uma vez que seria necessário extrair os fitonematoides, limitando a secagem das raízes.

Para estimar a produtividade, as plantas foram colhidas manualmente. O teor de água dos grãos foi avaliado com medidor de umidade de sementes portátil (G650I) e corrigido para 13%. Para pesagem dos grãos, foi utilizada uma balança digital com precisão de 0,01 grama. A produtividade foi estimada em quilograma por hectare (ha), sendo considerado a população de 220 mil plantas por ha.

### **Efeito de *B. amyloliquefaciens* cepa BaNCT02 no controle do nematoide das galhas e produtividade de soja em condições de campo**

O experimento foi conduzido em área naturalmente infestada com *Meloidogyne* sp., pertencente a Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais - EPAMIG, localizada no município de Patos de Minas (MG), sob sistema de irrigação de pivô central. O solo foi analisado quanto a sua característica física e química (Tabela 9). O manejo da adubação foi realizado com base na análise de solo de acordo com a 5ª Aproximação - Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais (Ribeiro et al., 1999). Previamente a semeadura foi realizado a coleta de amostras de solo, para determinação da população inicial de *Meloidogyne* sp. onde se obteve a população de 482 J<sub>2</sub> em 200 cm<sup>3</sup> de solo.

**Tabela 9** – Características físicas e químicas do solo da área experimental de campo localizada em Patos de Minas - MG.

<b>pH</b>	<b>P-Mel</b>	<b>P-rem</b>	<b>K<sup>+</sup></b>	<b>Ca<sup>2+</sup></b>	<b>Mg<sup>2+</sup></b>	<b>Al<sup>3+</sup></b>	<b>H + Al</b>
.....H <sub>2</sub> O.....	.....mg dm <sup>-3</sup> .....		.....cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> .....				
5,35	4,99	13,66	276,94	1,86	0,76	0,03	3,56
<b>SB</b>	<b>t</b>	<b>T</b>	<b>V</b>	<b>m</b>	<b>Areia</b>	<b>Silte</b>	<b>Argila</b>
.....cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> .....		.....%.....		.....g kg <sup>-1</sup> .....			
3,33	3,36	6,89	48,33	0,89	238	224	538
<b>B</b>	<b>Cu</b>	<b>Fe</b>	<b>Mn</b>	<b>Zn</b>	<b>S</b>	<b>M.O.</b>	<b>COT</b>
.....mg dm <sup>-3</sup> .....					.....dag kg <sup>-3</sup> .....		
0,19	4,64	20,44	15,90	8,00	6,90	3,77	2,19

O delineamento adotado foi do tipo blocos casualizados, constituído por três tratamentos e oito repetições, totalizando 24 parcelas (Tabela 8). A densidade de semeadura foi de 11 plantas de soja CZ37B43 IPRO (ciclo tardio; susceptível a *Meloidogyne*) por metro, com espaçamento entre linhas de 0,5 m, perfazendo uma população de 220 mil plantas por hectare. Cada parcela experimental foi composta por cinco linhas de seis metros de comprimento, com espaçamento entre linhas de 0,5 m. A área útil de cada parcela foi constituída pelas três linhas centrais, descartando 0,5 m em cada extremidade da parcela.

O manejo de plantas daninhas, pragas e doenças foi realizado de acordo com a necessidade da cultura, utilizando-se produtos registrados para cada finalidade. Nenhum produto foi usado para o manejo de nematoides, exceto os referentes aos tratamentos.

Os tratamentos, doses e forma de aplicação utilizados foram os mesmos descritos no experimento em casa de vegetação. Para determinar a quantidade de nematoides no solo, as coletas foram realizadas no dia do plantio, aos 50 e 100 DAP. Em cada parcela, foram coletadas três amostras simples para formação de uma composta, com auxílio de trado holandês na profundidade de 0-20 centímetros. Os nematoides foram extraídos do solo pela técnica de Jenkins (1964). A extração e quantificação dos nematoides nas raízes foi pelo método proposto por Boneti e Ferraz (1981). O fator de reprodução foi avaliado através da relação entre a população final e inicial de nematoides (Oostenbrink, 1966). A produtividade foi determinada colhendo as plantas manualmente considerando-se as três fileiras centrais, descartando-se 0,5 m em cada extremidade. E a produtividade foi estimada em quilograma por hectare.

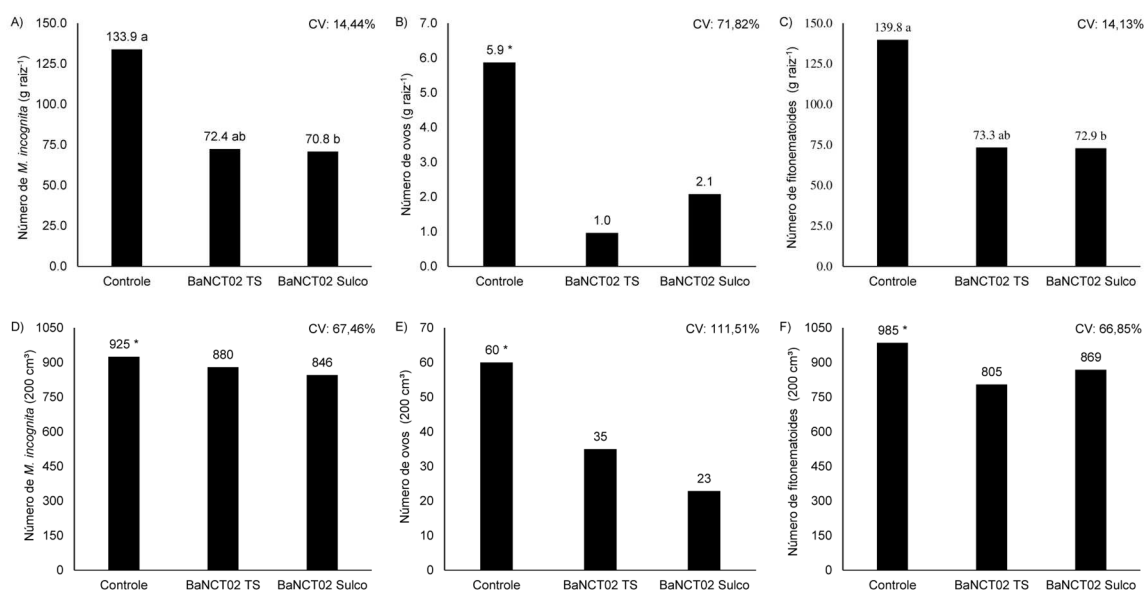
## Análise estatística

Os dados foram submetidos aos testes de Levene (Med), Jaque-Bera, aditividade e ESD para avaliação das condições de homogeneidade das variâncias, normalidade dos resíduos, aditividade do modelo e presença de outliers, respectivamente. Os dados foram submetidos à análise de variância ( $p = 0,05$ ). As diferenças entre as médias foram avaliadas pelo teste de Tukey ( $p = 0,05$ ). Todas as análises estatísticas foram realizadas com auxílio do SPEED Stat 2.6 (Carvalho et al. 2020).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

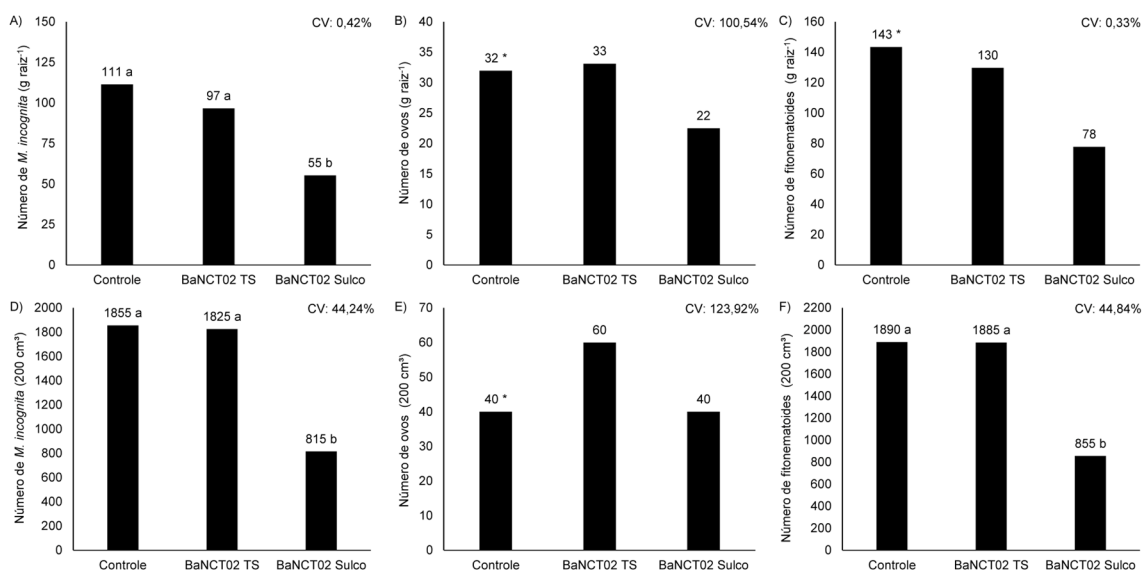
### **Efeito de *B. amyloliquefaciens* cepa BaNCT02 no controle de *M. incognita* em soja cultivada em casa de vegetação**

A cepa BaNCT02 reduziu o número de nematoides nas raízes de soja aos 50 DAP (Figura 13). O tratamento com *B. amyloliquefaciens* cepa BaNCT02 em sulco de plantio reduziu em 47,1% o número de J<sub>2</sub> *M. incognita* por grama de raiz em relação ao controle (Figura 13A). O número total de fitonematoides (J<sub>2</sub> + ovos) g raiz<sup>-1</sup> foram reduzidos em 47,9% em relação ao controle (Figura 13C). Por sua vez, nenhum tratamento reduziu o número de ovos por grama de raiz, ovos e nematoides em 200 cm<sup>3</sup> de solo (Figura 13B, D, E e F).



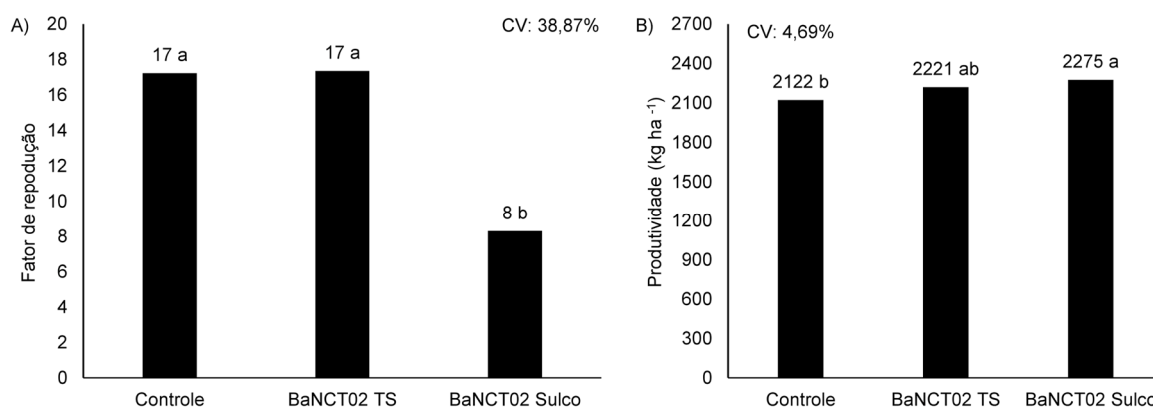
**Figura 13** – Efeito da aplicação de *Bacillus amyloliquefaciens* cepa BaNCT02 em tratamento de sementes e sulco de plantio na cultura da soja cv CZ37B43 IPRO sobre *Meloidogyne incognita* aos 50 dias de cultivo em casa de vegetação. A) número de J<sub>2</sub>, (B) número de ovos e (C) número total de *M. incognita* (g raiz<sup>-1</sup>). (D) número de J<sub>2</sub>, (E) número de ovos e (F) número total de *M. incognita* (200 cm<sup>3</sup> de solo). Médias com letras distintas diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. \* não significativo. \*\* As figuras A, B e C os dados foram submetidos a transformação pelo método de raiz cubica. BaNCT02 TS: *B. amyloliquefaciens* em tratamento de sementes. BaNCT02 Sulco: *B. amyloliquefaciens* em aplicação em sulco de plantio.

Aos 100 DAP, foi observado que a aplicação de *B. amyloliquefaciens* cepa BaNCT02 em sulco de plantio reduziu em 50,5% o número de J<sub>2</sub> de *M. incognita* em raízes de soja (Figura 14A), em 56,0% o número de J<sub>2</sub> em 200cm<sup>3</sup> de solo e em 54,8% o número total de fitonematóides em 200 cm<sup>3</sup> de solo (Figura 14D e E). Nenhum tratamento reduziu o número de ovos na raiz e no solo (Figura 14B e F) e número total de fitonematóides nas raízes (Figura 14C).



**Figura 14** - Efeito da aplicação de *Bacillus amyloliquefaciens* cepa BaNCT02 em tratamento de sementes e sulco de plantio na cultura da soja cv CZ37B43 IPRO sobre *Meloidogyne incognita* aos 100 dias de cultivo em casa de vegetação. (A) Número de J<sub>2</sub>, (B) número de ovos e (C) número total de *M. incognita* (g raiz<sup>-1</sup>). (D) Número de J<sub>2</sub>, (E) número de ovos e (F) número total de *M. incognita* (200 cm<sup>3</sup> de solo). Médias com letras distintas diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. \* não significativo. \*\*As figuras A e C os dados foram submetidos a transformação pelo método de BoxCox  $\gamma = -1,1$ . BaNCT02 TS: *B. amyloliquefaciens* em tratamento de sementes. BaNCT02 Sulco: *B. amyloliquefaciens* em aplicação em sulco de plantio.

O fator de reprodução de *M. incognita* foi reduzido em 52,9% em parcelas tratadas com a cepa BaNCT02 em sulco de plantio (Figura 15A). A produtividade de grãos estimada em kg ha<sup>-1</sup>, foi 8,6% maior após a aplicação de BaNCT02 via sulco de plantio, em comparação ao controle (Figura 15B).



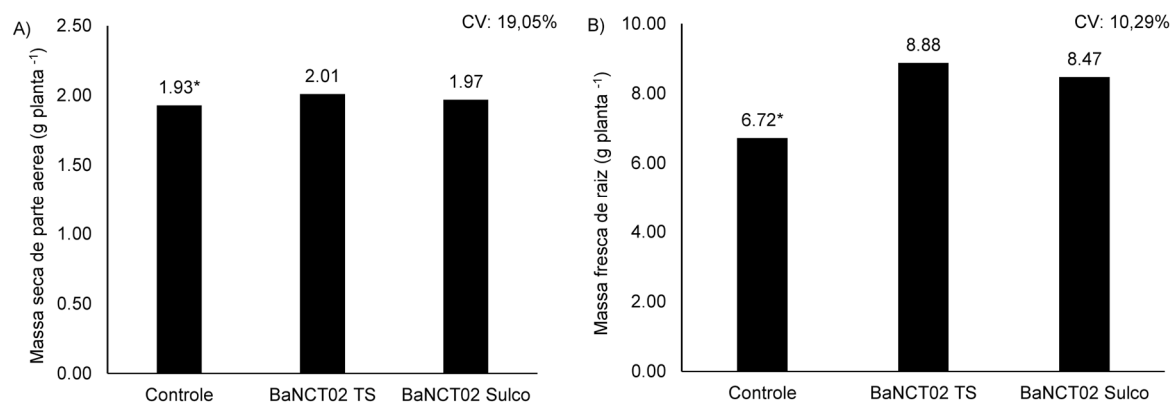
**Figura 15** - Efeito da aplicação de *Bacillus amyloliquefaciens* cepa BaNCT02 em tratamento de sementes e sulco de plantio na cultura da soja cv CZ37B43 IPRO sobre *Meloidogyne incognita* cultivado em casa de vegetação. A) Fator de reprodução de *M. incognita* em soja. B) Produtividade de cultura da soja (kg ha<sup>-1</sup>). Médias com letras distintas diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. BaNCT02 TS: *B. amiloliquefaciens* em tratamento de sementes. BaNCT02 Sulco: *B. amyloliquefaciens* em aplicação em sulco de plantio.

De forma geral, o tratamento via sulco de plantio foi melhor que o tratamento via sementes, isso pode ter ocorrido devido ao volume do produto aplicado. Se considerarmos que foi utilizado 50 kg de sementes de soja por hectare e a dose utilizada no tratamento de sementes foi 4 mL kg<sup>-1</sup>, o volume aplicado foi de 200 mL ha<sup>-1</sup>. Já na aplicação via sulco de plantio, o volume foi de 400 mL ha<sup>-1</sup>.

Araújo et al. (2012) relataram que o tratamento de sementes de soja com *B. subtilis* reduziu em 70% o número de nematoides das galhas em relação ao controle, nível similar ao carbofurano. Outra cepa de *B. subtilis*, aplicada via tratamento de semente e sulco de plantio, também controlou *M. incognita* e *Heterodera glycines* em condições de casa de vegetação (Araújo, et al., 2002; Basyony e Abo-Zaid, 2018). Terefe et al. (2008), avaliaram que a aplicação de *B. firmus* na cultura do tomate reduz em 76,0% o fator de reprodução e em 45,0% o número de ovos.

Não foi observada diferença estatística para as variáveis massa seca de parte aérea e massa fresca de raiz. Logo, a aplicação de *B. amyloliquefaciens* cepa BaNCT02 não promove o crescimento de plantas de soja (Figura 16A e B), tão pouco causou fitotoxicidade (Figura 17) aos 50 DAP. Algumas cepas bacterianas podem interagir com as plantas e induzir o crescimento vegetal, assim como observado em tomateiros tratados com a cepa FZB42 de *B. amyloliquefaciens* (Szilagyi-Zecchin et al, 2015). No entanto, essa característica não é comum a todos as bactérias e

possivelmente a cepa BaNCT02 de *B. amyloliquefaciens* não possui essa habilidade, assim como observado com a cepa de *B. subtilis* em tomateiro (Fernandes et al, 2014).



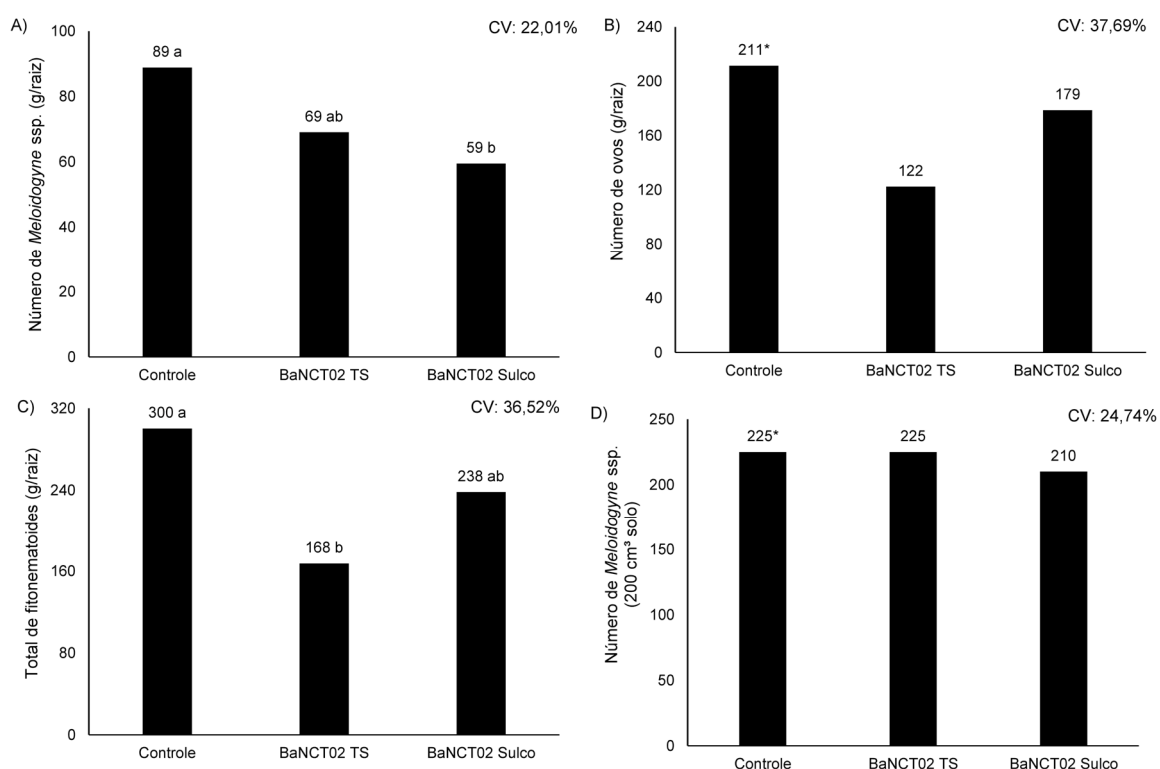
**Figura 16** – Aplicação de *Bacillus amyloliquefaciens* cepa BaNCT02 via tratamento de sementes e sulco de plantio e seu efeito na promoção de crescimento no cultivo da soja cv CZ37B43 IPRO cultivada em casa de vegetação. A) Massa seca de parte aérea (g planta<sup>-1</sup>). B) Massa fresca de raiz (g planta<sup>-1</sup>). \*não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. \*\*Para a variável massa fresca de raiz os dados foram submetidos a transformação pelo método de raiz (y). BaNCT02 TS: *B. amyloliquefaciens* em tratamento de sementes. BaNCT02 Sulco: *B. amyloliquefaciens* em aplicação em sulco de plantio.



**Figura 17** – Efeito da aplicação de *Bacillus amyloliquefaciens* cepa BaNCT02 em tratamento de sementes e sulco de plantio na cultura da soja cv CZ37B43 IPRO, sem efeito de fitotoxicidade, aos 50 dias, cultivada em casa de vegetação. A) Plantas sem tratamento; B) Plantas tratadas com 4 mL kg<sup>-1</sup> de semente; C) Plantas tratadas com 400 mL ha<sup>-1</sup> no sulco de plantio.

## Efeito de *B. amyloliquefaciens* cepa BaNCT02 no controle do nematoide das galhas e produtividade de soja em condições de campo

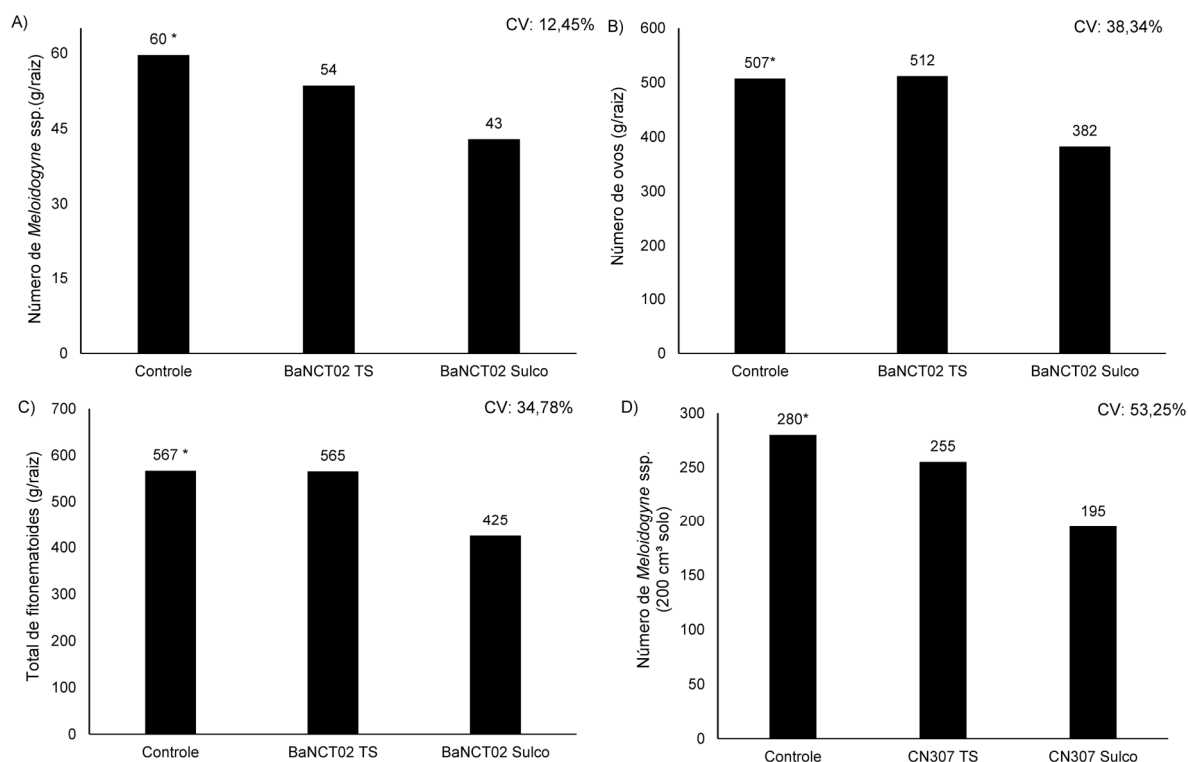
Aos 50 DAP, a aplicação de *B. amyloliquefaciens* cepa BaNCT02 via sulco de plantio reduziu em 33,7% o número de J<sub>2</sub> de *Meloidogyne* sp. g raiz<sup>-1</sup> (Figura 18A). O número total de fitonematoides g raiz<sup>-1</sup> foi reduzido em 44,0% quando a cepa BaNCT02 foi aplicada via tratamento de sementes (Figura 18C). No entanto, nenhum tratamento reduziu o número de ovos em raiz e número de J<sub>2</sub> em 200 cm<sup>3</sup> de solo (Figura 18B e D).



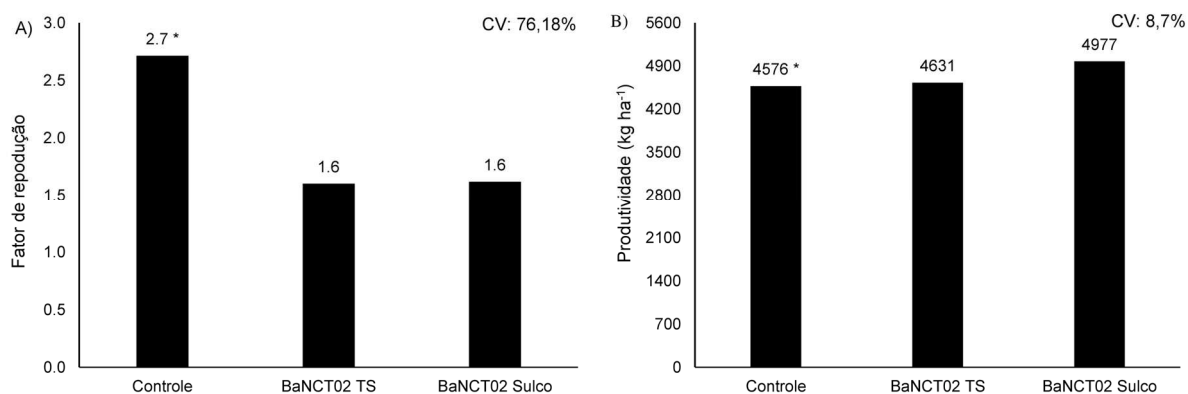
**Figura 18** – Efeito da aplicação de *Bacillus amyloliquefaciens* cepa BaNCT02 em tratamento de sementes e sulco de plantio na cultura da soja cv CZ37B43 IPRO sobre nematoides das galhas (*Meloidogyne* sp.) aos 50 dias de cultivo em campo. A) número de J<sub>2</sub>, B) número de ovos e C) número total de *Meloidogyne* (g raiz<sup>-1</sup>). D) número de J<sub>2</sub> de *Meloidogyne* (200 cm<sup>3</sup> de solo). Médias com letras distintas diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. \* não significativo. BaNCT02 TS: *B. amyloliquefaciens* em tratamento de sementes. BaNCT02 Sulco: *B. amyloliquefaciens* em aplicação em sulco de plantio.

Aos 100 DAP, nenhum tratamento reduziu os números de J<sub>2</sub> no solo e J<sub>2</sub>, ovos e totais de fitonematoides em raiz de soja (Figura 19A, B, C e D). Nesse mesmo sentido, nenhum tratamento reduziu o fator de reprodução de *Meloidogyne* sp. (Figura

20A) ou aumentou a produtividade da cultura da soja (Figura 20B). Para cálculo do fator de reprodução foi realizada a relação da população final (solo + raiz) e inicial, sendo a população inicial estimada antes do plantio, onde se verificou a presença de 480 J<sub>2</sub> de *Meloidogyne* sp. em 200 cm<sup>3</sup> de solo.



**Figura 19** - Efeito da aplicação de *Bacillus amyloliquefaciens* cepa BaNCT02 em tratamento de sementes e sulco de plantio na cultura da soja cv CZ37B43 IPRO sobre nematoides das galhas (*Meloidogyne* sp.) aos 100 dias de cultivo em campo. A) número de J<sub>2</sub>, B) número de ovos e C) número total de *Meloidogyne* (g raiz<sup>-1</sup>). D) número de J<sub>2</sub> de *Meloidogyne* (200 cm<sup>3</sup> de solo). \* não significativo pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. \*\*A figura A, os dados foram submetidos a transformação pelo método de raiz cubica. BaNCT02 TS: *B. amiloliquefaciens* em tratamento de sementes. BaNCT02 Sulco: *B. amyloliquefaciens* em aplicação em sulco de plantio.



**Figura 20** – Efeito da aplicação de *Bacillus amyloliquefaciens* cepa BaNCT02 em tratamento de sementes e sulco de plantio na cultura da soja cv CZ37B43 IPRO sobre *Meloidogyne* sp. cultivada em condições de campo. A) Fator de reprodução de *Meloidogyne* sp. B) Produtividade de cultura da soja (kg ha<sup>-1</sup>). \* médias não diferem entre si pelo teste Tukey a 5%. BaNCT02 TS: *B. amyloliquefaciens* em tratamento de sementes. BaNCT02 Sulco: *B. amyloliquefaciens* em aplicação em sulco de plantio.

Várias pesquisas comprovaram a ação nematicida de espécies de *Bacillus* em condições de casa de vegetação (Araújo, et al., 2002; Fernandes et al, 2014; Szilagyi-Zecchin et al, 2015; Basyony e Abo-Zaid, 2018). Todavia, poucos trabalhos foram conduzidos em campo e, principalmente envolvendo formas de aplicação do antagonista, como realizado nesse trabalho. Na cultura da cana, a aplicação de *B. subtilis* em sulco de plantio foi eficiente na redução da população de *Meloidogyne* e *Pratylenchus*, por três ciclos de cultivo, enquanto que o nematicida químico carbofuran foi eficiente apenas em um ciclo (Mazzuchelli et al., 2020). Em média, o residual dos produtos químicos no solo não supera 90 dias. Por sua vez, uma vez estabelecidos e em condições favoráveis, os agentes de biocontrole podem até induzir a supressividade no solo (Dinardo-Miranda et al., 2008; Bettiol e Morandi, 2009). Além disso, o uso de moléculas químicas atua em microrganismos não alvo, causando assim desequilíbrio na microbiota do solo. Estudos com duas cepas de bactérias, *B. marisflavi* cepa CRB2 e *B. subtilis* CRB7 em combinação, aplicados no tratamento de sementes, demonstraram que houve efeito nematicida contra *M. incognita* em quiabeiro e aumento da produtividade da cultura (Gowda et al. 2022). Paula Filho (2021) relatou que uma cepa da mesma espécie desse estudo (*B. amyloliquefaciens*) reduz o fator de reprodução de *M. incognita* em 37,60%.

## CONCLUSÃO

Conclui-se que a cepa BaNCT02 de *B. amyloliquefaciens* reduz a infecção de *M. incognita* aos 50 e 100 DAP, reduz o fator de reprodução e conseqüentemente incrementa na produtividade da cultura da soja em casa de vegetação. Já em condições de campo, o isolado reduz a infecção de *Meloidogyne* sp. aos 50 DAP.

## REFERÊNCIAS

- ABBASI, M. W.; AHMED, N.; ZAKI, M. J.; SHUAKAT, S. S.; KHAN, D. Potential of *Bacillus* species against *Meloidogyne javanica* parasitizing eggplant (*Solanum melongena* L.) and induced biochemical changes. **Plant And Soil**, Karachi, v. 375, n. 1-2, p. 159-173. 2013.
- ABDEL-SALAM, M. S.; AMEEN, H. H.; SOLIMAN, G. M.; ELKELANY, U. S.; ASAR, A. M. Improving the nematicidal potential of *Bacillus amyloliquefaciens* and *Lysinibacillus sphaericus* against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* using protoplast fusion technique. **Egyptian Journal Of Biological Pest Control**, Giza, v. 28, n. 1. 2018.
- AGROFIT. **Sistemas de agrotóxicos fitossanitários**. Disponível em: <[https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acessado em 04 de maio de 2023.
- ADAM, M.; HEUER, H.; HALLMANN, J. Bacterial Antagonists of Fungal Pathogens Also Control Root-Knot Nematodes by Induced Systemic Resistance of Tomato Plants. **Plos One**, Graz, v. 9, n. 2. 2014.
- ADAMS, R.P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. **Allured Publishing Corporation**, Illinois. 2007.
- ALCANFOR, D.C.; INNECO, R.; COLARES, J.S.; MATTOS, S.H. Controle de nematoides de galhas com produtos naturais. **Horticultura Brasileira**, v. 19, 2001.
- ALEXANDRE, A.R.S. **Bioprospecção de bactérias quitinolíticas e caracterização da atividade da enzima quitinase**. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular). Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Goiás. Goiânia. 2018
- ARAÚJO, E.O.; AMARAL, L.S. **Biocontrole de fitonematoides atualidades de perspectivas**. ed. 1. São Paulo. Editora Dialética. 2021.
- ARAÚJO, F. F.; SILVA, J. F. V.; ARAÚJO, A. S. F. Influência de *Bacillus subtilis* na eclosão, orientação e infecção de *Heterodera glycines* em soja. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 2, p. 197-203, 2002.
- ARAÚJO, F.F.; BRAGANTE, R. J.; BRAGANTE, C. E. Controle genético, químico e biológico de meloidoginose na cultura da soja. **Pesquisa Agropecuária Tropical**. Goiânia – GO. v. 42, p. 220-224, 2012.
- BARRETO, M. M. **Formação de biofilme por Rizobactérias isoladas de plantas do semiárido baiano**. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2009.

BASYONY, A. G.; ABO-ZAID, G. A. Biocontrol of the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*, using an eco-friendly formulation from *Bacillus subtilis*, lab. and greenhouse studies. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, Alexandria, v. 28, n. 1. 2018.

BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. ed. 1. Jaguariúna - SP. Embrapa Meio Ambiente, 2009.

BONETI, J.I.S.; FERRAZ, S. Modificação do método de Hussey e Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.6, p. 553, 1981.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. v. 72, p. 248-254. Athens. 1976.

BURKETT-CADENA, M.; KOKALIS-BURELLE, N.; LAWRENCE, K. S.; VAN SANTEN, E.; KLOPPER, J. W. Suppressiveness of root-knot nematodes mediated by rhizobacteria. **Biological Control**, Auburn, v. 47, n. 1, p. 55-59. 2008.

CAMPOS, V. P.; PINHO, R. S. C.; FREIRE, E. S. Volatiles produced by interacting microorganisms potentially useful for the control of plant pathogens. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras - MG, v. 34, n. 3, p. 525-535. 2010.

CARVALHO, A.M.X.; MENDES, F.Q.; MENDES, F.Q.; TAVARES, L.F. SPEED Stat: a free, intuitive, and minimalist spreadsheet program for statistical analyses of experiments. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, 20(3): e327420312, 2020. <http://dx.doi.org/10.1590/1984-70332020v20n3s46>

CAWOY, H.; BETTIOL, W.; FICKERS, P.; ONGE, M. *Bacillus*-Based Biological Control of Plant Diseases. **Pesticides In The Modern World - Pesticides Use And Management**, Liège, v. 1. 2011.

CHARNEY, J.; TOMARELLI, R.M. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. **Journal of Biological Chemistry**. v 170, n. 23, p. 501-505, [S.L.] 1947.

CHEN, S.Y. D.W. DICKSON. A Technique for Determining Live Second-stage Juveniles of *Heterodera glycines*. **Jornal of Nematology**. v. 32, p. 117-121. 2000.

DINARDO-MIRANDA, L. L.; PIVETTA, J. P.; FRACASSO, J. V. Influência da época de aplicação de nematicidas em soqueiras sobre as populações de nematóides e a produtividade da cana-de-açúcar. **Bragantia**, Campinas, v. 67, n. 1, p. 179-190. 2008.

ENGELBRECHT, G.; HORAK, I.; VAN RENSBURG, P. J. J.; CLAASSENS, S. *Bacillus*-based bionematicides: development, modes of action and commercialisation. **Biocontrol Science And Technology**, Potchefstroom, v. 28, n. 7, p. 629-653. 2018.

ETSCHMANN, M. M. W.; BLUEMKE, W.; SELL, D., AND SCHRADER, J. Biotechnological production of 2-phenylethanol. **Applied Microbiology And Biotechnology**, Geesthacht, v. 59, n. 1, p. 1-8. 2002.

FABRY, C.F.S.; FREITAS, L.G.; GODINHO, M.M.; NEVES, W.S.; FERRAZ, S. Resistência sistêmica a *Meloidogyne javanica* induzida por *Rhizobium etli*. **Nematologia Brasileira**. Viçosa – MG. v. 31. p.5-9. 2007.

FERREIRA, R.J. **Espécies de *Bacillus* no controle de *Meloidogyne incognita* e *Meloidogyne javanica* in vitro e na cana-de-açúcar**. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal). Universidade estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2015

FERNANDES, R.H.; VIEIRA, B.S.; FUGA, C.A.G.; LOPES, E.A. *Pochonia chlamydosporia* e *Bacillus subtilis* no controle de *Meloidogyne incognita* e *M. javanica* em mudas de tomateiro. **Original Article Bioscience Journal**. Uberlândia, v. 30, n. 1, p. 194-200. 2014.

FERRAZ, S.; FREITAS, L.G.; LOPES, E.A.; DIAS-ARIEIRA, C.R. **Manejo sustentável de fitonematoides**. Universidade Federal de Viçosa – UFV. ed. 1. p. 304. 2010

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

FOURIE, H.; JONES, V. W.; DANEEL, R. K.; DE WAELE, D. Nematology in South Africa: A view from the 21st century. **Switzerland: Springer International**. 2017.

GALBIERI, R.; BELOT, J.L. Nematoides fitoparasitas do algodoeiro nos cerrados brasileiro: Biologia e medidas de controle. **Instituto Mato-grossense do Algodão – IMAmt**. Boletim de P & D, n. 3. Cuiabá. 2016.

GAO, H.; QI, G.; YIN, R.; ZHANG, H.; LI, C.; ZHAO, X. *Bacillus cereus* strain S2 shows high nematicidal activity against *Meloidogyne incognita* by producing sphingosine. **Scientific Reports**, Wuhan, v. 6, n. 1. 2016.

GOWDA, M.T.; MEENA, B.R.; KRISHNAN, N.; MANJUNATH, M.; SELAPERUMAL, C.; RAI, A.B.; SINGH, A.; MANIMURUGAN, C.; PATIL, J.; PANDEY, K.K.; SINGH, J. Antimicrobial peptides producing native *Bacillus* spp. for the management of root-knot nematode *Meloidogyne incognita* infecting okra (*Abelmoschus esculentus* L. Moench). **Biological Control**, Varanasi, v. 171. 2022.

GU, Y.; MO, M.; ZHOU, J.; ZOU, C.; ZHANG, K. Evaluation and identification of potential organic nematicidal volatiles from soil bacteria. **Soil Biology And Biochemistry**, Kunming, v. 39, n. 10, p. 2567-2575. 2007.

HELENA, C.; RITZINGER, S.P.; FANCELLI, M. Manejo integrado de nematoides na cultura da bananeira. **Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical**. Revista Brasileira de Fruticultura. Jaboticabal - SP, v. 28, n. 2, p. 331-338. 2006

HU, H.; CHEN, Y.; WANG, Y.; TANG, Y.; CHEN, S.; YAN, Z. Endophytic *Bacillus cereus* Effectively Controls *Meloidogyne incognita* on Tomato Plants Through Rapid Rhizosphere Occupation and Repellent Action. **Plant Disease**, Nanjing, v. 101, n. 3, p. 448-455. 2017.

HUANG, Y.; XU, C.K.; MA, L.; ZHANG, K.Q.; DUAN, C.Q.; MO, M.H. Characterisation of volatiles produced from *Bacillus megaterium* YFM3.25 and their nematocidal activity against *Meloidogyne incognita*. **European Journal Of Plant Pathology**, Yunnan, v. 126, n. 3, p. 417-422. 2009.

JAMAL, Q.; CHO, J.Y.; MOON, J.H.; MUNIR, S.; ANEES, M.; KIM, K.Y. Identification for the first time of cyclo(d-Pro-I-Leu) Produced by *Bacillus amyloliquefaciens* Y1 as a nematocide for control of *Meloidogyne incognita*. **Molecules**, Gwangju, v. 22, n. 11, p. 1839. 2017.

JENKINS, W. R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant disease reporter**, n. 48, p. 692. New Brunswick. 1964.

KAVAMURA, V.N. **Bactérias associadas as cactáceas da Caatinga: promoção de crescimento de plantas sob estresse hídrico**. Tese (Doutorado em Microbiologia agrícola) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba – SP. 2012.

KIEWNICK, S.; WOLF, S.; WILLARETH, M.; FREY, J. Identification of the tropical root-knot nematode species *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria* using a multiplex PCR assay. **Nematology**, Waedenswil, v. 15, n. 7, p. 891-894. 2013.

LIMA, F. S. O.; CORREA, V. R.; NOGUEIRA, S. R.; SANTOS, P. R. R. Nematodes Affecting Soybean and Sustainable Practices for Their Management. **Soybean - The Basis Of Yield, Biomass and Productivity**, [S.L.], p. 95-110, 3 maio 2017.

LIMA, L.H.C., DE MARCO, J.L.; QUEIROZ, P.R., ULHOA, C.J. FELIX, C.R. Método de purificação de uma endoquitinase de *Trichoderma harzianum* com atividade sobre a parede celular de fungos fitopatogênicos. Brasília: **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 11. p. 32. 2001.

MACHADO, V.; BERLITZ, D.L.; MATSUMURA, A.T.S.; SANTINS, R. de C.M.; GUIMARÃES, A.; SILVA, M.E.; FIUZA, L.M. Bactérias como agentes de controle biológico de fitonematoides. **Oecologia Australis**. v. 16, n. 2, p. 165-182. São Leopoldo – RS. 2012.

MASLER, E. P.; ROGERS, S. T. Effects of cyst components and low temperature exposure of *Heterodera glycines* eggs on juvenile hatching *in vitro*. **Nematology**. v. 13. p. 837-844. 2011.

MAZZUCHELLI, R.C.L.; MAZZUCHELLI, E.H.L.; ARAUJO, F.F. Efficiency of *Bacillus subtilis* for root-knot and lesion nematodes management in sugarcane. **Biological Control**, v. 143, p. 104-185. 2020.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**. v. 31, n. 3, p.426-428, 1959.

MOREIRA, S.I.; SILVEIRA, P.R.; FERREIRA, A.N.; TAVARES, D.G.; DORIGAN, A.F.; RAMOS, G.A.; PINHEIRO, I.C.L.; SOUZA, L.F.A.; ALVES, E. Capítulo 5 – Microscopia eletrônica de varredura. In: **XX Simpósio de Manejo de Doenças de Plantas – Proteção de cultivos**, Lavras - MG. p. 94 – 109. 2022.

MUNIF, A.; HALLMANN, J.; SIKORA, R. A. Induced systemic resistance of selected endophytic bacteria against *Meloidogyne incognita* on tomato. **Applied Biological Sciences**, New York, v. 66, n. 3, p. 663-669, 2001.

NAVES, R. L.; CAMPOS, V. P.; SOUZA, R. M. Filtrados de culturas bacterianas endofíticas na motilidade, mortalidade e eclosão de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne javanica*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 4, p. 384-388. 2004.

NIU, Q.; HUANG, X.; ZHANG, L.; XU, J.; YANG, D.; WEI, K.; NIU, X.; AN, Z.; BENNETT, J.W.; ZOU, C.; YANG, J.; ZHANG, K.Q. A Trojan horse mechanism of bacterial pathogenesis against nematodes. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, Lubbock, v. 107, n. 38, p. 16631-16636. 2010.

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

NUNES, H.T.; MONTEIRO, A.C.; POMELA, A.W.V. Uso de agentes microbianos e químicos para o controle de *Meloidogyne incognita* em soja. **Acta Scientiarum Agronomy**. v.32. p. 403-409. 2010.

OOSTENBRINK, M. **Major characteristics of the relation between nematodes and plants**. Med. Landbouwhogeschool, Wageningen – Países Baixos, 66: p. 3 - 46. 1966.

PADGHAM, J. L.; SIKORA, R. A. Biological control potential and modes of action of *Bacillus megaterium* against *Meloidogyne graminicola* on rice. **Crop Protection**, Guildford, v. 26, n. 7, p. 971-977. 2007.

PAULA FILHO, A. C.; **Utilização de nematicidas biológicos para o controle de nematoide de galhas na cultura da alface**. Dissertação (Mestrado em oleicultura). Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano - Campus Morrinhos. 2021.

PINHO, R. S. C. **Efeito de metabólitos bacterianos em diferentes estádios de *Meloidogyne incognita***. Tese (Doutorado em Fitopatologia). Universidade Federal de Lavras –UFLA. Lavras – MG. 2010.

PRIEST, F.G.; Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. **Bacteriology Reviews**. v. 41. n. 3. p. 711-753. 1977.

RIBEIRO, A. C.; GUIMARÃES, P. T. G.; ALVAREZ, V. H. Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais – 5ª Aproximação. **Comissão de Fertilidade do Solo do Estado de Minas Gerais**. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa – MG. p. 359, 1999.

SANTOS, J. B. **Seleção de estirpes de *Bacillus* spp. tóxicas a *Meloidogyne* spp.** Dissertação (Mestrado em Agronomia). Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2018.

SILVA, J.C.P.; TERRA, W.C.; BARROS, A.F.; CAMPOS, V.P. **Compostos orgânicos voláteis no controle de fitonematoides**. Editora UFLA. Lavras – MG. 2019

SILVA, R.A.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; OLIVARES, F.L. Defesa de plantas contra ataques de fitopatógenos. **EMBRAPA Agrobiologia**, p. 49. Seropédica – RJ. 2008.

SOUZA, C. P.; BURBANO-ROSETO, E.M.; ALMEIDA, B.C.; MARTINS, G.G.; SOUZA, S.R.; CAMPOS, V.P.; PAULA, L.L.; PEDROSO, M.O.; TERRA, W.C. Ethyl Butanoate, Constituent of Cassava Wastewater Volatiloma, a Potential Soil Fumigant Against *Meloidogyne javanica*. **Journal Of Nematology**, Lavras - Mg, v. 54, n. 1. 2022.

SOUZA, C. P.; BURBANO-ROSETO, E.M.; ALMEIDA, B.C.; MARTINS, G.G.; ALBERTINI, L.S.; RIVERA, N.G. Culture medium for isolating chitinolytic bacteria from seawater and plankton. **World Journal Of Microbiology and Biotechnology**, [s.l.], v. 25, n. 11, p.2079-2082, 2009.

SZILAGYI-ZECCHIN, V.J.; MÓGOR, A.F.; RUARO, L.; RÖDER, C. Crescimento de mudas de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) estimulado pela bactéria *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. plantarum FZB42 em cultura orgânica. **Revista de Ciências Agrárias**. v. 38. p. 26-33. 2015.

TEREFE, M.; TEFERA, T.; SAKHUJA, P.K. Effect of a formulation of *Bacillus firmus* on root-knot nematode *Meloidogyne incognita* infestation and the growth of tomato plants in the greenhouse and nursery. **Journal Of Invertebrate Pathology**, Ethiopia, v. 100, n. 2, p. 94-99. 2009.

TIAN, B.; YANG, J.; ZHANG, K.Q. Bacteria used in the biological control of plantparasitic nematodes: populations, mechanism of action, and future prospects. **Microbiology Ecology**. v. 61, p. 197 – 213. 2007.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Original da editora. ed. 12, p. 962. Porto Alegre. 2012.

XU, Y. B.; CHEN, M.; ZHANG, Y.; WANG, M.; WANG, Y. HUANG, Q. B. The phosphotransferase system gene ptsI in the endophytic bacterium *Bacillus cereus* is required for biofilm formation, colonization, and biocontrol against wheat sharp eyespot. **Environmental microbiology**. p. 142-152. 2014.

YAMAGUCHI, M. M. **Produção, Purificação e Caracterização da Quitinase de *Cellulomonas cellulans* Fxx**. Tese (Doutorado Ciência de Alimentos) - Curso de Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

YIN, N.; LIU, R.; ZHAO, J.; KHAN, R.A.A.; LI, Y.; LING, J.; LIU, W.; YANG, Y., XIE, B.; MAO, Z. Volatile Organic Compounds of *Bacillus cereus* Strain Bc-cm103 Exhibit Fumigation Activity against *Meloidogyne incognita*. **Plant Disease**, Beijing, v. 105, n. 4, p. 904 - 911. 2021.

ZERIOUH, H.; VICENTE, A.; PEREZ-GARCIA, A.; ROMERO, D. Surfactin triggers biofilm formation of *Bacillus subtilis* in melon phylloplane and contributes to the biocontrol activity. **Environmental Microbiology**, Málaga, v. 16, n. 7, p. 2196 - 2211. 2013.

ZHAI, Y. L.; SHAO, Z. Z.; CAI, M. M.; ZHENG, L. Y.; LI, G. Y.; HUANG, D.; CHENG, W. L.; THOMASHOW, L.; WELLER, D. M.; YU, Z. N.; ZHANG J. B. Multiple Modes of Nematode Control by Volatiles of *Pseudomonas putida* 1A00316 from Antarctic Soil against *Meloidogyne incognita*. **Frontiers In Microbiology**, France, v. 9. 2018.

WU, W.; ZENG, Y.; YAN, X.; WANG, Z.; GUO, L.; ZHU, Y.; WANG, Y.; HE, X. Volatile Organic Compounds of *Bacillus velezensis* GJ-7 against *Meloidogyne hapla* through Multiple Prevention and Control Modes. **Molecules**, Kunming, v. 28, n. 7, p. 3182. 2023.