

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA**

**JORGE HENRIQUE RESENDE VIEIRA**

**Explorando o potencial genômico de isolados de *Paenibacillus*  
para o controle biológico de fitopatógenos do solo na soja**

**Viçosa — Minas Gerais  
2025**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

**Explorando o potencial genômico de isolados de *Paenibacillus*  
para o controle biológico de fitopatógenos do solo na soja**

Monografia apresentada ao Curso de Ciências  
Biológicas da Universidade Federal de Viçosa  
como requisito para a obtenção do título de  
bacharel em Ciências Biológicas.

Estudante: Jorge Henrique Resende Vieira  
Orientador: Prof. Dr. Mateus Ferreira Santana

Viçosa — Minas Gerais  
2025

JORGE HENRIQUE RESENDE VIEIRA

**Explorando o potencial genômico de isolados de *Paenibacillus*  
para o controle biológico de fitopatógenos do solo na soja**

Monografia apresentada ao Curso de Ciências  
Biológicas da Universidade Federal de Viçosa  
como requisito para a obtenção do título de  
bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovada em 3 de junho de 2025.

Assentimento:

Documento assinado digitalmente  
 JORGE HENRIQUE RESENDE VIEIRA  
Data: 08/07/2025 09:16:55-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Jorge Henrique Resende Vieira  
Autor

Documento assinado digitalmente  
 MATEUS FERREIRA SANTANA  
Data: 08/07/2025 09:35:37-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Dr. Mateus Ferreira Santana  
Orientador

Aos meus pais, Dalva e Reinaldo, e aos meus  
irmãos, Otávio e Fábio, por todo amor, apoio e  
inspiração ao longo de minha jornada.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço, primeiramente, à minha família e aos meus amigos, pelo apoio, carinho e inspiração durante mais esta etapa.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Mateus Ferreira Santana, por sua dedicação, paciência e todo apoio técnico e científico prestado.

À toda a equipe do Laboratório de Genética Molecular de Microrganismos e do Laboratório de Controle Biológico de Fitonematoides da Universidade Federal de Viçosa, pela estrutura, apoio e ensinamentos durante o desenvolvimento desta pesquisa.

Às agências de fomento, CAPES, CNPq e FAPEMIG, pelo financiamento que tornou este trabalho possível.

Ao curso de Ciências Biológicas — Bacharelado e à Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade de fazer o curso.

## RESUMO

VIEIRA, Jorge Henrique Resende, Universidade Federal de Viçosa, junho de 2025. **Explorando o potencial genômico de isolados de *Paenibacillus* para o controle biológico de fitopatógenos do solo na soja.** Orientador: Mateus Ferreira Santana.

A soja é uma das culturas mais importantes do mundo, mas seu cultivo é severamente impactado por fitopatógenos do solo, cujas infecções comprometem a produtividade. O manejo convencional com agroquímicos enfrenta crescentes restrições ambientais e econômicas, evidenciando a necessidade de estratégias sustentáveis como o controle biológico. Neste sentido, o presente estudo teve como objetivo investigar o potencial biotecnológico de seis isolados do gênero *Paenibacillus* no controle de *M. javanica* e fungos fitopatogênicos na soja, combinando abordagens genômicas, fenotípicas e funcionais. As bactérias foram isoladas de solos da Serra da Canastra (MG) e do Cerrado goiano. A análise genômica incluiu o sequenciamento, montagem e anotação dos genomas, análise filogenômica, estrutura do pangenoma e prospecção de genes de interesse biotecnológico (CAZymes, BGCs, genes PGP e de biocontrole). Ensaios *in vitro* avaliaram a produção de quitinases e proteases e o antagonismo contra fungos fitopatogênicos. Adicionalmente, um ensaio *in vivo* em soja testou a eficácia dos isolados na redução da infestação por *M. javanica*. Os resultados revelaram diversidade filogenômica e funcional entre os isolados, com destaque para *P. elgii* 240B, *P. polymyxa* ANTI e *P. elgii* P10A, que demonstraram atividade supressiva de fitopatógenos. O isolado 240B obteve a maior redução de galhas (51,40%) em raízes de soja. Os isolados P10A e ANTI inibiram significativamente o crescimento de *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum*. Geneticamente, esses isolados apresentaram alta diversidade de BGCs, CAZymes e genes relacionados à promoção de crescimento vegetal. Conclui-se que o gênero *Paenibacillus* representa uma potencial fonte de agentes de biocontrole contra patógenos do solo. As evidências genômicas e fenotípicas sustentam a viabilidade do uso desses isolados como bioinoculantes na soja.

Palavras-chave: bioprospecção; genômica comparativa; patógenos do solo; antagonismo microbiano.

## SUMÁRIO

|                                                                       |           |
|-----------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>INTRODUÇÃO</b>                                                     | <b>1</b>  |
| <b>MATERIAL E MÉTODOS</b>                                             | <b>3</b>  |
| Extração de DNA, sequenciamento, montagem e anotação genômica         | 3         |
| Análise filogenômica                                                  | 3         |
| Análise do pangenoma                                                  | 4         |
| Prospecção genômica de caracteres de interesse biotecnológico         | 5         |
| Cultivo e padronização dos isolados                                   | 5         |
| Ensaio <i>in vitro</i> de produção de quitinase e protease            | 6         |
| Ensaio <i>in vitro</i> de antagonismo contra fungos fitopatogênicos   | 6         |
| Ensaio <i>in vivo</i> de biocontrole de <i>M. javanica</i> na soja    | 7         |
| Análise de dados                                                      | 8         |
| <b>RESULTADOS</b>                                                     | <b>8</b>  |
| Qualidade das sequências e montagem dos genomas                       | 8         |
| Análise filogenômica                                                  | 9         |
| Estrutura do pangenoma                                                | 11        |
| Enzimas ativas sobre carboidratos (CAZymes)                           | 13        |
| Clusters de biossíntese de metabólitos secundários (BGCs)             | 15        |
| Genes relacionados ao biocontrole e à promoção de crescimento vegetal | 16        |
| Produção <i>in vitro</i> de enzimas hidrolíticas                      | 17        |
| Atividade antagonista <i>in vitro</i> contra fungos fitopatogênicos   | 18        |
| Biocontrole <i>in vivo</i> de <i>M. javanica</i> na soja              | 20        |
| <b>DISCUSSÃO</b>                                                      | <b>21</b> |
| <b>CONCLUSÃO</b>                                                      | <b>24</b> |
| <b>REFERÊNCIAS</b>                                                    | <b>25</b> |

## INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merr.) é uma das culturas agrícolas mais relevantes no cenário global, ocupando cerca de 6% das áreas cultiváveis do mundo, com produção estimada em mais de 370 milhões de toneladas anualmente (Singer *et al.*, 2023; Hamza *et al.*, 2024). Essa leguminosa é fundamental para a segurança alimentar, visto que fornece aproximadamente 70% da proteína vegetal utilizada na produção animal e cerca de 29% do óleo vegetal consumido mundialmente (Lin *et al.*, 2022). Economicamente, Brasil, Estados Unidos e a Argentina lideram a produção, respondendo juntos por mais de 80% do total global (Islam *et al.*, 2022).

A produtividade da soja, no entanto, é frequentemente comprometida pela ocorrência de pragas e doenças (Savary *et al.*, 2019), em especial por nematoides (Bernard; Egnin; Bonsi, 2017) e fungos do solo (El-Baky; Amara, 2021). Entre os nematoides fitoparasitas, destacam-se as espécies do gênero *Meloidogyne* Göldi, 1887, principalmente *M. arenaria*, *M. incognita*, *M. javanica* e *M. hapla*, devido à sua ampla distribuição, diversidade de hospedeiros e agressividade (Moens *et al.*, 2009; Jones *et al.*, 2013). Essas espécies induzem a formação de galhas nas raízes e prejudicam a absorção de água e nutrientes, reduzindo o vigor e a produtividade (Strajnar *et al.*, 2011; Favery *et al.*, 2016; Castanheira *et al.*, 2021). Em particular, *M. javanica* é uma das espécies mais comuns e economicamente importantes, frequentemente associada a grandes perdas no cultivo da soja (Mazzetti *et al.*, 2019).

Entre os principais fungos fitopatogênicos do solo, destacam-se *Fusarium oxysporum*, *F. equiseti*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum*, reconhecidos por sua ampla distribuição, capacidade de sobrevivência no solo por meio de estruturas de resistência e impacto negativo, como murchas, podridões, tombamentos e até a morte de plantas diversas culturas agrícolas (Ajayi-Oyetunde; Bradley, 2018; Husaini; Sakina; Cambay, 2018; Naeem *et al.*, 2019; Hossain *et al.*, 2023).

O manejo de fitopatógenos baseia-se majoritariamente no uso de nematicidas e fungicidas químicos, além de práticas culturais específicas (Chen; Li; Song, 2020; El-Baky; Amara, 2021). Entretanto, tais estratégias apresentam limitações, como custos elevados, impactos ambientais negativos, toxicidade sobre organismos não-alvo e restrições legais ao uso de moléculas ativas (Pires *et al.*, 2022; Ayaz *et al.*, 2024). Nesse contexto, o controle biológico surge como alternativa sustentável (Migunova; Sasanelli, 2021; Pires *et al.*, 2022; Ayaz *et al.*, 2024; Yadav *et al.*, 2025), sendo explorado com sucesso em vários

microrganismos, como fungos do gênero *Trichoderma* e as espécies *Pochonia chlamydosporia* e *Purpureocillium lilacinum* (Poveda; Abril-Urias; Escobar, 2020; Ayaz *et al.*, 2024), e bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* (Xiang *et al.*, 2017; Abd-El-Khair *et al.*, 2019; Rani *et al.*, 2022; Tian *et al.*, 2022).

Entre os agentes biológicos promissores para o controle de doenças em plantas, bactérias do gênero *Paenibacillus* têm ganhado destaque pela produção de metabólitos secundários com atividade antimicrobiana, enzimas hidrolíticas (como quitinases, proteases e glucanases) e compostos que induzem resistência sistêmica em plantas (Grady *et al.*, 2016; Dobrzyński; Nازیębło, 2024). Além de suprimir fitopatógenos, essas bactérias também promovem o crescimento vegetal por meio da produção de fitormônios, fixação biológica de nitrogênio e solubilização de fosfato (Li *et al.*, 2023). Estudos demonstram sua eficácia contra patógenos como *F. oxysporum* (Zhai *et al.*, 2021; Elbouazaoui *et al.*, 2022) e *M. incognita* (Singh; Wesenael, 2022; Shi *et al.*, 2024). Apesar disso, o potencial genético de linhagens específicos de *Paenibacillus* para o controle de *M. javanica* em soja ainda é pouco explorado.

Nesse contexto, a prospecção genômica tem se consolidado como uma ferramenta poderosa para a descoberta e seleção de microrganismos com potencial biotecnológico, permitindo a identificação de genes relacionados à produção de compostos bioativos, enzimas e outros fatores de interesse agrícola (Maumela *et al.*, 2024). Essa abordagem possibilita uma seleção mais rápida e eficiente de bactérias promissoras para o controle biológico de doenças, contribuindo para a redução do uso de defensivos químicos e promovendo sistemas agrícolas mais sustentáveis (Köhl; Kolnaar; Ravensberg, 2019).

Diante desse cenário, o presente trabalho teve como objetivo realizar a prospecção genômica de seis isolados de *Paenibacillus*, visando à identificação de características genéticas associadas ao controle biológico de fitopatógenos do solo na cultura da soja. A partir dessa caracterização, buscou-se contribuir para o desenvolvimento de estratégias inovadoras e sustentáveis de manejo de fitonematoides e outros patógenos em sistemas agrícolas.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Extração de DNA, sequenciamento, montagem e anotação genômica

Seis isolados do gênero *Paenibacillus* pertencentes à bacterioteca do Laboratório de Genética Molecular de Microrganismos (LGMM/UFV) foram utilizados neste estudo. Destas bactérias, cinco foram isoladas a partir de amostras de solo não rizosférico coletadas na região da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil (20° 46' 1,2" S; 42° 52' 10,2" W). O sexto isolado bacteriano já havia sido descrito em um estudo anterior (Gonçalves *et al.* 2023) e incluído neste trabalho devido ao seu potencial biotecnológico previamente demonstrado.

A extração do DNA genômico foi realizada utilizando o *kit* Wizard® (Promega Corporation), conforme as instruções do fabricante, a partir de culturas puras em fase exponencial de crescimento. A qualidade e a concentração do DNA foram avaliadas por espectrofotometria em NanoDrop™ 2000/2000c (Thermo Fisher Scientific Inc.), enquanto a integridade foi verificada em gel de agarose a 0,8%. O sequenciamento foi conduzido na plataforma MiSeq™ (Illumina Inc.), com geração de leituras pareadas de curta extensão. As *reads* brutas foram avaliadas quanto à qualidade utilizando o *software* FastQC (Andrews, 2010), e as etapas de filtragem e remoção de adaptadores foram realizadas com o Trimmomatic (Bolger; Loshe; Usadel, 2014). A montagem dos genomas foi conduzida com o SPAdes (Bankevich *et al.*, 2012), e a qualidade das montagens foi avaliada por meio do *software* QUAST (Mikheenko *et al.*, 2023) e CheckM (Parks *et al.*, 2015). A anotação funcional foi realizada com o Prokka (Seemann, 2014), e a classificação taxonômica baseada em genoma foi obtida utilizando o GTDB-Tk (Chaumeil *et al.*, 2020).

### Análise filogenômica

Para confirmar a anotação taxonômica, a análise filogenômica foi conduzida com base na comparação de genomas completos dos seis isolados bacterianos e de genomas de referência do gênero *Paenibacillus*, disponíveis no banco de dados NCBI (Sayers *et al.*, 2025). Inicialmente, foram selecionados 287 genomas de referência, os quais foram submetidos à avaliação de qualidade utilizando o *software* CheckM (Parks *et al.*, 2015), com o comando *tree\_qa*. Após a análise, 80 genomas que apresentaram baixa completude ou alta contaminação foram excluídos, resultando em um conjunto final de 207 genomas de alta qualidade. Em seguida, foram extraídos 43 genes marcadores de cópia única a partir das sequências selecionadas, os quais serviram como base para a inferência filogenética. Esses

genes marcadores foram alinhados, concatenados e utilizados na reconstrução de uma árvore filogenética pelo método de máxima verossimilhança, empregando o *software* IQ-TREE v. 1.6.11 (Minh *et al.*, 2020). Foram utilizados os parâmetros -m TEST -bb 1000, que realizam a seleção automática do melhor modelo de substituição e avaliação do suporte estatístico por 1000 réplicas de *bootstrap*. Como grupo externo, foi incluído o genoma de *Bacillus velenzensis* FZB42, permitindo o enraizamento da árvore e melhor definição das relações evolutivas entre os isolados analisados. A árvore filogenética resultante foi visualizada e anotada na plataforma iTOL (Letunic; Bork, 2024), na qual foram incorporadas informações complementares, tais como tamanho do genoma, conteúdo GC, fonte de isolamento e número de agrupamentos de genes biossintéticos (*biosynthetic gene clusters* — BGCs). Esses dados foram representados por meio de codificações visuais, permitindo uma interpretação mais abrangente dos aspectos genéticos e ecológicos associados a cada isolado.

### **Análise do pangenoma**

A análise do pangenoma foi realizada para identificar genes compartilhados (*core*) e exclusivos (acessórios ou únicos) entre os genomas analisados. Foram utilizadas sequências proteicas previamente anotadas, no formato FASTA, como entrada para a *pipeline* Bacterial Pan Genome Analysis (BPGA) v. 1.3 (Chaudhari; Gupta; Dutta, 2016). Para a formatação dos agrupamentos de proteínas ortólogas, foi adotado um limiar de identidade de 70%, o qual representa a porcentagem mínima de similaridade entre sequências para serem consideradas pertencentes à mesma família gênica. O pangenoma foi categorizado automaticamente pelo BPGA em três compartimentos: genes *core* (presentes no genoma de todos os isolados), genes acessórios (presentes em dois ou mais genomas, mas não em todos) e genes únicos (exclusivos de um único genoma). A classificação funcional das famílias gênicas foi realizada com base nos bancos de dados COG (Clusters of Orthologous Groups) e KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), permitindo a associação dos diferentes grupos de genes a funções biológicas e metabólicas específicas. A dinâmica do pangenoma foi avaliada com base na Lei de Heaps, por meio do ajuste da equação  $n = um \cdot x^b$  (Tettelin *et al.*, 2008), na qual  $n$  representa o número cumulativo de genes e  $x$  o número de genomas analisados, sendo  $um$  e  $b$  parâmetros ajustáveis. Valores de  $0 < b < 1$  indicam um pangenoma aberto, ou seja, com potencial contínuo de aquisição de novos genes com a adição de mais genomas, enquanto valores de  $b \leq 0$  indicam um pangenoma fechado. A visualização dos resultados foi realizada a partir de gráficos gerados automaticamente pela própria *pipeline*:

curvas de refração do pangenoma e do genoma *core* e distribuições funcionais das famílias gênicas com base nos bancos de dados COG e KEGG, apresentadas por compartimento gênico. Esses gráficos permitem a caracterização da diversidade genômica, bem como a avaliação da distribuição funcional do potencial adaptativo dos isolados analisados.

### **Prospecção genômica de caracteres de interesse biotecnológico**

A prospecção *in silico* de genes relacionados ao biocontrole e promoção de crescimento vegetal foi conduzida a partir dos genomas previamente anotados, utilizando diferentes ferramentas especializadas para a identificação de famílias gênicas de interesse. A busca por enzimas ativas sobre carboidratos (CAZymes) foi realizada com a ferramenta dbCAN3 (Zheng *et al.*, 2023), com os bancos de dados HMMER ( $e\text{-value} = 1,0 \cdot 10^{-15}$ , cobertura  $> 0,35$ ) e CAZy ( $e\text{-value} = 1,0 \cdot 10^{-102}$ ). Para a detecção de genes associados à produção de metabólitos secundários bioativos, como lipopeptídeos, poliquetídeos e compostos antimicrobianos, foi utilizada a plataforma antiSMASH v. 7.1.0 (Blin *et al.*, 2023). Adicionalmente, genes relacionados à promoção de crescimento vegetal (PGP) e ao biocontrole, incluindo genes de produção de sideróforos, resistência a estresses abióticos e fatores de interação planta-microrganismo, foram identificados com o auxílio da ferramenta PGPg\_finder (Pellgrinetti *et al.*, 2024).

### **Cultivo e padronização dos isolados bacterianos**

Os isolados utilizados nos experimentos *in vitro* e *in vivo* foram cultivadas em caldo de soja tríptica (composição em 1 L de água destilada: 15,0 g de peptona de caseína; 5,0 g de peptona de soja; 5,0 g. Autoclavado a 121 °C, por 20 minutos), a 28 °C e sob agitação constante de 180 rpm, por 24 a 72 horas, a depender do tempo de crescimento das bactérias. As suspensões bacterianas foram centrifugadas a 9000 rpm, a 4 °C, por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e os *pellets* foram ressuspensos em solução salina (NaCl, 0,85%). Em seguida, para os ensaios *in vitro* de antagonismo contra fungos fitopatogênicos e biocontrole *in vivo* de *M. javanica* na soja, as suspensões bacterianas foram padronizadas a uma densidade óptica de aproximadamente 0,55 ( $\sim 10^8$  UFC/mL), com o auxílio de um espectrofotômetro UV-Vis, na faixa de 600 nm.

### **Ensaio *in vitro* de produção de quitinase e protease**

Os ensaios *in vitro* para detecção da produção de quitinase e protease pelos isolados bacterianos foram realizados em meios sólidos específicos. Para a atividade quitinolítica, as bactérias foram inoculadas em microgotas de 20 µL em placas contendo meio com 1% de quitina coloidal (composição em 1 L de água destilada: 6,0 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3,0 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,0 g de NH<sub>4</sub>Cl, 0,5 g de NaCl, 0,005 g de extrato de levedura, 15,0 g de ágar bacteriológico e 10,0 g de quitina coloidal; com pH ajustada para 7,0 e o meio autoclavado a 121 °C por 20 minutos) (Shivalee *et al.*, 2016) e incubadas a 28 °C por 5 dias. A quitina coloidal foi preparada por hidrólise ácida da quitina comercial, seguida de lavagem e armazenamento a 4 °C, conforme Demain e Solomon (1986). A atividade enzimática foi indicada pela formação de halos claros ao redor das colônias após adição de solução de Lugol. Para a detecção de protease, utilizou-se o meio ágar-leite desnatado, preparado conforme descrito por Pailin *et al.* (2001), com adaptações. Inicialmente, 10 g de leite em pó desnatado foram diluídos em 500 mL de água destilada, sendo a mistura autoclavada a 110 °C por 10 minutos. Separadamente, 15 g de ágar foram dissolvidos em 500 mL de água destilada e autoclavados a 121 °C. Após o resfriamento, ambas as soluções foram combinadas e vertidas em placas de Petri. As amostras foram incubadas nas mesmas condições, e a atividade proteolítica foi avaliada após 72 horas pela presença de halos de lise ao redor das colônias. A atividade enzimática foi avaliada qualitativamente, com base na observação de zonas claras em ambos os ensaios. Utilizou-se o meio sem bactéria como controle negativo para ambos os experimentos.

### **Ensaio *in vitro* de antagonismo contra fungos fitopatogênicos**

O ensaio *in vitro* de antagonismo foi realizado para avaliar a capacidade das bactérias em inibir o crescimento dos fungos fitopatogênicos *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* CCF184, *F. equiseti* CCF422, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum*, cedidos pelo Laboratório de Micologia e Etiologia de Doenças Fúngicas de Plantas (MICOLAB/UFV). Os fungos foram previamente cultivados em placas de Petri contendo meio BDA (batata dextrose-ágar) e incubados a 25 °C até que o micélio ocupasse toda a superfície da placa. Para o teste de antagonismo, uma alça da cultura bacteriana foi inoculada em uma extremidade da placa contendo BDA, enquanto um disco de micélio fúngico (aproximadamente 5 mm de diâmetro), retirado da borda do crescimento ativo, foi colocado na extremidade oposta, conforme descrito em Islam *et al.* (2018). As placas foram incubadas a 25 °C, e a avaliação

foi realizada assim que o controle negativo (sem bactéria) cobriu completamente a placa. Nesta etapa, foi medido o raio de crescimento do fungo em direção à bactéria. A inibição de crescimento foi calculada comparando-se o crescimento micelial na presença da bactéria com o crescimento do respectivo controle pela seguinte fórmula: 
$$\text{Inibição de crescimento (\%)} = \frac{R_c - R_t}{R_c} \times 100$$
, no qual  $R_c$  representa o raio do crescimento no controle e  $R_t$  o raio no tratamento (Sultana; Hossain, 2022). Adotou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, com sete tratamentos e três repetições por tratamento.

### **Ensaio *in vivo* de biocontrole de *M. javanica* na soja**

A população de *M. javanica* utilizada neste estudo foi isolada de amostras de solo coletadas em áreas de cultivo de soja infestadas, localizadas na região de Viçosa, Minas Gerais, Brasil (20° 45' 17" S; 42° 52' 57" O). Os inóculos foram fornecidos pelo Laboratório de Controle Biológico de Fitonematoides (BIONEMA/UFV). A manutenção da população foi realizada em plantas suscetíveis de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L. 'Santa Cruz Kada (Paulista)') cultivadas em vasos contendo solo previamente autoclavado, mantidas em casa de vegetação sob condições controladas (25 °C ± 2 °C, com 16 h de luz). Para a padronização dos inóculos, os ovos foram extraídos por meio de um método destrutivo, envolvendo a trituração das raízes infestadas em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 0,4–0,5% e retenção em uma peneira de 200 *meshes*, acoplada a outra de 500 *meshes*, conforme protocolo descrito por Boneti e Ferraz (1981). A suspensão de ovos foi quantificada sob microscópio óptico (Olympus® CX33), e a concentração de inóculo foi ajustada para 1000 ovos/mL.

O ensaio *in vivo* de biocontrole foi conduzido em condições controladas (25 °C ± 2 °C, com 16 h de luz) utilizando plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merr.), cultivar BRS 7981 IPRO, suscetível à infestação por *M. javanica*. As sementes foram desinfestadas com gás cloro a 6% e submetidas à microbiolização por imersão em 5 mL de suspensão bacteriana por 1 hora. Após a secagem em condições estéreis, as sementes foram semeadas em vasos de 2 L contendo uma mistura autoclavada de solo e areia (1:1, v/v). A inoculação com *M. javanica* foi realizada 10 dias após a germinação, aplicando-se 2000 ovos (2 mL de inóculo) por planta, diretamente em sulcos na base do caule. Durante o experimento, as plantas foram adubadas semanalmente com fertilizante Peters® (1 g/L de água). O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado, com sete tratamentos e seis repetições por tratamento, sendo um deles uma testemunha (sementes tratadas somente com água).

As avaliações foram conduzidas 46 dias após a inoculação, abrangendo parâmetros de crescimento vegetal (massa seca da raiz) e de infestação nematoide (densidades de galhas e ovos por grama de raiz e percentual de redução pela seguinte fórmula:  $Redução (\%) = 1 - \frac{Galhas/g \text{ de raiz seca do tratamento}}{Galhas/g \text{ de raiz seca da testemunha}} \times 100$ . Para a quantificação de ovos, as raízes infectadas foram submetidas a um método não destrutivo, adaptação do protocolo de Hussey e Barker (1973), com uso de solução de hipoclorito de sódio a 0,4–0,5% sob agitação de 180 rpm por 10 minutos. As suspensões de ovos obtidas foram retidas em uma peneira de 200 *meshes*, acoplada a outra de 500 *meshes*, e quantificadas sob microscópio óptico (Olympus® CX33).

### **Análise de dados**

A análise estatística dos dados foi realizada visando avaliar as diferenças significativas entre os tratamentos avaliados. Inicialmente os dados foram submetidos à verificação dos pressupostos de normalidade e homogeneidade de variâncias. A normalidade dos resíduos foi avaliada por meio do teste de Shapiro-Wilk, enquanto a homogeneidade de variâncias foi verificada pelo teste de Levene. Quando necessário, transformações logarítmicas foram aplicadas para atender aos pressupostos dos modelos lineares.

A análise de variância (ANOVA) foi conduzida para identificar possíveis diferenças significativas entre os tratamentos. Nos casos em que foram detectadas diferenças estatisticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ), as médias foram comparadas utilizando o teste de Tukey ou Duncan a 5% de probabilidade.

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* R (v. 4.3.1; R Core Team, 2023).

## **RESULTADOS**

### **Qualidade das sequências e montagem dos genomas**

A montagem dos genomas gerou entre 26 e 313 *contigs* por genoma, com tamanho variando de 6,022 Mb a 8,074 Mb, conteúdo GC entre 45,6% e 53,1%, e índices de completude superiores a 99,68%, com baixa contaminação (inferior a 0,84%) (**Tabela 1**).

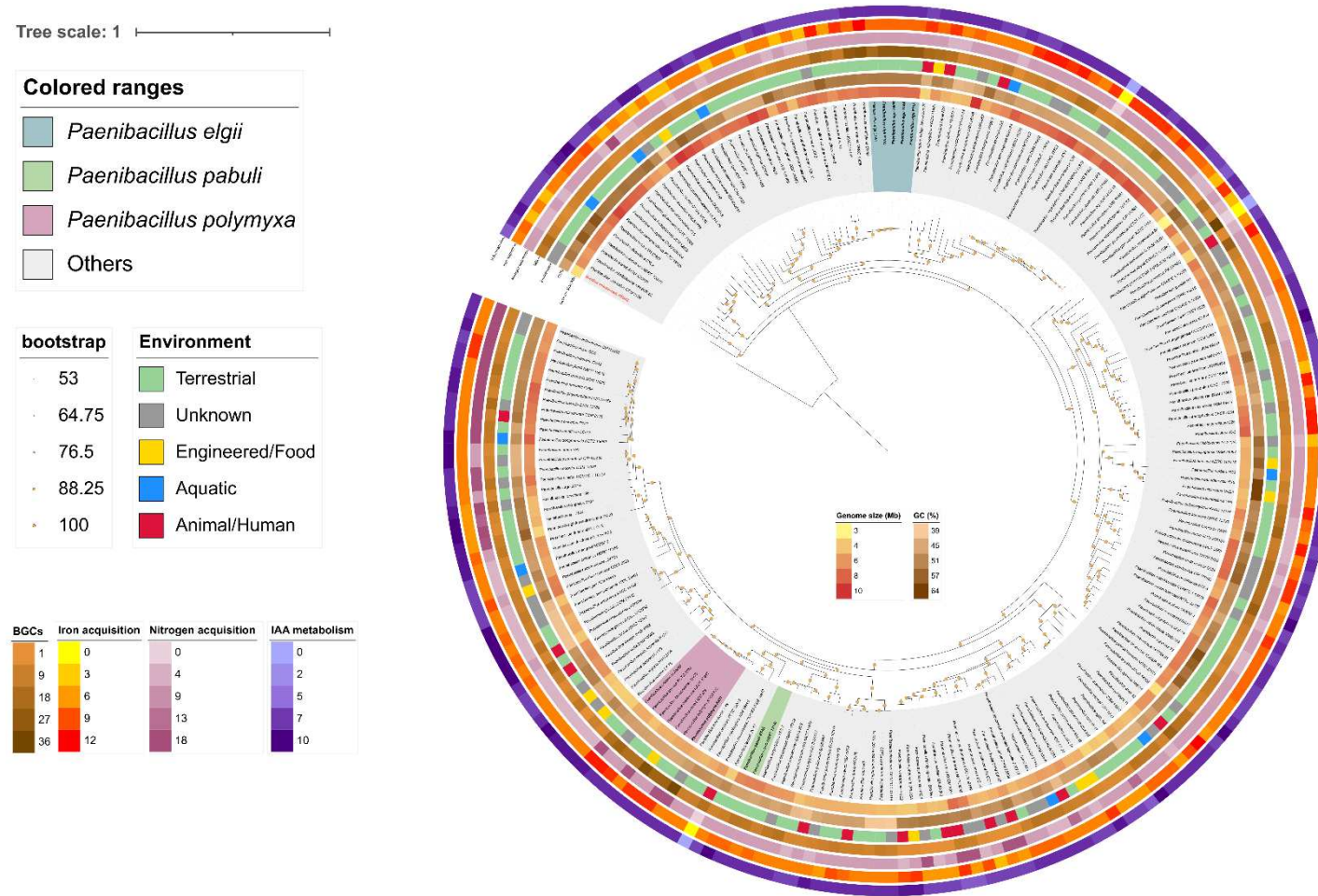
**Tabela 1.** Estatísticas de montagem e qualidade dos genomas dos isolados.

| Isolado | N.º de contigs | Tamanho do genoma (Mb) | N50 (kb) | GC (%) | Compleitude (%) | Contaminação (%) |
|---------|----------------|------------------------|----------|--------|-----------------|------------------|
| 114A    | 303            | 8,074                  | 326,258  | 53,11  | 99,68           | 0,84             |
| 240B    | 284            | 8,069                  | 333,074  | 53,11  | 99,68           | 0,84             |
| ANTI    | 26             | 6,023                  | 374,829  | 45,58  | 99,85           | 0,00             |
| E14A    | 176            | 7,057                  | 815,017  | 46,36  | 99,85           | 0,37             |
| P10A    | 252            | 8,067                  | 333,050  | 53,11  | 99,68           | 0,84             |
| P11A    | 255            | 8,066                  | 377,643  | 53,11  | 99,68           | 0,84             |

### Análise filogenômica

A árvore filogenômica revelou a formação de três clados principais, com suporte de *bootstrap* superior a 83%, evidenciando a robustez da inferência. Os isolados P10A, 240B, 114A e P11A agrupam-se com *P. elgii*, enquanto o isolado E14A foi alocada junto a *P. pabuli*. Por outro lado, o isolado ANTI posicionou-se em um clado composto por um conjunto de espécies estreitamente relacionadas, incluindo *P. kribbensis*, *P. peoriae*, *P. farroposensis*, *P. brasiliensis*, *P. ottowii* e *P. polymyxa*, indicando relação evolutiva com esse grupo.

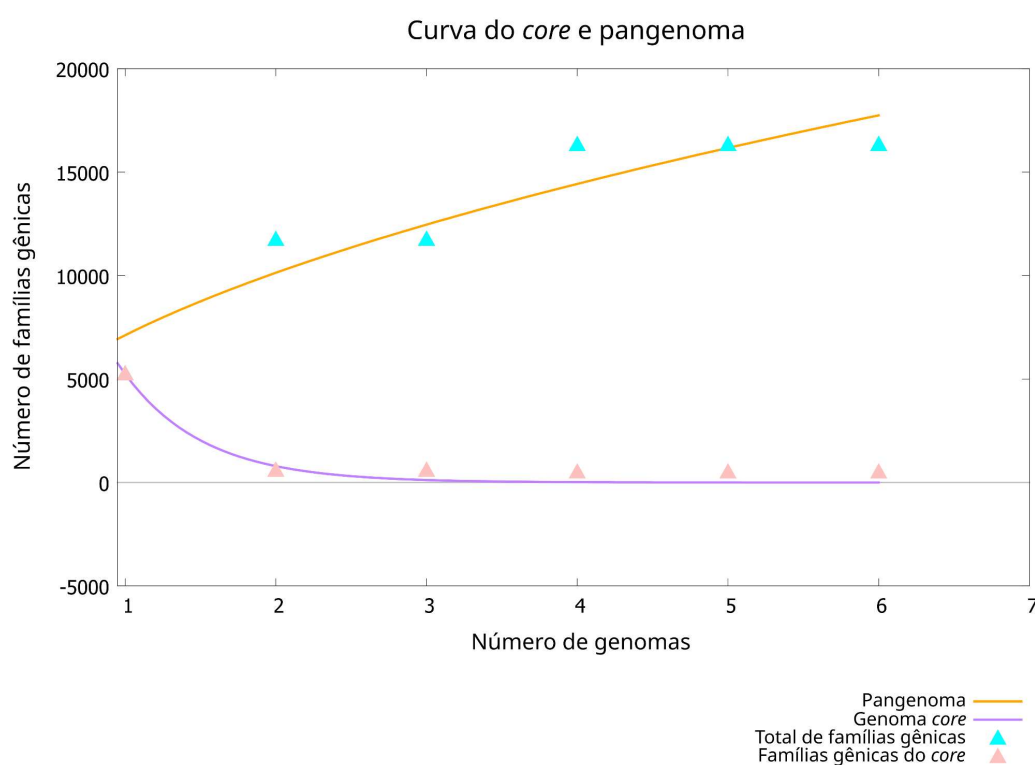
A **Figura 1** apresenta a árvore filogenética resultante, anotada com informações complementares de tamanho genômico, conteúdo GC, fonte de isolamento, número de BGCs e genes de promoção de crescimento vegetal, visualizada na plataforma iTOL.



**Figura 1.** Árvore filogenômica baseada em genomas de referência do gênero *Paenibacillus*. Os clados dos isolados deste estudo estão destacados: em azul, clado de *P. elgii*; em verde, clado de *P. pabuli*; e em rosa, clado referente ao grupo de espécies agrupado com o isolado ANTI. Informações adicionais como tamanho do genoma (Mb), conteúdo GC (%), fonte de isolamento, número de BGCs e alguns PGPGs estão representados por barras coloridas na parte externa da árvore.

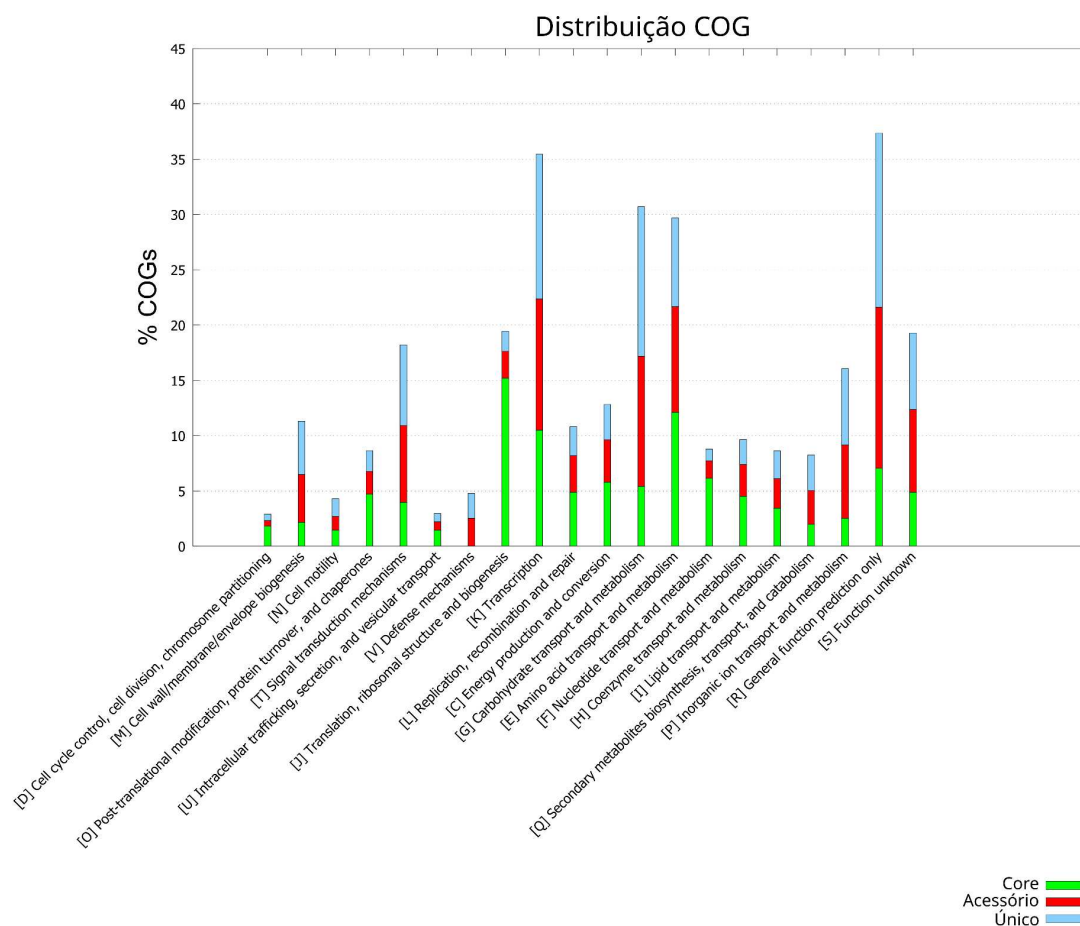
## Estrutura do pangenoma

A análise do pangenoma revelou um total de 7.709 famílias gênicas distintas, considerando os compartimentos *core*, acessório e único. Foram identificados 20 genes no genoma *core*, compartilhados por todos os isolados analisados. O número de genes acessórios variou entre 1.051 e 6.581 por isolado, enquanto os genes únicos apresentaram ampla variação, com destaque para ANTI e E14A, que apresentaram 3.696 e 4.576 genes únicos, respectivamente. A modelagem da dinâmica do pangenoma indicou um valor de  $b = 0,508582$ , caracterizando um pangenoma aberto. Esse resultado sugere que a inclusão de novos genomas ao conjunto analisado provavelmente resultará na incorporação progressiva de novas famílias gênicas ao pangenoma. A curva de refração do pangenoma (**Figura 2**) reforça essa tendência, evidenciando o aumento gradual no número total de famílias gênicas à medida que mais genomas são adicionados ao conjunto.



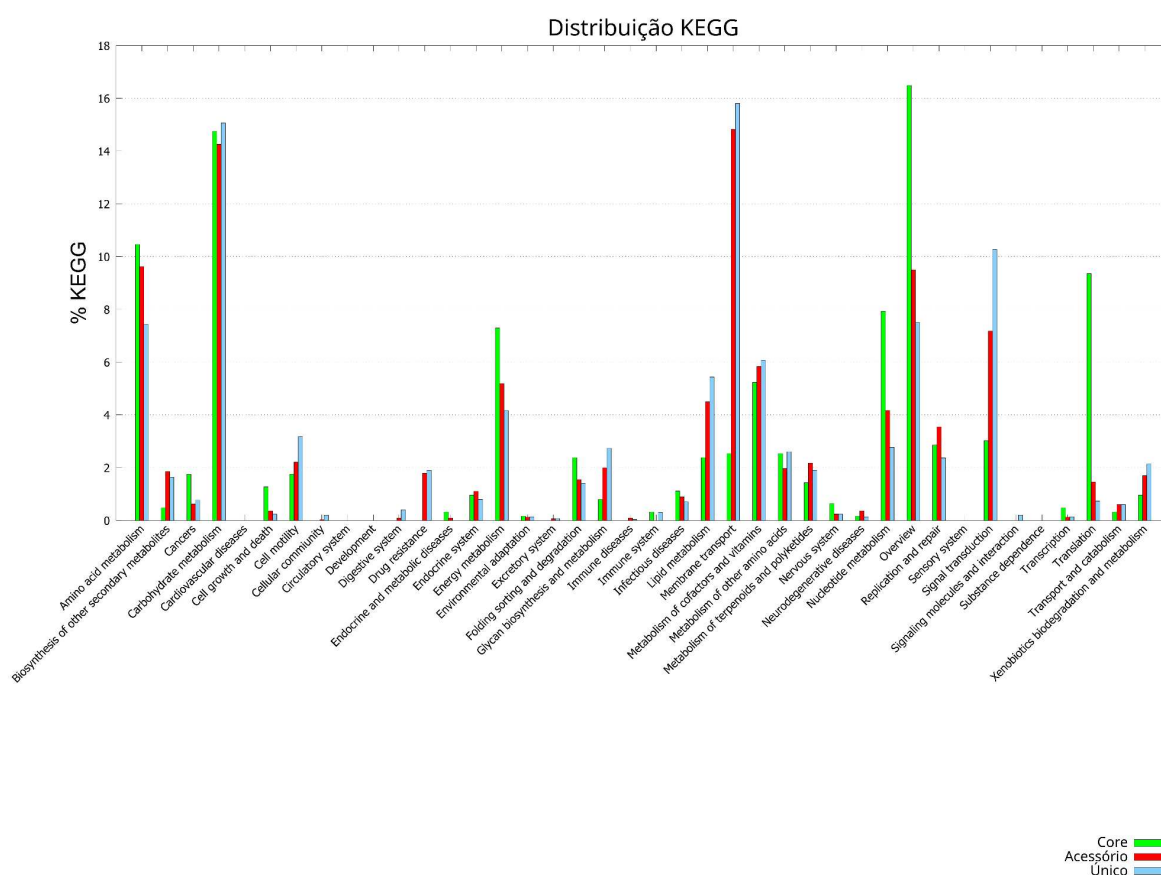
**Figura 2.** Representação gráfica do crescimento do pangenoma (linha laranja) e de redução do genoma *core* (linha roxa) com o acréscimo de novos genomas de *Paenibacillus* analisados. Os triângulos azuis indicam o total de famílias gênicas acumuladas, enquanto os triângulos rosa representam as famílias de genes compartilhados entre todos os genomas (*core*). A tendência indica um pangenoma aberto e um *core* gênico reduzido.

A análise funcional com base nas categorias COG revelou diferenças significativas entre os compartimentos do pangenoma (*core*, acessório e único) (**Figura 3**). Nos genes do genoma *core*, predominam funções relacionadas a processos celulares essenciais, destacando-se tradução, estrutura ribossomal e biogênese, transporte e metabolismo de aminoácidos, transcrição, transporte e metabolismo de nucleotídeos, produção e conversão de energia, e replicação, recombinação e reparo. Nos genes acessórios e únicos, observou-se um aumento nas categorias relacionadas à adaptação ambiental e metabolismo secundário, como: transporte e metabolismo de carboidratos, transdução de sinais, transporte e metabolismo de íons inorgânicos e biossíntese de metabólitos secundários, transporte e catabolismo.



**Figura 3.** Distribuição percentual das categorias de ortologia funcional (COG) para genes *core* (verde), acessórios (vermelho) e únicos (azul) em genomas de *Paenibacillus*. As categorias COG estão organizadas conforme funções celulares, metabólicas e processos de informação. Observa-se uma maior diversidade funcional nos genes únicos e acessórios em comparação aos genes do *core* conservado.

A classificação das famílias gênicas com base nas vias KEGG apresentou um perfil funcional coerente com os resultados de COG (**Figura 4**). Nos genes do genoma *core*, destacaram-se as categorias como metabolismo, processamento de informação genética, e processos celulares, refletindo a conservação de funções básicas para a manutenção celular. Nos compartimentos acessórios e únicos, houve enriquecimento em funções relacionadas a processamento de informação ambiental, biossíntese de metabólitos secundários, adaptação ambiental, e transdução de sinal.



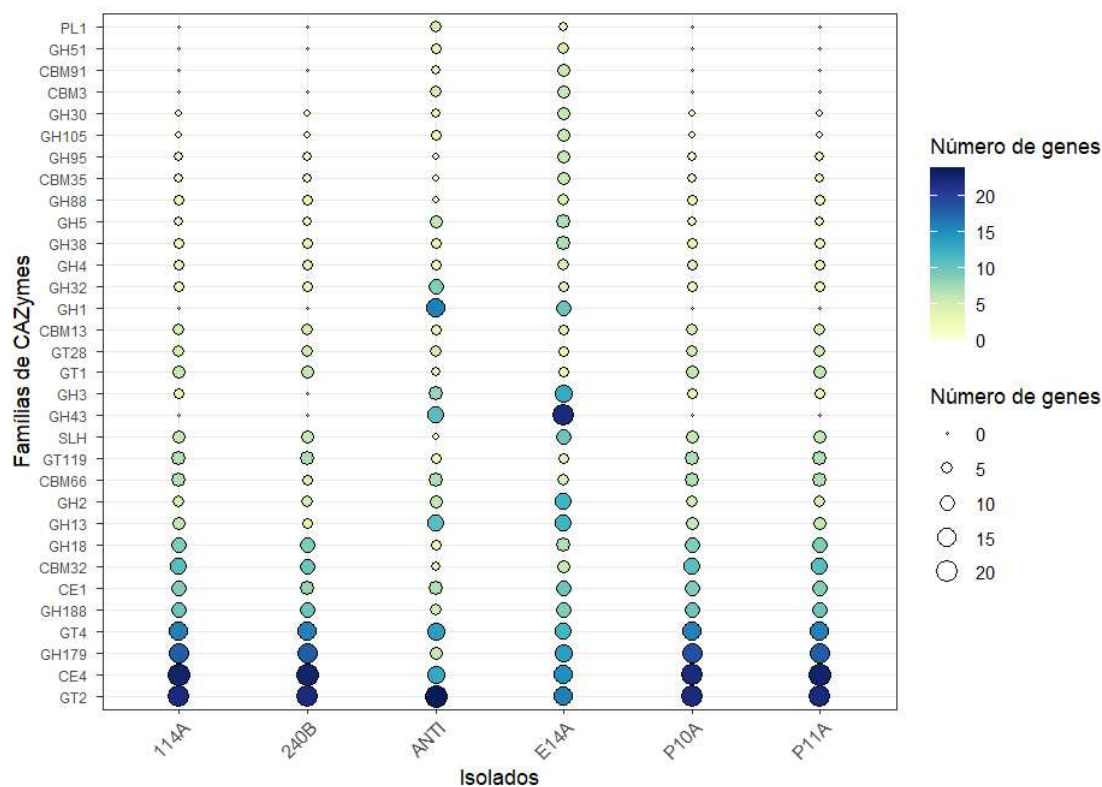
**Figura 4.** Distribuição percentual das categorias funcionais KEGG entre genes classificados como *core* (verde), acessórios (vermelho) e únicos (azul) em genomas de isolados de *Paenibacillus*. As categorias incluem vias metabólicas, doenças, sistemas celulares e outros processos biológicos. A análise evidencia diferenças na representação funcional entre os compartimentos do pangenoma.

### Enzimas ativas sobre carboidratos (CAZymes)

A prospecção *in silico* de genes codificantes para enzimas ativas sobre carboidratos (CAZymes) permitiu avaliar o potencial de cada isolado de *Paenibacillus* na degradação de substratos polissacarídicos. O número total de genes de CAZymes por genoma variou entre

296 e 427, enquanto o número de famílias de CAZymes detectado em cada isolado variou de 92 a 126. O isolado E14A destacou-se por apresentar tanto o maior número total de genes de CAZymes, quanto o maior número de famílias. Os demais isolados apresentaram valores entre 296 e 299 genes, com número de famílias variando entre 92 e 101.

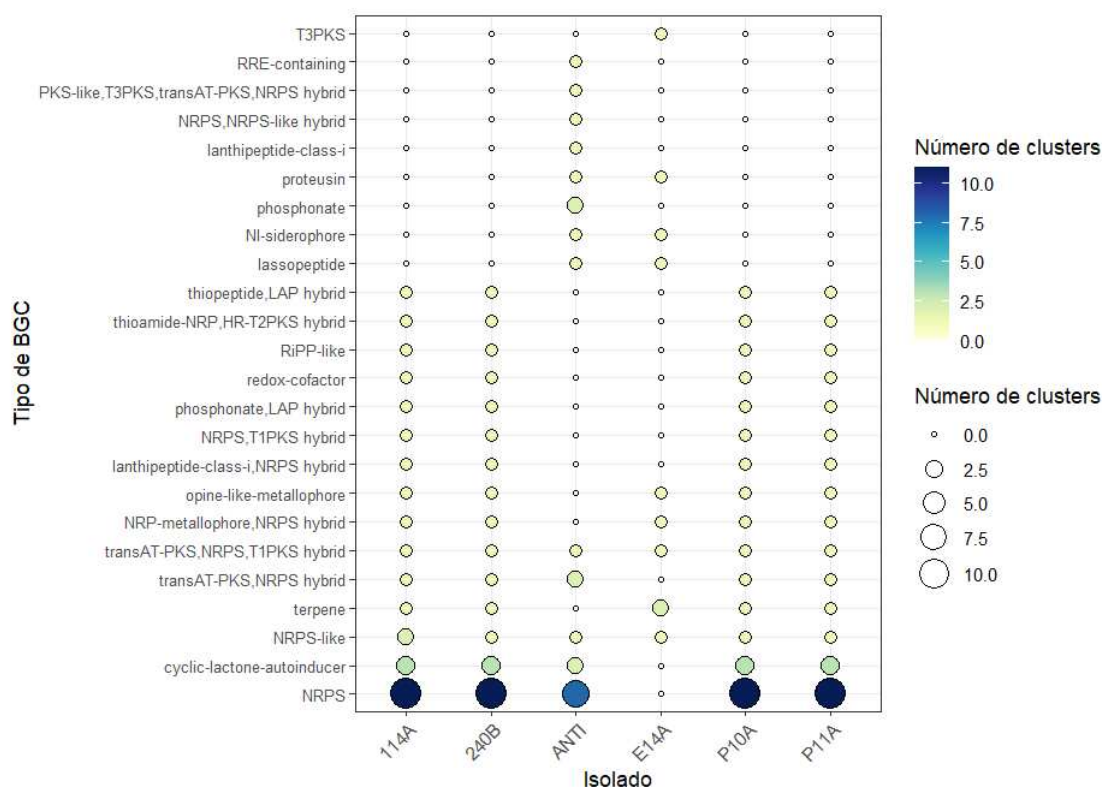
Entre as famílias de CAZymes mais abundantes, destacaram-se GT2, CE4, GH179, GT4, GH188, CE1, CBM32, e GH18, que estiveram presentes em todos os genomas, com variações no número de cópias (**Figura 5**). A família GT2, envolvida na transferência de resíduos de açúcar durante a biossíntese de polissacarídeos estruturais, foi uma das mais representativas, com 16 a 24 genes por isolado. A família CE4, relacionada à desacetilação de quitina e outros substratos, também apresentou ampla distribuição, com destaque para 114A, 240B, P10A e P11A, todas com 22 ou 23 genes CE4. Outras famílias de destaque incluem GH18, GH179 e GH188 (quitinases) e diversos módulos de ligação a carboidratos (*carbohydrate-binding modules* — CBMs) como CBM32, CBM66 e CBM13. Além disso, os isolados E14A e ANTI apresentaram maior diversidade em famílias menos frequentes, como GH43, GH1, GH3 e GH95.



**Figura 5.** Mapa de calor mostrando a distribuição e abundância das famílias de CAZymes nos seis isolados de *Paenibacillus*. A dimensão dos círculos é diretamente proporcional ao número de genes de cada família por genoma.

### Clusters de biossíntese de metabólitos secundários (BGCs)

A análise dos genomas dos seis isolados de *Paenibacillus* por meio da ferramenta antiSMASH permitiu a identificação de um conjunto diversificado de *clusters* de biossíntese de metabólitos secundários (BGCs). O número total de BGCs preditos por genoma variou entre 10 e 28 *clusters*. Os isolados 114A, 240B, P10A e P11A apresentaram os maiores números de BGCs (27 a 28 *clusters*), enquanto o isolado E14A apresentou somente 10 *clusters*. A distribuição dos BGCs revelou a predominância de BGCs pertencentes à classe NRPS (*non-ribosomal peptide synthetases*), com até 11 BGCs de NRPS por genoma, especialmente nos isolados 114A, 240B, P10A e P11A (**Figura 6**). Além disso, foram detectados BGCs de PKS (*polyketide synthases*), terpenos, RiPPs (*ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides*) e sideróforos. Outro destaque foi a presença significativa de *clusters* híbridos, envolvendo a combinação de domínios como “NRPS, T1PKS *hybrid*”, “*transAT*-PKS, NRPS *hybrid*”, “*thioamide*-NRP, HR-T2PKS *hybrid*”, entre outros.



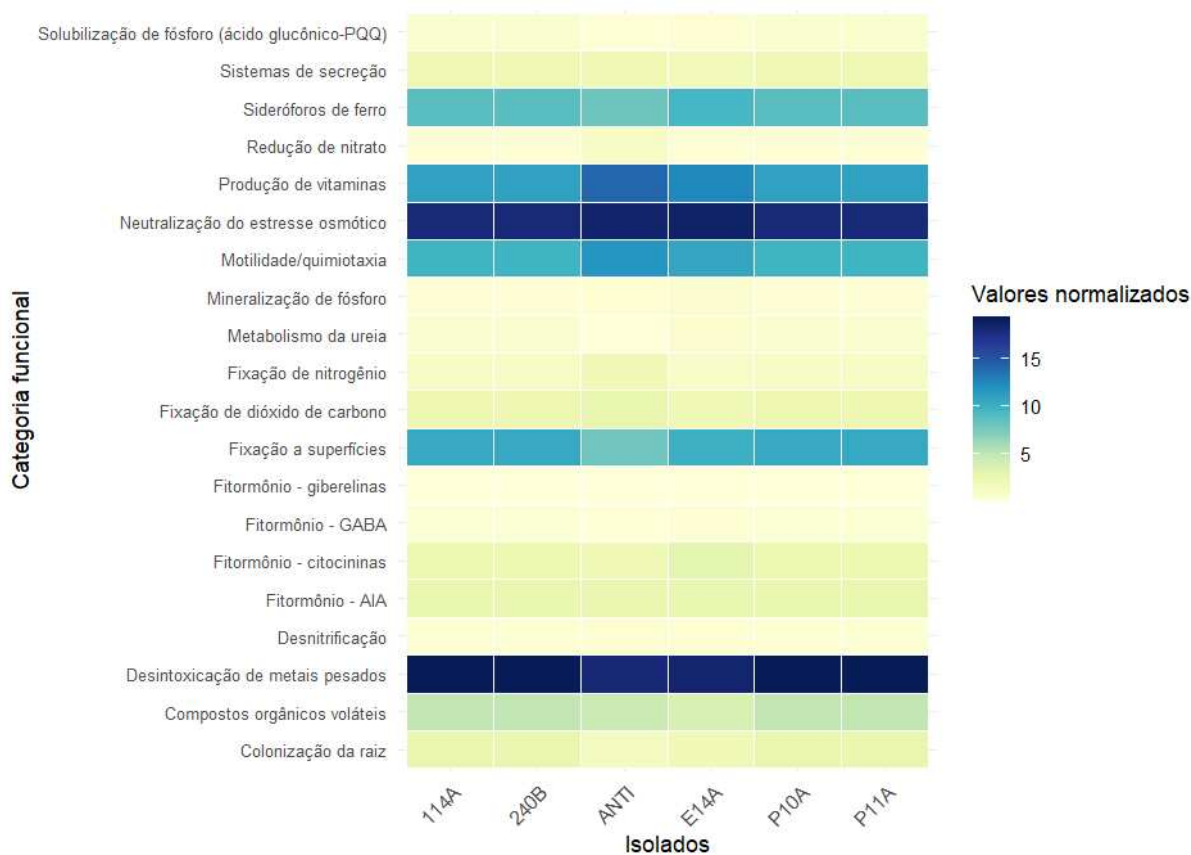
**Figura 6.** Mapa de calor representando a distribuição e abundância dos diferentes tipos de BGCs nos isolados de *Paenibacillus*. A dimensão dos círculos indica o número de *clusters* de cada tipo por isolado.

### **Genes relacionados ao biocontrole e à promoção de crescimento vegetal**

A prospecção genômica *in silico* realizada por meio da ferramenta PGPg\_finder evidenciou o potencial multifuncional dos isolados de *Paenibacillus* avaliados, com presença de genes associados tanto ao biocontrole de fitopatógenos quanto à promoção direta do crescimento vegetal (PGP) (**Figura 7**). Entre os mecanismos relacionados ao biocontrole, destacou-se a categoria de produção de sideróforos. Os isolados 114A, 240B, P10A, P11A e ANTI apresentaram densidades significativas de genes associados à biossíntese dessas moléculas, com valores entre 8,16 e 8,94 genes/1000 CDSs (*Coding DNA sequences*).

A categoria desintoxicação de metais pesados apresentou abundância elevada em todos os isolados, com destaque para 114A, 240B, P10A e P11A, que apresentaram valores próximos a 19,42 genes/1000 CDSs. Outras categorias com possível papel no biocontrole incluem produção de compostos orgânicos voláteis (associados a efeitos nematocidas, antifúngicos e indutores de resistência sistêmica), e sistemas de secreção.

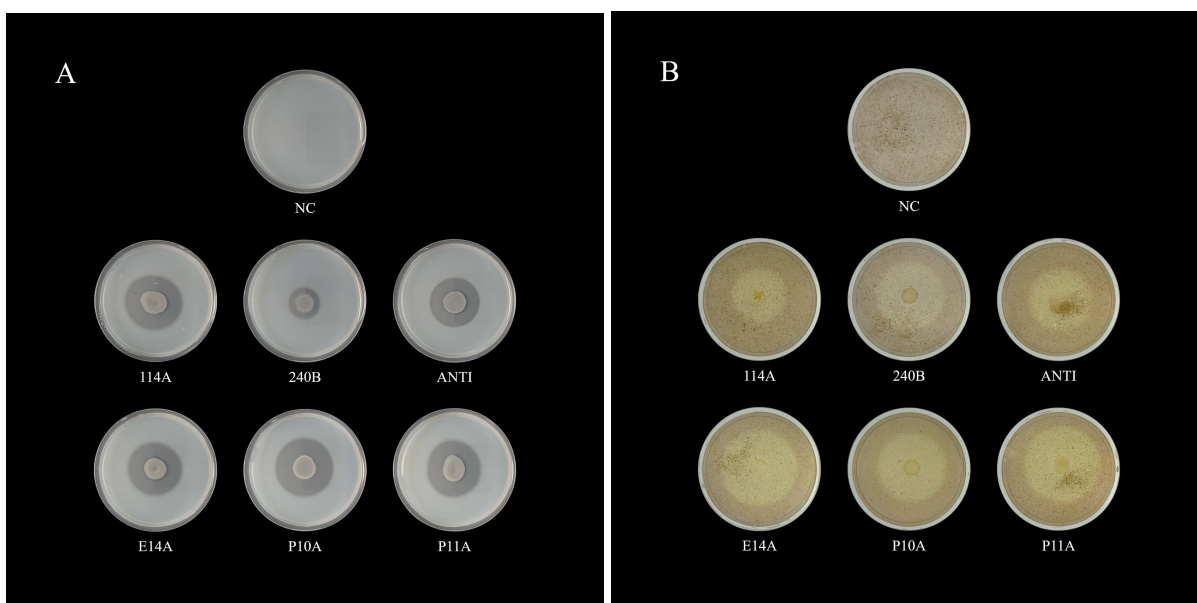
Os isolados também apresentaram genes envolvidos em múltiplos mecanismos de promoção direta de crescimento vegetal, incluindo produção de fitormônios, como auxinas (AIA), citocininas e giberelinas, com destaque para os isolados ANTI e E14A, que apresentaram as maiores densidades relativas; fixação biológica de nitrogênio e metabolismo da ureia, contribuindo para a disponibilidade de nitrogênio no solo; e solubilização e mineralização de fósforo, incluindo genes relacionados à produção de ácido glucônico via PQQ. Além disso, destaca-se também a produção de vitaminas, com valores acima de 11 genes/1000 CDSs em todos os isolados, fortemente elevado em E14A e ANTI; e a neutralização de estresse osmótico, em torno de 18 genes/1000 CDSs em todos os isolados. As categorias motilidade/quimiotaxia, adesão a superfícies e colonização da raiz também foram amplamente representadas em todos os isolados.



**Figura 7.** Mapa de calor representando a distribuição normalizada de genes relacionados a controle biológico e promoção de crescimento vegetal nos isolados de *Paenibacillus*. Os valores foram normalizados por número total de CDSs em cada genoma.

### Produção *in vitro* de enzimas hidrolíticas

Todos os isolados de *Paenibacillus* avaliados apresentaram resultados positivos para a produção das duas enzimas hidrolíticas testadas: protease (**Figura 8A**) e quitinase (**Figura 8B**), evidenciada pela formação de zonas claras ao redor das colônias.

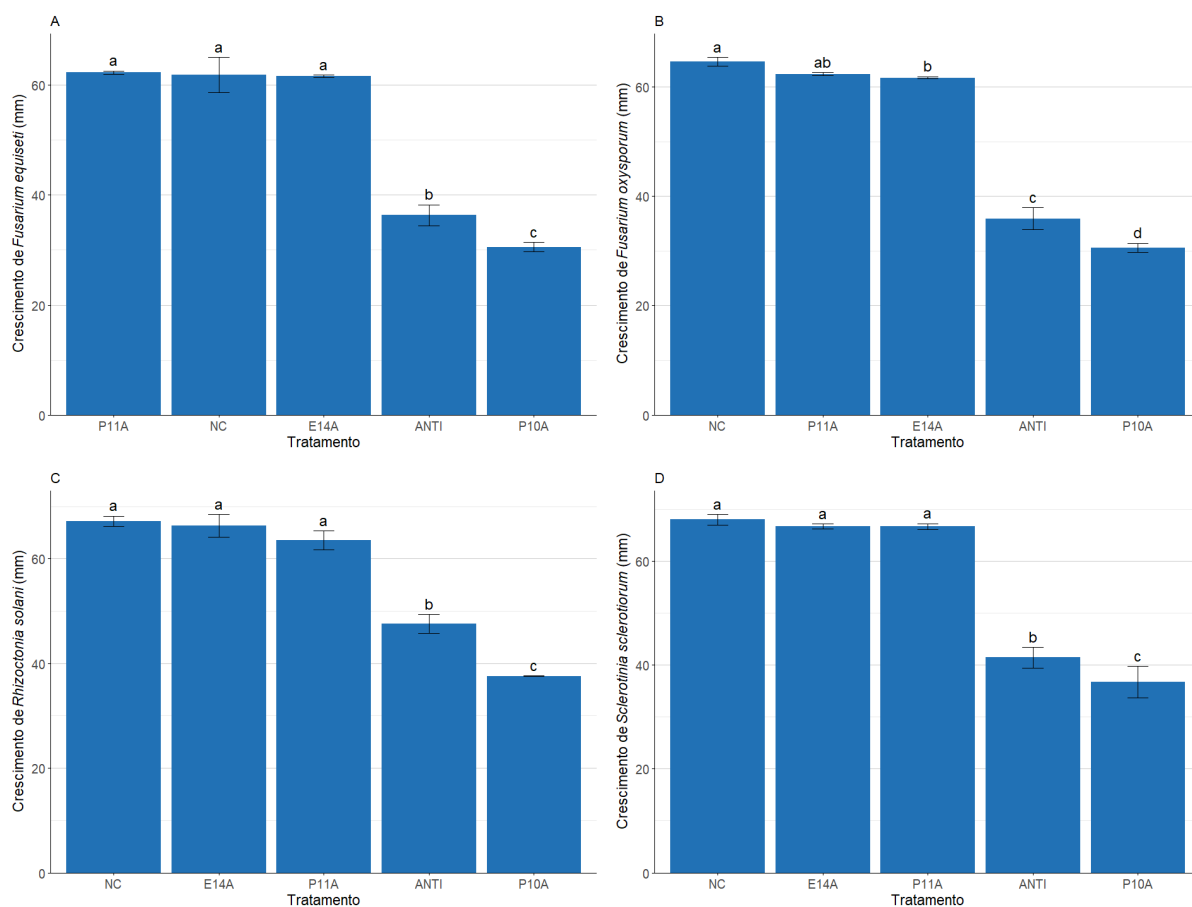


**Figura 8.** Avaliação da atividade enzimática dos seis isolados de *Paenibacillus*. **A.** Produção de proteases detectada em placas contendo ágar-leite desnatado. A formação de halos claros ao redor das colônias indica atividade proteolítica. **B.** Atividade quitinolítica observada em placas contendo quitina coloidal. A formação de zonas claras ao redor das colônias indica degradação da quitina. (NC = controle negativo).

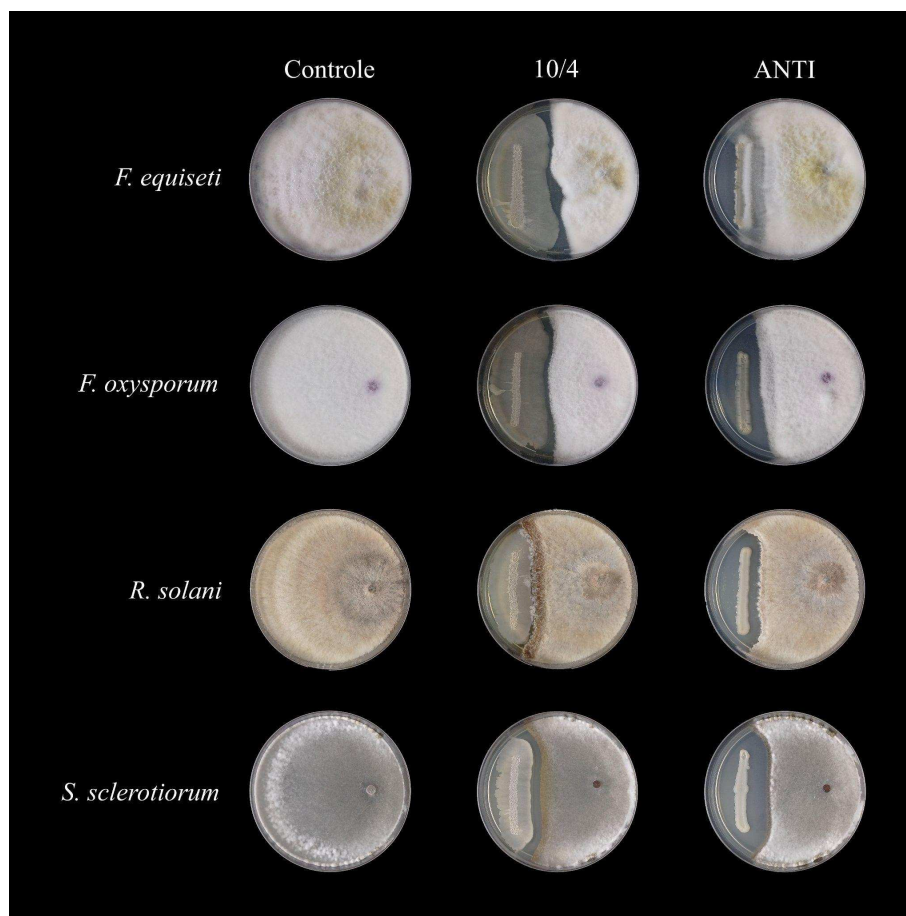
### Atividade antagonista *in vitro* contra fungos fitopatogênicos

A análise estatística dos dados de crescimento micelial evidenciou diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos para todos os fungos testados. Nos gráficos (**Figura 9**), observa-se que P10A e ANTI reduziram significativamente o crescimento de todos os fitopatógenos, em comparação com o controle negativo (NC) e aos demais isolados (**Figura 10**). Os isolados E14A e P11A, embora tenham crescido normalmente, não apresentaram efeito inibitório significativo sobre os fungos. Os isolados 240B e 114A não apresentaram crescimento no meio BDA, sendo, portanto, excluídos das análises comparativas.

Os resultados demonstraram que o isolado P10A apresentou o melhor desempenho geral, com inibição de crescimento (IC%) superior a 40% para todos os fungos avaliados, atingindo 52,52% de inibição para *F. oxysporum* e 51,63% para *F. equiseti*. O isolado ANTI também se destacou, especialmente frente a *F. oxysporum* (43,47%) e *F. equiseti* (41,23%). Em contraste, os isolados E14A e P11A exibiram controle muito reduzido, com IC% inferiores a 6,5% para todos os patógenos.



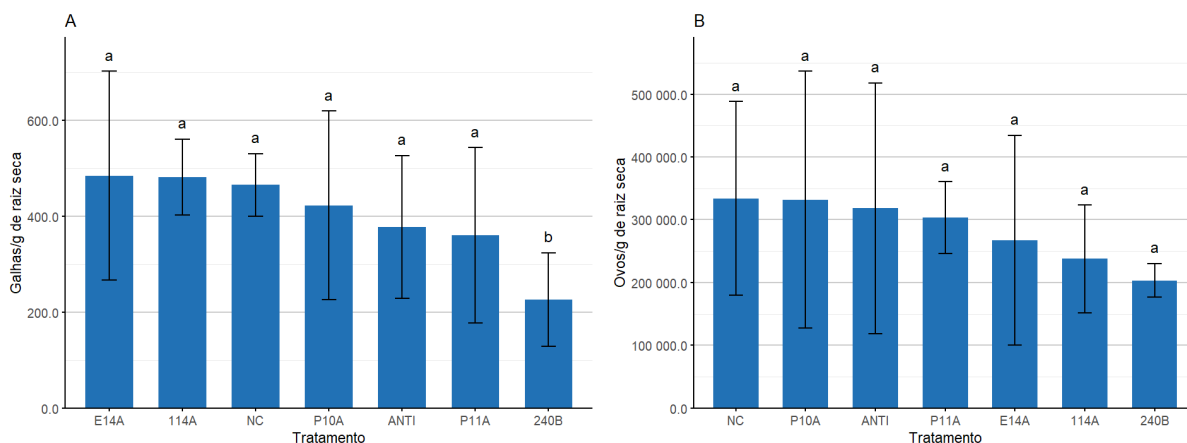
**Figura 9.** Crescimento micelial (mm) de quatro fungos fitopatogênicos em cultura pareada com isolados de *Paenibacillus* em meio BDA. As barras representam a média  $\pm$  desvio padrão ( $n = 3$ ). Letras distintas indicam diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). (A) *Fusarium equiseti*, (B) *Fusarium oxysporum*, (C) *Rhizoctonia solani*, (D) *Sclerotinia sclerotiorum*.



**Figura 10.** Interação *in vitro* entre fungos fitopatogênicos e os isolados P10A e ANTI em cultura dupla no meio BDA. Cada linha representa um fitopatógeno: *F. equiseti*, *F. oxysporum*, *R. solani* e *S. sclerotiorum* (de cima para baixo). As colunas correspondem ao controle (sem bactéria), ao isolado P10A (10/4) e ao isolado ANTI.

### Biocontrole *in vivo* de *M. javanica* na soja

A avaliação do biocontrole de *M. javanica* na soja revelou diferença estatística significativa somente para o número de galhas por grama de raiz seca ( $p = 0,00613$ ), com o isolado 240B apresentando a menor média ( $255,96 \pm 97,08$ ), diferenciando-se dos demais tratamentos (**Tabela 2, Figura 11A**). Para o número de ovos, não foram observadas diferenças significativas ( $p = 0,684$ ), embora o tratamento 240B também tenha exibido a menor média ( $203.336 \pm 27.061$ ), seguido por 114A e E14A (**Tabela 2, Figura 11B**). No que se refere ao índice de redução baseado no número de galhas, o tratamento com 240B novamente se destacou, atingindo 51,40% seguido por P11A (22,65%) e ANTI (18,90%) (**Tabela 2**).



**Figura 11.** Efeito dos seis isolados de *Paenibacillus* sobre parâmetros de infecção por *M. javanica* em raízes de soja. **A.** Número de galhas por grama de raiz seca. **B.** Número de ovos por grama de raiz seca. As barras representam médias  $\pm$  desvio padrão ( $n = 6$ ). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste de Duncan ( $p < 0,05$ ). (NC = controle negativo).

**Tabela 2.** Efeito de diferentes isolados de *Paenibacillus* sobre a infestação de *Meloidogyne javanica* em raízes de soja, expresso como número médio de galhas e ovos por grama de raiz seca, e índice de redução (%) em comparação à testemunha (NC). Valores seguidos por letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística significativa pelo teste de Duncan ( $p < 0,05$ ). O índice de redução foi calculado com base na média da testemunha.

| Tratamento      | Galhas/g de raiz seca | Ovos/g de raiz seca           | Índice de redução (%) |
|-----------------|-----------------------|-------------------------------|-----------------------|
| 240B            | 225,96 $\pm$ 97,08 b  | 203.365,65 $\pm$ 27.061,33 a  | 51,40%                |
| 114A            | 359,61 $\pm$ 182,81 a | 303.641,92 $\pm$ 56.989,56 a  | 22,65%                |
| ANTI            | 377,07 $\pm$ 148,66 a | 318.134,13 $\pm$ 199.614,14 a | 18,90%                |
| P10A            | 421,92 $\pm$ 196,62 a | 332.122,53 $\pm$ 204.456,72 a | 9,25%                 |
| P11A            | 480,64 $\pm$ 79,13 a  | 237.631,01 $\pm$ 85.768,90 a  | -3,38%                |
| E14A            | 483,92 $\pm$ 217,59 a | 267.533,25 $\pm$ 167.118,75 a | -4,08%                |
| Testemunha (NC) | 464,94 $\pm$ 65,12 a  | 333.884,74 $\pm$ 154.470,22 a | -                     |

## DISCUSSÃO

A análise filogenômica realizada posicionou os seis isolados em três clados dentro do gênero *Paenibacillus*, evidenciando uma relevante diversidade taxonômica e funcional. Quatro isolados (114A, 240B, P10A e P11A) agrupam-se com *P. elgii*, espécie conhecida por produzir compostos antimicrobianos e atuar no controle de doenças fúngicas no tomateiro (Kim; Hur; Park, 2019; Kim *et al.*, 2020). O isolado ANTI, embora tenha se agrupado em um

clado poliespecífico na filogenia, foi identificado como *P. polymyxa* pela anotação taxonômica do GTDB-Tk, resultado também reportado por Gonçalves e Santana (2023). Essa espécie, sobretudo, se destaca pela promoção de crescimento vegetal, por meio de fixação de nitrogênio e solubilização de fosfato (Grady *et al.*, 2016), bem como potencial para o controle biológico de nematoides do gênero *Meloidogyne* (Khan *et al.*, 2008; Singh; Wesemael, 2022; Shi *et al.*, 2024) e fungos fitopatogênicos (Dobrzyński; Nازیębło, 2024). Por fim, E14A foi alocada junto a *P. pabuli*, espécie igualmente reconhecida por seu potencial biotecnológico (Li *et al.*, 2021; 2023), entretanto não explorado para fins de controle biológico e promoção de crescimento vegetal.

A estrutura do pangenoma dos seis isolados revelou 7.709 famílias gênicas, com alta proporção de genes acessórios, sobretudo nos isolados ANTI (3.696) e E14A (4.576). A elevada quantidade de genes únicos indica uma grande plasticidade genômica e potencial adaptativo, refletindo a diversidade funcional típica de gêneros com pangenomas abertos (Brockhurst *et al.*, 2019). A análise funcional (COG e KEGG) reforçou essa observação, apontando para predomínio de funções específicas essenciais no genoma *core* (replicação, transcrição, tradução e metabolismo energético), enquanto os compartimentos acessórios e únicos apresentaram enriquecimento em funções associadas à adaptação ambiental, biossíntese de metabólitos secundários e transdução de sinais, características desejáveis em microrganismos com potencial de biocontrole (Liang *et al.*, 2019; Pirttilä *et al.*, 2021).

As análises de CAZymes destacaram a presença expressiva de famílias de quitinases (GH18, GH179 e GH188) no genoma de todos os isolados, fundamentais na degradação da parede celular de fungos, cutícula e casca de ovos de nematoides (Veliz; Martínez-Hidalgo; Hirsch, 2017). O isolado E14A, apesar de apresentar maior número total e diversidade de CAZymes, mostrou baixo desempenho nos ensaios *in vitro*, sugerindo que o perfil genômico robusto nem sempre se traduza em atividade enzimática em condições laboratoriais, como também observado em Mukherjee, Lodha e Madhuprakash (2023). A presença de módulos de ligação a carboidratos (CBMs), como CBM32, CBM66 e CBM13, também é relevante para fins biotecnológicos, visto o seu importante papel na modulação de propriedades enzimáticas (You *et al.*, 2024).

O mapeamento dos BGCs revelou entre 10 e 28 *clusters* por genoma, com destaque para os isolados de *P. elgii* (27–28 *clusters*). A predominância de *clusters* do tipo NRPS, PKS e híbridos indica grande potencial biossintético de compostos bioativos com atividade complexa (Yang *et al.*, 2021). Genomas de *Paenibacillus* com alto potencial biossintético

estão associados a atividade antimicrobiana elevada (Lebedeva *et al.*, 2021; Yang *et al.*, 2024), o que é interessante para a inibição de patógenos. Similarmente, A baixa incidência de BGCs em *P. pabuli* E14A pode estar associada à baixa atividade de controle biológico *in vitro* e *in vivo*. Ademais, a presença consistente de sideróforos, evidenciada também pela análise de genes de promoção de crescimento vegetal, por exemplo, reforça a capacidade de competição por ferro na rizosfera, limitando recursos para patógenos (Shen *et al.*, 2013).

Além do potencial antagonista, foram identificados genes relacionados à promoção de crescimento vegetal (PGP), como produção de fitormônios, fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato e produção de vitaminas, com destaque para os isolados ANTI e E14A. Mesmo com baixa eficácia em experimentos de biocontrole *in vitro* e *in vivo*, *P. pabuli* E14A, possui potencial uso como bactéria promotora de crescimento.

Nos ensaios *in vitro*, P10A e ANTI apresentaram elevada eficiência na inibição do crescimento micelial dos quatro fitopatógenos testados, com inibição superior a 40%. Esses resultados corroboram com estudos anteriores de *Paenibacillus* no controle de fungos fitopatogênicos (Zhai *et al.*, 2021; Elbouazaoui *et al.*, 2022; Cai *et al.*, 2024; Yang *et al.*, 2024). Possíveis mecanismos de antagonismo incluem a produção putativa de compostos antimicrobianos (número elevado de BGCs), enzimas hidrolíticas e competição, corroborados pelo perfil genômico analisado. Em contraste, E14A e P11A exibiriam baixa atividade, enquanto 240B e 114A não cresceram no meio BDA, o que pode estar associado a restrições fisiológicas ou necessidades nutricionais específicas. No entanto, a produção qualitativa de quitinase e protease foi confirmada em todos os isolados, sugerindo potencial latente que poderá ser explorado em diferentes condições de cultivo.

Nos ensaios *in vivo* com soja, o isolado 240B apresentou o melhor desempenho no controle de *M. javanica*, com redução significativa no número de galhas e índice de redução de 51,4%. Esse resultado destaca a capacidade do isolado em interferir no ciclo de vida do nematoide ou na interação planta-patógeno, possivelmente por ação direta (enzimas hidrolíticas, compostos nematicidas) e/ou indireta (indução de resistência sistêmica) (Aioub; Elesawy; Ammar, 2022; Deng; Wang; Li, 2022; Antil *et al.*, 2023; Ayaz *et al.*, 2024; Yang *et al.*, 2024). Embora a ANOVA não tenha apontado diferenças significativas no número de ovos, o menor valor médio obtido com 240B reforça seu potencial como agente de biocontrole. A presença de genes relacionados à produção de compostos voláteis, sideróforos, fitormônios e sistemas de secreção, além de 37 genes de famílias de CAZymes com atividade quitinolítica, confirma o potencial multifatorial do isolado 240B. Embora existam relatos do

uso de *P. polymyxa* no controle de *M. incognita* em outras culturas (Singh; Wesemael, 2022; Shi *et al.*, 2024), este é um dos primeiros relatos para *Paenibacillus* no patossistema soja-*M. javanica*.

De forma geral, a integração dos dados genômicos, fenotípicos *in vitro* e *in vivo* confirmam o potencial biotecnológico dos isolados de *Paenibacillus*, especialmente *P. elgii* 240B e P10A, e *P. polymyxa* ANTI, para aplicações no manejo biológico de fitopatógenos na soja. Os resultados destacam não somente a eficácia como agentes de controle biológico, mas também sua capacidade de promover o crescimento vegetal e modular interações benéficas na rizosfera. A identificação de genes associados a múltiplos mecanismos de ação sugere que esses isolados podem atuar de forma sinérgica e robusta em diferentes condições de campo, contribuindo para a redução do uso de químicos e para práticas agrícolas mais sustentáveis.

## CONCLUSÃO

O presente estudo realizou a prospecção genômica de seis isolados de *Paenibacillus*, revelando um elevado potencial genético e funcional associado ao controle biológico de fitopatógenos do solo na cultura da soja. Os dados obtidos reforçam o papel desses isolados como candidatos promissores para estratégias de manejo sustentável, alinhadas à redução do uso de químicos e à promoção de sistemas agrícolas mais sustentáveis. Pesquisas futuras devem focar na validação funcional dos mecanismos identificados e realização de novos ensaios em casa de vegetação e em condições de campo. Tais avanços serão fundamentais para consolidar esses isolados de *Paenibacillus* como uma alternativa viável e inovadora para o manejo integrado de doenças na soja.

## REFERÊNCIAS

- Abd-El-Khair, H. *et al.* Protective effect of *Bacillus subtilis*, *B. pumilus*, and *Pseudomonas fluorescens* isolates against root knot nematode *Meloidogyne incognita* on cowpea. **Bulletin of the National Research Centre**, v. 43, n. 64, 2019. DOI: 10.1186/s42269-019-0108-8.
- Aioub, A. A.; Elesawy, A. E.; Ammar, E. E. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) and their role in plant-parasitic nematodes control: a fresh look at an old issue. **Journal of Plant Disease and Protection**, v. 129, p. 1305–1321, 2022. DOI: 10.1007/s41348-022-00642-3.
- Ajayi-Oyetunde, O. O.; Bradley, C. A. *Rhizoctonia solani*: taxonomy, population biology and management of rhizoctonia seedling disease of soybean. **Plant Pathology**, v. 67, n. 1, p. 3–17, 2018. DOI: 10.1111/ppa.12733.
- Andrews, S. **FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data**. 2010. Disponível em: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.
- Antil, S. *et al.* Recent advances in utilizing bacteria as biocontrol agents against plant parasitic nematodes emphasizing *Meloidogyne* spp. **Biological Control**, v. 183, 2023. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2023.105244.
- Ayaz, M. *et al.* Biocontrol of plant parasitic nematodes by bacteria and fungi: a multi-omics approach for the exploration of novel nematocides in sustainable agriculture. **Frontiers in Microbiology**, v. 15, 2024. DOI: 10.3389/fmicb.2024.1433716.
- Bankevich, A. *et al.* SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. **Journal of Computational Biology**, v. 19, n. 5, p.455–477, 2012. DOI: 10.1089/cmb.2012.0021.
- Bernard, G. C.; Egnin, M.; Bonsi, C. The Impact of Plant-Parasitic Nematodes on Agriculture and Methods of Control. In: **Nematology - Concepts, Diagnosis and Control**. IntechOpen. 2017. 192 p. ISBN: 978-953-51-3416-9. DOI: 10.5772/66851.
- Blin, K. *et al.* antiSMASH 7.0: new and improved predictions for detection, regulation, chemical structures and visualization. **Nucleic Acid Research**, v. 51, n. 1, p. 46–50, 2023. DOI: 10.1093/nar/gkad344.
- Bolger, A. M.; Loshe, M.; Usadel, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, p. 2114–2120, 2014. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu170.
- Boneti, J. I. S.; Ferraz, S. Modificação do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 6, n. 553, 1981.
- Brockhurst, M. A. *et al.* The Ecology and Evolution of Pangenomes. **Current Biology**, v. 29, n. 20, p. 1094–1103, 2019. DOI: 10.1016/j.cub.2019.08.012.

- Cai, F. *et al.* An endophytic *Paenibacillus polymyxa* hg18 and its biocontrol potential against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. **Biological Control**, v. 188, 2024. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2023.105380.
- Castanheira, C. M. *et al.* Influence of *Meloidogyne javanica* parasitism on soybean development and chemical composition. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 8, n. 10, 2021. DOI: 10.1186/s40538-021-00209-8.
- Chaudhari, N. M.; Gupta, V. K.; Dutta, C. BPGA - an ultra-fast pan-genome analysis pipeline. **Scientific Reports**, v. 6, n. 24373, 2016. DOI: 10.1038/srep24373.
- Chaumeil, P. *et al.* GTDB-Tk: A toolkit to classify genomes with the Genome Taxonomy Database. **Bioinformatics**, v. 36, n. 6, p. 1925–1927, 2020. DOI: 10.1093/bioinformatics/btz848.
- Chen, J.; Li, Q. X.; Song, B. Chemical Nematicides: Recent Research Progress and Outlook. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, n. 44, p. 12175–12188, 2020. DOI: 10.1021/acs.jafc.0c02871.
- Demain, A. L.; Solomon, N. A. **Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology**. Washington: American Society for Microbiology, 1986. 466 p. ISBN: 0 914826-72-7. DOI: 10.1016/0141-0229(87)90013-5.
- Deng, X.; Wang, X. Li, G. Nematicidal Effects of Volatile Organic Compounds from Microorganisms and Plants on Plant-Parasitic Nematodes. **Microorganisms**, v. 10, n. 6, 2022. DOI: 10.3390/microorganisms10061201.
- Dobrzyński, J.; Nازیębło, A. *Paenibacillus* as a Biocontrol Agent for Fungal Phytopathogens: Is *P. polymyxa* the Only One Worth Attention? **Microbial Ecology**, v. 87, n. 134, 2024. DOI: 10.1007/s00248-024-02450-8.
- El-Baky, N. A.; Amara, A. A. A. F. Recent Approaches towards Control of Fungal Diseases in Plants: An Updated Review. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 11, 2021. DOI: 10.3390/jof7110900.
- Elbouazaoui, A. *et al.* Biocontrol activity of *Bacillus*, *Paenibacillus* and *Pseudomonas* against *Fusarium* wilt of chickpea in Morocco. **Acta Agriculturae Scandinavica, Section B – Soil & Plant Science**, v. 72, n. 1, p. 847–859, 2022. DOI: 0.1080/09064710.2022.2100819.
- Favery, B. *et al.* Gall-forming root-knot nematodes hijack key plant cellular functions to induce multinucleate and hypertrophied feeding cells. **Journal of Insect Physiology**, v. 84, p. 60-69, 2016. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2015.07.013.
- Grady, E. N. *et al.* Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: a review. **Microbial Cell Factories**, v. 15, n. 203, 2016. DOI: 10.1186/s12934-016-0603-7.
- Gonçalves, O. S.; Santana, M. F. Uncovering the Secrets of Slow-Growing Bacteria in Tropical Savanna Soil Through Isolation and Genomic Analysis. **Microbial Ecology**, v. 86, p. 2687–2702, 2023. DOI: 10.1007/s00248-023-02275-x.

- Hamza, M. *et al.* Global Impact of Soybean Production: A Review. **Asian Journal of Biochemistry, Genetics and Molecular Biology**, v. 16, n. 2, p. 12–20, 2024. DOI: 10.9734/AJBGMB/2024/v16i2357.
- Hossain, M. M. *et al.* *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: Insights into the Pathogenomic Features of a Global Pathogen. **Cells**, v. 12, n. 7, 2023. DOI: 10.3390/cells12071063.
- Husaini, A. M.; Sakina, A.; Cambay, S. R. Host-Pathogen Interaction in *Fusarium oxysporum* Infections: Where Do We Stand? **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 31, n. 9, p. 889–898, 2018. DOI: 10.1094/MPMI-12-17-0302-CR.
- Hussey, R. S.; Barker, K. R. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. **Plant Disease Reporter**, v. 57, n. 12, p. 1025–1028, 1973.
- Islam, M. A. *et al.* In vitro study of biocontrol potential of rhizospheric *Pseudomonas aeruginosa* against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 28, n. 90, 2018. DOI: 10.1186/s41938-018-0097-1.
- Islam, M. S. *et al.* Soybean and Sustainable Agriculture for Food Security. In: **Soybean - Recent Advances in Research and Applications**. IntechOpen. 2022. 284 p. ISBN: 978-1-80355-700-7. DOI: 10.5772/intechopen.98162.
- Jones, J. T. *et al.* Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, v. 14, n. 9, p. 946–961, 2013. DOI: 10.1111/mp.12057.
- Khan, Z. *et al.* A plant growth promoting rhizobacterium, *Paenibacillus polymyxa* strain GBR-1, suppresses root-knot nematode. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 8, p. 3016–3023, 2008. DOI: 10.1016/j.biortech.2007.06.031.
- Kim, J. *et al.* Structure and antifungal activity of pelgipeptins from *Paenibacillus elgii* against phytopathogenic fungi. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 163, p. 154–163, 2020. DOI: 10.1016/j.pestbp.2019.11.009.
- Kim, Y. C.; Hur, J. Y.; PARK, S. K. Biocontrol of *Botrytis cinerea* by chitin-based cultures of *Paenibacillus elgii* HOA73. **European Journal of Plant Pathology**, v. 155, p. 253–263, 2019. DOI: 10.1007/s10658-019-01768-1.
- Köhl, J.; Kolnaar, R.; Ravensberg, W. J. Mode of Action of Microbial Biological Control Agents Against Plant Diseases: Relevance Beyond Efficacy. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, 2019. DOI: 10.3389/fpls.2019.00845.
- Lebedeva, J. *et al.* Genomic Mining and Characterization of Biosynthetic Gene Clusters in Two Cave Strains of *Paenibacillus* sp. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 2020. DOI: 10.3389/fmicb.2020.612483.
- Letunic, I.; Bork, P. Interactive Tree of Life (iTOL) v6: recent updates to the phylogenetic tree display and annotation tool. **Nucleic Acid Research**, v. 52, n. 1, p. 78–82, 2024. DOI: 10.1093/nar/gkae268.

- Li, G. *et al.* Isolation, Identification and Characterization of *Paenibacillus pabuli* E1 to Explore Its Aflatoxin B1 Degradation Potential. **Current Microbiology**, v. 78, p. 3686–3695, 2021. DOI: 10.1007/s00284-021-02624-4.
- Li, G. *et al.* Feasibility insights into the application of *Paenibacillus pabuli* E1 in animal feed to eliminate non-starch polysaccharides. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, 2023. DOI: 10.3389/fmicb.2023.1205767.
- Li, X. *et al.* Characterization of Antagonistic Bacteria *Paenibacillus polymyxa* ZYPP18 and the Effects on Plant Growth. **Plants**, v. 12, n. 13, 2023. DOI: 10.3390/plants12132504.
- Liang, L. *et al.* Signal pathways involved in microbe–nematode interactions provide new insights into the biocontrol of plant-parasitic nematodes. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 374, n. 1767, 2019. DOI: 10.1098/rstb.2018.0317.
- Lin, F. *et al.* Breeding for disease resistance in soybean: a global perspective. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 135, n. 11, p. 3773–3872, 2022. DOI: 10.1007/s00122-022-04101-3.
- Maumela, P. *et al.* In silico biotechnological potential of *Bacillus* sp. strain MHSD\_37 bacterial endophyte. **BMC Genomics**, v. 25, n. 1, p. 399, 2024. DOI: 10.1186/s12864-024-10305-2.
- Mazzetti, V. C. G. *et al.* Reaction of soybean cultivars to *Meloidogyne javanica* and *Meloidogyne incognita*. **Revista Ceres**, v. 66, n. 3. p. 220–225, 2019. DOI: 10.1590/0034-737X201966030008.
- Migunova, V. D.; Sasanelli, N. Bacteria as Biocontrol Tool against Phytoparasitic Nematodes. **Plants**, v. 10, n. 2, 2021. DOI: 10.3390/plants10020389.
- Mikheenko, A. *et al.* WebQUAST: online evaluation of genome assemblies. **Nucleic Acids Research**, v. 51, n. 1, p. 601–606, 2023. DOI: 10.1093/nar/gkad406.
- Minh, B. *et al.* IQ-TRREE 2: New Models and Efficient Methods for Phylogenetic Inference in the Genomic Era. **Molecular Biology and Evolution**, v. 37, n. 5, p. 1530–1534, 2020. DOI: 10.1093/molbev/msaa015.
- Moens, M.; Perry, R. N.; Starr, J. L. Meloidogyne species - a diverse group of novel and important plant parasites. In: Perry, R. N.; Moens, M.; Starr, J. L. **Root-knot nematodes**. 1. ed. Wallingford, Reino Unido: CABI Publishing, 13 out. 2009. 488 p. eISBN: 978-1-84593-493-4.
- Mukherjee, S.; Lodha, T. D.; Madhuprakash, J. Comprehensive Genome Analysis of Cellulose and Xylan-Active CAZymes from the Genus *Paenibacillus*: Special Emphasis on the Novel Xylanolytic *Paenibacillus* sp. LS1. **Microbiology Spectrum**, v. 11, n. 3, 2023. DOI: 10.1128/spectrum.05028-22.
- Naeem, M. *et al.* Characterization and Pathogenicity of *Fusarium* Species Associated with Soybean Pods in Maize/Soybean Strip Intercropping. **Pathogens**, v. 8, n. 4, 2019. DOI: 10.3390/pathogens8040245.

- Pailin, T. *et al.* Detection of extracellular bound proteinase in EPS-producing lactic acid bacteria cultures on skim milk agar. **Letters in Applied Microbiology**, v. 33, n. 1, p. 45–49, 2001. DOI: 10.1046/j.1472-765X.2001.00954.x.
- Parks, D. H. *et al.* CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. **Genome Research**, v. 25, p. 1043–1055, 2015. DOI: 10.1101/gr.186072.114.
- Pellegrinetti, T. A. *et al.* *PGPg\_finder*: A comprehensive and user-friendly pipeline for identifying plant growth-promoting genes in genomic and metagenomic data. **Rhizosphere**, v. 30, 2024. DOI: 10.1016/j.rhisph.2024.100905.
- Pires, D. *et al.* The Fight against Plant-Parasitic Nematodes: Current Status of Bacterial and Fungal Biocontrol Agents. **Pathogens**, v. 11, n. 10, 2022. DOI: 10.3390/pathogens11101178.
- Pirttilä, A. M. *et al.* Biofertilizers and Biocontrol Agents for Agriculture: How to Identify and Develop New Potent Microbial Strains and Traits. **Microorganisms**, v. 9, n. 817, 2021. DOI: 10.3390/microorganisms9040817.
- Proveda, J.; Abril-Urias, P.; Escobar, C. Biological Control of Plant-Parasitic Nematodes by Filamentous Fungi Inducers of Resistance: *Trichoderma*, Mycorrhizal and Endophytic Fungi. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. 992, 2022. DOI: 10.3389/fmicb.2020.00992.
- Rani, P. *et al.* Evaluation of bacterial formulations as potential biocontrol agents against the southern root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. **Egyptian Journal of Biological Control**, v. 32, n. 29, 2022. DOI: 10.1186/s41938-022-00529-3.
- Savary, S. *et al.* The global burden of pathogens and pests on major food crops. **Nature Ecology & Evolution**, v. 3, p. 430–439, 2019. DOI: 10.1038/s41559-018-0793-y.
- Sayers, E. *et al.* Database resources of the National Center for Biotechnology Information in 2025. **Nucleic Acids Research**, v. 53, n. 1, p. 20–29, 2025. DOI: 10.1093/nar/gkae979.
- Seemann, T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. **Bioinformatics**, v. 30, n. 14, p. 2068–2069, 2014. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu153.
- Shen, X *et al.* Comparative genomic analysis of four representatives plant growth-promoting rhizobacteria in *Pseudomonas*. **BMC Genomics**, v. 14, n. 271, 2013. DOI: 10.1186/1471-2164-14-271.
- Shi, Q. *et al.* Biocontrol Efficacy and Induced Resistance of *Paenibacillus polymyxa* J2-4 Against *Meloidogyne incognita* Infection in Cucumber. **Phytopathology**, v. 114, n. 3, p. 538–548, 2024. DOI: 10.1094/PHYTO-03-23-0091-R.
- Shivalee, A. *et al.* Isolation and screening of soil microbes for extracellular chitinase activity. **Journal of Advanced Scientific Research**, v. 7, n. 2, p. 10–14, 2016.

- Singer, W. M. *et al.* Soybean genetics, genomics, and breeding for improving nutritional value and reducing antinutritional traits in food and feed. **The Plant Genome**, v. 16, n. 4, 2023. DOI: 10.1002/tpg2.20415.
- Singh, R. R.; Wesemael, W. M. Endophytic *Paenibacillus polymyxa* LMG27872 inhibits *Meloidogyne incognita* parasitism, promoting tomato growth through a dose-dependent effect. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, 2022. DOI: 10.3389/fpls.2022.961085.
- Strajnar, P. *et al.* Effect of *Meloidogyne ethiopica* parasitism on water management and physiological stress in tomato. **European Journal of Plant Pathology**, v. 132, p. 49–57, 2012. DOI: 10.1007/s10658-011-9847-6.
- Sultana, F.; Hossain, M. M. Assessing the potential of bacterial antagonists for plant growth promotion, nutrient acquisition, and biological control of Southern blight disease in tomato. **PLoS ONE**, v. 17, n. 6, 2022. DOI: 10.1371/journal.pone.0267253.
- Tettelin, H. *et al.* Comparative genomics: the bacterial pan-genome. **Current Opinion in Microbiology**, v. 11, n. 5, p. 472–477, 2008. DOI: 10.1016/j.mib.2008.09.006.
- Tian, X. *et al.* The Biocontrol Functions of *Bacillus velenzensis* Strain Bv-25 Against *Meloidogyne incognita*. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 2022. DOI: 10.3389/fmicb.2022.843041.
- Veliz, E. A.; Martínez-Hidalgo, P.; Hirsch, A. M. Chitinase-producing bacteria and their role in biocontrol. **AIMS Microbiology**, v. 3, n. 3, p. 689–705, 2017. DOI: 10.3934/microbiol.2017.3.689.
- Xiang, N. *et al.* Biological Control of *Meloidogyne incognita* by Spore-forming Plant Growth-promoting Rhizobacteria on Cotton. **Plant Disease**, v. 101, p. 774–784, 2017. DOI: 10.1094/PDIS-09-16-1369-RE.
- Yadav, S. P. *et al.* Management of phyto-parasitic nematodes using bacteria and fungi and their consortia as biocontrol agents. **Environmental Sciences: Advances**, v. 4, p. 335–354, 2025. DOI: 10.1039/d4va00216d.
- Yang, F. *et al.* Genomic and phenotypic analysis reveal *Paenibacillus polymyxa* PJH16 is a potential biocontrol agent against cucumber fusarium wilt. **Frontiers in Microbiology**, v. 15, 2024. DOI: 10.3389/fmicb.2024.1359263.
- Yang, H. *et al.* Unraveling the metabolic potential of biocontrol fungi through omics data: a key to enhancing large-scale application strategies. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 56, n. 6, p. 825–832, 2024. DOI: 10.3724/abbs.2024056.
- You, Y. *et al.* Carbohydrate binding modules: Compact yet potent accessories in the specific substrate binding and performance evolution of carbohydrate-active enzymes. **Biotechnology Advances**, v. 73, 2024. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2024.108365.
- Zhai, Y. *et al.* Isolation and characterization of antagonistic *Paenibacillus polymyxa* HX-140 and its biocontrol potential against Fusarium wilt of cucumber seedlings. **BMC Microbiology**, v. 21, n. 75, 2021. DOI: 10.1186/s12866-021-02131-3.

Zheng, J. *et al.* dbCAN3: automated carbohydrate-active enzyme and substrate annotation. **Nucleic Acid Research**, v. 51, n. 1, p. 115-121, 2023. DOI: 10.1093/nar/gkad328.