

ÁNGELA MARÍA MOGOLLÓN ORTIZ

**CONTROLE BIOLÓGICO DE *Meloidogyne javanica* POR *Trichoderma* spp. E
ACTINOBACTÉRIAS EDÁFICAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientador: Marisa Vieira de Queiroz

Coorientadores: Leandro Grassi de Freitas
Thalita Suelen Avelar Monteiro

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2021**

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

T

M696c
2021 Mogollón Ortiz, Ángela María, 1986-
Controle biológico de *Meloidogyne javanica* por
Trichoderma spp. e actinobactérias edáficas / Ángela María
Mogollón Ortiz. – Viçosa, MG, 2021.
1 tese eletrônica (83 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Marisa Viera de Queiroz.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Microbiologia, 2021.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.375>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Nematoda - Controle biológico. 2. Fitopatógenos.
3. Fungos endofíticos. 4. *Trichoderma*. 5. *Streptomyces*. 6.
Kitasatospora. 7. *Kribbella*. 8. *Lentzea*. I. Queiroz, Marisa Viera
de, 1964-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Microbiologia. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola. III. Título.

CDD 22. ed. 632.96

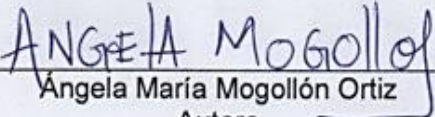
ÁNGELA MARÍA MOGOLLÓN ORTIZ

CONTROLE BIOLÓGICO DE *Meloidogyne javanica* POR *Trichoderma* spp. E
ACTINOBACTÉRIAS EDÁFICAS

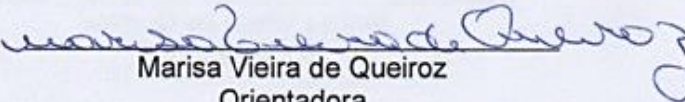
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 8 de dezembro de 2021.

Assentimento:



Angela Maria Mogollón Ortiz
Autora



Marisa Vieira de Queiroz
Orientadora

Aos meus pais Cecilia y Ciro, dedico.

AGRADECIMENTOS

A todas as pessoas maravilhosas, brasileiras e colombianas, que me acompanharam neste processo, estarei sempre agradecida:

Aos meus pais Cecilia e Ciro e meu irmão Diego, pelo imenso amor e incondicionalidade....

Ao Andrés, pelo amor incondicional, ajuda, companhia e por todos os momentos lindos compartilhados....

Aos meus tios Elizabeth e Daniel por sempre cuidar de mim cada vez que voltava para Colômbia, obrigada pelo carinho...

A Universidade Federal de Viçosa, ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola pela oportunidade de formação.

A Universidad de los Llanos, pelo tempo e apoio durante meu processo de formação no Brasil.

A minha orientadora a professora Marisa Vieira de Queiroz pelo apoio, compressão, paciência, ensinamentos, pela possibilidade de trabalhar com esses micro-organismos maravilhosos e pelos momentos compartilhados nessa equipe linda, a família LGMM, obrigada sempre...

Ao professor Leandro pela coorientação, ensinamentos e pela possibilidade de fazer parte da equipe, foi maravilhoso fazer parte da família BIONEMA....

A minha coorientadora Thalita por cada um dos ensinamentos, pelo apoio, por cada palavra de ânimo e pelos momentos compartilhados, obrigada sempre.

A Hanna que me recebeu e me acompanhou nessa jornada, me ensinando e compartilhando muitos momentos felizes, obrigada pela amizade...

A Angélica (Gatona) pela amizade, ensinamentos, momentos felizes e apoio naqueles dias de luta...

Para a outra parte da minha família em Viçosa, que me acolheram, acompanharam e que sempre estavam dispostos a ajudar e ensinar: Argemiro, Cassia, Felipe, Fernanda, Gabriela, Huarlen, Janaina, Julio Leandro, Mirele, Misia, Osiel, Patricia, Paulo Rafael, Raissa, Shirley, Vitor, obrigada por fazer minha caminhada mais leve e pelos momentos lindos compartilhados...

Ao professor Mauricio pela generosidade e momentos compartilhados...

Ao Camilo, Daniel, Estiben, Jaime, Jhusua, Loren, Talissa, obrigada sempre por fazer parte das minhas recargas de energia e pelos momentos compartilhados toda vez que voltava para Colombia...

Aos meus amigos do café na Colombia Dalila, Erika, Jaime, Leonardo, obrigada por fazer meus dias da escrita muito mais leves.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola; também à secretária do programa, a Leticia e técnicos dos laboratórios e casa de vegetação, Guilherme e Delfin.

Pela ajuda e empréstimo da autoclave: Laboratório de Controle Biológico de Doenças de Plantas, professor Lucas e Hiago.

Pela ajuda e empréstimo do microscópio de fluorescência: Laboratório de Microbiologia Ambiental e Aplicada, professora Cynthia Canedo e Livia.

Pela concessão da bolsa de estudo de doutorado e apoio financeiro à Organização dos Estados Americanos OEA (Edital de bolsas de doutorado no Brasil para estudantes de países americanos), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq; à Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais - FAPEMIG.

Todos ficarão para sempre no meu coração

RESUMO

MOGOLLÓN-ORTIZ, Ángela María, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2021. **Controle biológico de *Meloidogyne javanica* por *Trichoderma* spp. e actinobactérias edáficas.** Orientadora: Marisa Viera de Queiroz. Coorientadores: Leandro Grassi de Freitas e Thalita Suelen Avelar Monteiro.

Os fungos do gênero *Trichoderma* e as actinobactérias são conhecidos pelo potencial no controle de fitopatógenos. No entanto, o papel de algumas espécies de *Trichoderma* spp. e dos isolados de actinobactérias do solo frente ao controle do nematoide das galhas *Meloidogyne javanica* ainda precisa ser melhor investigado. Os principais objetivos desse trabalho foram: selecionar isolados de *Trichoderma* spp. endofíticos das seringueiras e actinobactérias do solo com potencial de biocontrole frente ao nematoide das galhas *M. javanica* e confirmar alguns dos seus mecanismos de controle. Isolados de *Trichoderma* spp. foram avaliados quanto a capacidade de reduzir o número de ovos e galhas de *M. javanica* em experimentos sob condições de casa de vegetação e usando plantas susceptíveis de tomate da variedade Santa Cruz Kada. Foram selecionados os isolados *Trichoderma* sp. 22F e *T. erinaceum* 610F que apresentaram redução do número de ovos de 87 e 86 %, respectivamente, e de galhas de 39 e 37 %, respectivamente. Por outra parte, as actinobactérias usadas neste estudo corresponderam aos gêneros *Streptomyces*, *Kitasatospora*, *Kribbella* e *Lentzea*. As porcentagens de redução do número de ovos nas plantas tratadas com as actinobactérias *Kribbella* sp. 5N, *Kitasatospora* sp. 2AE, *Streptomyces* sp. 6O e *Streptomyces* sp. 4L foram acima do 50% para o número de ovos de *M. javanica* e de 28, 26, 25 e 16 % na redução do número de galhas com *Streptomyces* sp. 8S, *Streptomyces* sp. 4L, *Streptomyces* sp. 10U e *Kitasatospora* sp. 2AE, respectivamente. Entre os mecanismos de ação confirmados tanto em *Trichoderma* spp. quanto nas actinobactérias, se destacaram o parasitismo de ovos e a indução de respostas sistêmicas relacionadas com a defesa das plantas, além disso o efeito negativo sobre a penetração dos juvenis nas plantas tratadas também foi confirmado. Todas as actinobactérias apresentaram pelo menos um mecanismo de ação contra *M. javanica*. Foi confirmada a eficácia de biocontrole dos isolados do gênero *Streptomyces* e relatada pela primeira vez a eficácia de *T. erinaceum* 610F além de isolados dos gêneros *Kribbella* sp. 5N e *Kitasatospora* sp. 2AE contra *M. javanica*. Além disso, nas plantas tratadas com *Streptomyces* sp. 4L foi ativada a expressão dos

genes associados com as vias do ácido jasmônico e etileno. Os resultados confirmaram o potencial de biocontrole de isolados endofíticos do gênero *Trichoderma* e de actinobactérias do solo no controle do nematoide das galhas.

Palavras-chave: Biocontrole. Fitonematoide. *Trichoderma* spp. *Streptomyces* spp. *Kitasatospora* sp. *Kribbella* sp. *Lentzea* sp.

ABSTRACT

MOGOLLÓN-ORTIZ, Ángela María, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December, 2021. **Biological control of *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma* spp. and edaphic actinobacteria.** Adviser: Marisa Viera de Queiroz. Co-advisers: Leandro Grassi de Freitas and Thalita Suelen Avelar Monteiro.

Fungi of the genus *Trichoderma* and actinobacteria are known for their potential in controlling phytopathogens. However, the role of some species of *Trichoderma* spp. and the soil isolates actinobacteria against the control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* still needs to be further investigated. The main objectives of this work are: to select isolates of *Trichoderma* spp. endophytes of rubber trees and soil actinobacteria with potential for biocontrol against the root-knot nematode *M. javanica* and confirm some of its control mechanisms. *Trichoderma* spp. isolates were the ability to reduce the number of eggs and galls of *M. javanica* in plant experiments under greenhouse conditions using susceptible tomato plants of the Santa Cruz Kada variety. The isolates *Trichoderma* sp. 22F and *Trichoderma erinaceum* 610F were selected, which showed a reduction in the number of eggs of 87 and 86 %, respectively, and of galls of 39 and 37 %, respectively. On the other hand, the actinobacteria used in this study corresponded to the genera *Streptomyces*, *Kitasatospora*, *Kribbella* and *Lentzea*. The percentages of reduction in the number of eggs in plants treated with the actinobacteria *Kribbella* sp. 5N, *Kitasatospora* sp. 2AE, *Streptomyces* sp. 6O and *Streptomyces* sp. 4L were above 50% for the number of *M. javanica* eggs and 28, 26, 25 and 16 % for the reduction of the number of galls with *Streptomyces* sp. 8S, *Streptomyces* sp. 4L, *Streptomyces* sp. 10U and *Kitasatospora* sp. 2AE, respectively. Among the confirmed mechanisms of action in both *Trichoderma* spp. and in actinobacteria, egg parasitism and the induction of systemic responses related to plant defense stood out. Furthermore, the negative effect on the penetration of juveniles into the treated plants was also confirmed. All actinobacteria showed at least one mechanism of action against *M. javanica*. The biocontrol efficacy of *Streptomyces* isolates was confirmed and for the first time, the effectiveness of biocontrol of *T. erinaceum* 610F was reported, in addition to isolates of the genera *Kribbella* sp. 5N and *Kitasatospora* sp. 2AE against *M. javanica*. Furthermore, in plants treated with *Streptomyces* sp. 4L was activated the expression of genes associated with the jasmonic acid and ethylene pathways. The results confirmed the biocontrol potential of

endophytic isolates of the genus *Trichoderma* and soil actinobacteria in the control of root-knot nematode.

Keywords: Biocontrol. Phytonematode. *Trichoderma* spp. *Streptomyces* spp. *Kitasatospora* sp. *Kribbella* sp. *Lentzea* sp.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	12
Capítulo 1	13
<i>Trichoderma</i> spp. endofíticos de seringueiras no controle do nematoide das galhas <i>Meloidogyne javanica</i>	14
RESUMO	14
INTRODUÇÃO.....	15
MATERIAIS E MÉTODOS	16
Multiplicação do nematoide.....	16
Isolados e produção dos inóculos de <i>Trichoderma</i> spp.....	17
Interação Fungos-nematoide-planta em casa de vegetação	17
Parasitismo <i>in vitro</i> de ovos de <i>M. javanica</i> por <i>Trichoderma</i> spp.	18
Teste de penetração de juvenis de <i>M. javanica</i> em mudas de tomate	19
Raiz bipartida e a indução de defesas sistêmicas por <i>Trichoderma</i> spp. contra <i>M. javanica</i>	19
Análise estatística.....	20
RESULTADOS.....	20
Triagem de isolados do gênero <i>Trichoderma</i> endofíticos das seringueiras com potencial de biocontrole contra <i>M. javanica</i>	20
Efeito do tratamento de plantas de tomate com isolados de <i>Trichoderma</i> spp. sobre o número de ovos e galhas de <i>M. javanica</i>	21
Parasitismo de ovos de <i>M. javanica</i>	21
Redução da penetração de juvenis de <i>M. javanica</i> em plantas de tomate tratadas com isolados de <i>Trichoderma</i> spp.	22
Respostas sistêmicas de defesa reduzem o número de ovos de <i>M. javanica</i> nas plantas com raiz bipartida	22
DISCUSSÃO.....	23
<i>Trichoderma</i> spp. como agente de biocontrole de nematoides	23
O parasitismo de ovos	24
Isolados de <i>Trichoderma</i> sp. reduzem a penetração de juvenis de <i>M. javanica</i> em raízes de tomate	25
Ação sistêmica de <i>Trichoderma</i> spp. no número de ovos de <i>M. javanica</i>	25
REFERÊNCIAS	27
Capítulo 2.....	39

Potencial de diferentes espécies de actinobactérias no manejo de nematoide de galhas	40
RESUMO	40
INTRODUÇÃO.....	41
MATERIAL E MÉTODOS.....	44
Isolamento de actinobactérias	44
Identificação de actinobactérias pelo sequenciamento do gene do rRNA 16S	44
Controle de <i>M. javanica</i> com actinobactérias	46
Parasitismo <i>in vitro</i> de ovos de <i>M. javanica</i> por espécies de actinobactérias.....	46
Penetração de juvenis de <i>M. javanica</i> em mudas de tomate tratadas com actinobactérias.....	47
Método de raiz bipartida para avaliar a indução por actinobactérias de respostas relacionadas a resistência sistêmica da planta contra <i>M. javanica</i>	47
Teste de biocontrole e análises da expressão de genes de resistência	48
Extração de RNA	48
Expressão diferencial de genes por qPCR.....	48
Análise estatística.....	49
RESULTADOS.....	49
Identificação dos isolados	49
Controle de <i>M. javanica</i> com actinobactérias	50
Parasitismo de ovos e juvenis.....	50
Penetração de juvenis de <i>M. javanica</i> em mudas de tomate tratadas com actinobactérias.....	50
Indução de defesas sistêmicas da planta por actinobactérias contra <i>M. javanica</i> pelo método de raiz bipartida	51
DISCUSSÃO.....	52
As actinobactérias no controle de nematoides	52
Actinobactérias afetam a penetração de juvenis de <i>M. javanica</i>	54
REFERÊNCIAS	59
CONCLUSÕES.....	83

INTRODUÇÃO

Um dos patógenos mais importantes nas plantas cultivadas ao redor do mundo é o nematoide das galhas *Meloidogyne* spp., endoparasita obrigatório, sedentário com capacidade de induzir no hospedeiro alterações ao nível molecular, celular e histológico, dando lugar aos sintomas nas raízes, as galhas, afetando a absorção e a translocação de água, de nutrientes, o desenvolvimento da planta e o rendimento das culturas. Entre as estratégias de manejo do nematoide, os agentes de biocontrole têm demonstrado ser um componente importante dentro dos programas de manejo integrado.

Os microrganismos, como os fungos do gênero *Trichoderma*, *Pochonia* e *Purpureocillium* e as bactérias do gênero *Bacillus* são componentes ativos de produtos comerciais no Brasil para o controle do nematoide das galhas *Meloidogyne* spp. No entanto, novas espécies de *Trichoderma* e actinobactérias do gênero *Streptomyces*, o gênero de actinobactéria mais estudada visando ao controle de *Meloidogyne* spp., estão sendo considerados como potenciais agentes de controle do nematoide das galhas.

Isolados de *Trichoderma* spp. e *Streptomyces* spp. controlam as espécies de *Meloidogyne* spp. e mantêm as populações de nematoides baixas graças aos seguintes mecanismos de ação: produção de metabólitos nematicidas, parasitismo de ovos, competição pelo espaço e a indução de respostas de defesa da planta.

Levando em consideração a importância do uso de microrganismos dentro dos programas de manejo integrado e conhecendo o potencial de biocontrole de espécies do gênero *Trichoderma* e de actinobactérias do solo, os objetivos desse trabalho foram selecionar isolados endofíticos de *Trichoderma* spp. e actinobactérias do solo com potencial de biocontrole do nematoide das galhas *M. javanica*; confirmar alguns de seus mecanismos de ação empregados para o controle do nematoide das galhas e avaliar a expressão de genes relacionados à Resistência Sistêmica Induzida (RSI) e a Resistência Sistêmica Adquirida (RSA) nas plantas tratadas com o *Streptomyces* sp. 4L.

Capítulo 1

Trichoderma* spp. endofíticos de seringueiras no controle do nematoide das galhas *Meloidogyne javanica

Trichoderma* spp. endofíticos de seringueiras no controle do nematoide das galhas *Meloidogyne javanica

Ángela M. Mogollón-Ortiz¹, Leandro G. de Freitas², Thalita A. Monteiro², Hanna Lorena Alvarado Moreno ¹ e Marisa V de Queiroz^{1*}

¹Departamento de Microbiologia – Bioagro, Universidade Federal de Viçosa, Av. PH: Rolfs s/n, Campus Universitário, Viçosa, CEP 36570 900 MG, Brazil

²Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Av. PH: Rolfs s/n. Campus Universitário, Viçosa, CEP 36570 900 MG, Brazil

*Corresponding author: M. V. de Queiroz; E-mail: mvqueiro@ufv.br

RESUMO

Fungos do gênero *Trichoderma* estão entre os fungos mais estudados no controle biológico de fitonematoides, porém algumas espécies de *Trichoderma* ainda precisam ser melhor estudadas no controle de nematoides das galhas. O objetivo desse estudo foi avaliar o potencial de biocontrole de *Meloidogyne javanica* por isolados endofíticos de *Trichoderma* spp. Em experimentos sob condições de casa de vegetação e usando plantas de tomate susceptíveis foram realizadas duas triagens. Na primeira triagem foram avaliados 20 isolados de *Trichoderma* spp. A partir dos resultados obtidos, seis isolados (*T. erinaceum* 20F, *Trichoderma* sp. 22F, *T. koningiopsis* 245F, *T. koningiopsis* 815F; *T. koningiopsis* 265F e *T. erinaceum* 610F) foram selecionados pelas reduções no número de ovos e galhas do nematoide e usados em uma segunda triagem. Os isolados *T. erinaceum* 610F e *Trichoderma* sp. 22F se destacaram pela redução dos ovos e galhas e foram usados em experimentos posteriores de parasitismo de ovos *in vitro*, penetração de juvenis em raízes e indução de respostas sistêmicas de defesa pela técnica de raiz bipartida. Foram obtidas porcentagens de redução de ovos acima do 83% com os isolados na segunda triagem. O parasitismo *in vitro* de ovos de *M. javanica* foi verificado com isolados expressando a proteína vermelha fluorescente (PVF), *T. erinaceum* 610F-PVF e *Trichoderma* sp. 22F-PVF. Somente 39 e 41 % de juvenis nas plantas tratadas com *T. erinaceum* 610F

e *Trichoderma* sp. 22F, respectivamente, conseguiram penetrar as raízes de tomate, comparados com 73% do controle, sem o tratamento com os fungos, e foram demonstradas reduções do número de ovos acima de 32% no experimento de raiz bipartida. Nossos resultados confirmam o potencial dos isolados *T. erinaceum* 610F e *Trichoderma* sp. 22F endofíticos das seringueiras no controle do nematoide *M. javanica*.

Palavras chaves: Fitonematoide, biocontrole, fungos, galhas.

INTRODUÇÃO

O nematoide das galhas *Meloidogyne* spp. ocupa a primeira posição entre os nematoides mais importantes distribuídos ao redor do mundo, ocasionando perdas econômicas consideráveis nas plantas cultivadas (Moens et al., 2009; Sasser, 1977) Como consequência da infecção e para completar seu ciclo de vida, o nematoide *Meloidogyne* spp., endoparasita sedentário, induz nas raízes do hospedeiro um sitio de alimentação permanente constituído por células gigantes que fornecem os nutrientes necessários durante o ciclo de vida do nematoide (Escobar et al., 2015). Como resultado das alterações nas células das raízes são visíveis os sintomas característicos, as galhas (Rodiuc et al., 2014; Yan et al., 2021), afetando a absorção de água e nutrientes e como consequência o desenvolvimento das plantas e o rendimento das culturas (Mukhtar, 2018; Navarrete et al., 2018)

Como parte do manejo integrado do nematoide, o controle biológico de fitonematoides tem ganhado cada vez mais destaque (Carneiro et al., 2020). Os agentes de controle biológico fúngicos contra o nematoide das galhas são usados no tratamento de sementes (Patil et al., 2021), aplicados ao solo (Al-Hazmi & TariqJaveed, 2016; Yan et al., 2021) e incorporados nas raízes das plantas pela imersão em suspensão de esporos (Sahebani & Hadavi, 2008).

Entre os agentes de biocontrole, as espécies do gênero *Trichoderma* são excelentes candidatas a agentes de controle biológico de nematoides, pois estes fungos conseguem afetar o ciclo inteiro da doença causada pelo nematoide das galhas, desde a infecção, a formação das galhas e a reprodução (Fan et al., 2020; Martínez-Medina et al., 2017; Mukhtar, 2018; Yan et al., 2021). Além dessas

características, a maioria das espécies de *Trichoderma* é de fácil produção, o que facilita a aplicação em grande escala (Mulatu et al., 2021)

Muitas pesquisas vêm sendo desenvolvidas ao longo dos anos sobre os mecanismos de ação utilizados por espécies de *Trichoderma* contra o nematoide das galhas. Entre os mecanismos são conhecidos a antibiose com a produção de metabolitos nematicidas (Khan et al., 2020), o parasitismo de ovos (Sharon et al., 2001, 2007, 2011), que inclui inicialmente o crescimento das hifas dos fungos que crescem ao redor dos ovos e no momento da penetração formam estruturas como apressórios (Sharon et al., 2007), a competição por espaço (Bogner et al., 2016; Medeiros et al., 2017; Sharon et al., 2007) e a indução de respostas sistêmicas de defesa da planta contra os nematoides (Martínez-Medina et al., 2017; Medeiros et al., 2017). Diferentes espécies do gênero *Trichoderma* foram estudadas no controle do nematoide das galhas, entre elas: *T. harzianum* (Medeiros et al., 2017; Mukhtar, 2018; Sharon et al., 2001; Yan et al., 2021), *T. viride* (Mukhtar, 2018), *T. asperellum* (Sharon et al., 2007), *T. atroviride* (Medeiros et al., 2017), *T. koningiopsis* (Baldoni et al., 2020) e *T. citrinoviride* (Fan et al., 2020; Sharon et al., 2007). No entanto, muitas outras espécies ainda precisam ser estudadas no controle do *Meloidogyne* spp.

Espécies de *Trichoderma* foram isoladas, recentemente, como endofíticas da seringueira, na floresta amazônica. Muitas dessas espécies ainda não foram testadas no controle de nematoide das galhas. O objetivo deste estudo foi selecionar isolados do gênero *Trichoderma* endofíticos das seringueiras com potencial para o controle de *M. javanica*, avaliando diferentes mecanismos de ação, parasitismo de ovos, penetração de juvenis em raízes e na indução de respostas defesas sistêmicas no controle do nematoide das galhas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Multiplicação do nematoide

O inóculo de *M. javanica* para os experimentos *in vivo* e *in vitro* foi multiplicado em plantas susceptíveis de tomate da variedade Santa Cruz Kada em casa de vegetação. A extração de ovos foi realizada segundo a técnica de Hussey e Barker (1973) modificada por Bonetti & Ferraz, (1981).

Isolados e produção dos inóculos de *Trichoderma* spp.

Em experimentos sob condições de casa de vegetação, 20 isolados do gênero *Trichoderma* coletados e isolados de folhas, caule e raízes de seringueira *Hevea guianensis* (Araújo et al., 2018) e *H. brasiliensis* (Araújo et al., 2020) e identificados taxonomicamente por Brito (2017) foram usados em uma primeira triagem contra o nematoide das galhas (Tabela 1), e posteriormente seis isolados: *T. erinaceum* 20F, *Trichoderma* sp. 22F, *T. koningiopsis* 245F, *T. koningiopsis* 265F, *T. erinaceum* 610F, *T. koningiopsis* 815F foram selecionados e usados em uma segunda triagem. Os isolados fazem parte da micoteca do Laboratório de Genética Molecular de Microrganismos/Bioagro da Universidade Federal de Viçosa.

Os isolados de *Trichoderma* spp. foram multiplicados em sacos de polipropileno contendo grãos de arroz (30 g) esterilizados por autoclavagem (120°C, 20 min). Os fungos foram previamente cultivados em BDA (Batata dextrose ágar) a 28°C durante 7 dias. Quatro discos de micélio de 5 mm de diâmetro foram transferidos para sacos de arroz esterilizados e mantidos 28°C durante 8 dias em uma incubadora B.O.D. FANEM Mod 347. Em seguida, os conídios foram quantificados em câmara de Neubauer e a concentração de inóculo (número de conídios) foi ajustada para os experimentos interação fungo-nematoide-planta.

Interação Fungos-nematoide-planta em casa de vegetação

Em momentos diferentes, foram realizadas duas triagens em condições de casa de vegetação, a primeira triagem (I) permitiu selecionar os isolados com potencial de biocontrole de *M. javanica* e que foram usados na segunda triagem (II). Para ambos experimentos, mudas de tomate da variedade Santa Cruz Kada com 5 semanas após a germinação das sementes foram transplantadas para vasos com capacidade de 200 g (triagem I) e 1,5 kg (triagem II) preenchidos com substrato constituído de solo do horizonte C e areia na proporção 1:1 (V:V) autoclavado (121°C, 2h). As plântulas de tomate foram previamente cultivadas em substrato comercial Tropstrato®. No momento do transplante das mudas foram aplicados os tratamentos ao solo. Na triagem I os tratamentos foram constituídos por 20 isolados (tabela 1) além do tratamento com *Pochonia chlamydosporia* (produto comercial Rizotec®) e o controle (água). Devido ao maior número de tratamentos foram usados vasos menores. Na

triagem II os tratamentos foram: Controle (água) (I); *T. erinaceum* 20F (II); *Trichoderma* sp. 22F (III); *T. koningiopsis* 245F (IV); *T. koningiopsis* 265F (V); *T. erinaceum* 610F (VI); *T. koningiopsis* 815F (VII); *P. chlamydosporia* (produto comercial Rizotec®) (VIII). Nas parcelas que receberam os isolados do gênero *Trichoderma*, foram adicionadas 2×10^4 conídios.g⁻¹ de solo e as parcelas do tratamento com Rizotec® receberam 5000 clamidospóros.g⁻¹. Cinco dias após do tratamento com os fungos, todas as parcelas foram infestadas com 1000 (triagem I) e 800 (triagem II) ovos de *M. javanica*. As plantas permaneceram em casa de vegetação durante 45 dias. Em seguida foram avaliadas para cada experimento as variáveis: número de ovos e galhas por grama de raiz.

Foi adotado um delineamento inteiramente casualizado em cada experimento com oito (triagem I) e sete (triagem II) repetições por tratamento.

Parasitismo *in vitro* de ovos de *M. javanica* por *Trichoderma* spp.

Foram selecionados os isolados *T. erinaceum* 610F e *Trichoderma* sp. 22F para os experimentos de parasitismo. Os fungos foram previamente transformados com o gene da proteína vermelha fluorescente (Alvarado-Moreno, 2021). A interação dos fungos e ovos de *M. javanica* foi verificada em placas de Petri com 2% de ágar-água contendo estreptomicina (Monteiro et al., 2020). Os isolados de *Trichoderma* spp. foram cultivados durante 3 dias, em seguida, as placas receberam 90 ovos de *M. javanica* previamente desinfestados com soluções contendo diferentes antibióticos. Inicialmente os ovos foram colocados em uma solução de nistatina 100000 UI+ clorafenicol 0,12% + penicilina 0,02% durante 20 minutos. Em seguida, os ovos foram transferidos para uma nova solução contendo Cloratina 4% por 20 min e posteriormente duas vezes uma solução de cloranfenicol 0,03% + ampicilina 0,02% durante 20 min cada. Após as limpezas com os antibióticos, foram lavados três vezes com água destilada estéril (ADE). O processo foi realizado em tubos estéreis de 2 mL. Após três semanas da interação fungo-nematoide, imagens foram capturadas em microscópio de fluorescência Invitrogen™ EVOS™ M5000.

Teste de penetração de juvenis de *M. javanica* em mudas de tomate

Potes plásticos foram preenchidos com 60 g de substrato comercial Tropstrato®, previamente autoclavado (121°C, 2 h). Sementes de tomate Santa Cruz Kada foram semeadas e quando as plântulas alcançaram um par de folhas, elas receberam os seguintes tratamentos: Controle (água) (I); *Trichoderma* sp. 22F (II); *T. erinaceum* 610F (III). Nas parcelas com fungo foram adicionados 2×10^4 conídios.g⁻¹ de solo. Cinco dias após da aplicação dos fungos, todas as parcelas foram infestadas com 100 juvenis de *M. javanica* e 10 dias depois foi avaliada a variável número de juvenis que penetraram nas raízes. A coloração dos nematoides no sistema radicular das plantas foi feita com fucsina ácida segundo a técnica de Bybd et al. (1983).

Foi adotado um delineamento inteiramente casualizado com 6 repetições por tratamento.

Raiz bipartida e a indução de defesas sistêmicas por *Trichoderma* spp. contra *M. javanica*

O efeito indireto dos isolados *T. erinaceum* 610F e *Trichoderma* sp. 22F contra *M. javanica* foi realizado usando o método de raiz bipartida (Medeiros et al., 2017; Rubio et al., 2019). As mudas de tomate Santa Cruz Kada foram transplantadas para recipientes plásticos com capacidade de 250 g preenchidos com substrato constituído por solo do horizonte C e areia em uma proporção 1:1 horizonte (V:V), 5 semanas após da germinação. No momento do transplante, as raízes foram separadas em duas partes iguais, porém ainda unidas à planta e transplantadas em copos separados. Nas parcelas com fungo, foram adicionados 2×10^4 conídios.g⁻¹ de solo em uma das metades das raízes e na outra metade foram aplicados 500 ovos de *M. javanica*. No tratamento controle em uma das metades foi adicionada água e na outra metade o nematoide.

As plantas foram mantidas em casa de vegetação durante 34 dias após a aplicação dos nematoides. Em seguida, foi avaliada a variável número de ovos de *M. javanica*. O delineamento foi inteiramente casualizado com 8 repetições.

Análise estatística

Os dados foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste Scott-Knott ou Tukey. Foi usado o software Sisvar 5.6.

Alguns dados foram transformados:

Os dados do número de ovos de *M. javanica* por grama de raiz da triagem II foram transformados com raiz quadrada e os dados do número de galhas foram transformados com Ln X (Figura 1).

Os dados de porcentagem de penetração de juvenis de *M. javanica* foram transformados com Log X (Figura 3).

Os dados do número de ovos de *M. javanica* em plantas de tomate com raiz bipartida foram transformados com raiz quadrada (Figura 4).

RESULTADOS

Triagem de isolados do gênero *Trichoderma* endofíticos das seringueiras com potencial de biocontrole contra *M. javanica*

Nossos resultados demonstraram o potencial de biocontrole dos isolados do gênero *Trichoderma* endofíticos das seringueiras contra o nematoide das galhas *M. javanica* em plantas de tomate sob condições de casa de vegetação (Tabela 2). Do total de 20 isolados analisados, as reduções significativas do número de ovos e galhas foram alcançadas com um total 14 e 16 isolados, respectivamente, comparado com o tratamento controle, no entanto, somente seis isolados foram selecionados para futuros experimentos os quais apresentaram reduções acima de 27% que corresponderam a valores menores que 95314 ovos e 112 galhas por grama de raiz.

Os isolados selecionados pela maior redução do número de ovos foram *T. erinaceum* 610F, *T. koningiopsis* 245F, *Trichoderma* sp. 22F e *T. koningiopsis* 265F que se destacaram com porcentagens de redução de 74, 32, 28 e 28%, respectivamente, e apresentaram médias de 34.376, 89.907, 94.501 e 95.314 ovos por grama de raiz, sem diferença do tratamento com Rizotec® e significativamente menores em relação ao tratamento controle (Tabela 2). Por outro lado, os isolados *T. erinaceum* 610F, *T. koningiopsis* 245F, *Trichoderma* sp. 22F, além do *T. erinaceum* 20F e *T. koningiopsis* 815F, conseguiram reduzir significativamente o número de

galhas nas plantas tratadas. As porcentagens de redução do número de galhas por grama de raiz foram de 60, 34, 32, 28 e 27 % para *T. erinaceum* 610F, *T. koningiopsis* 245F, *T. koningiopsis* 815F, *T. erinaceum* 20F e *Trichoderma* sp. 22F, respectivamente, que corresponderam a valores de 61, 102, 105, 111, 112 galhas. Esses foram valores significativamente menores do que o obtido no tratamento controle (Tabela 1).

Efeito do tratamento de plantas de tomate com isolados de *Trichoderma* spp. sobre o número de ovos e galhas de *M. javanica*

A eficácia dos isolados de *Trichoderma* spp. endofíticos de seringueira selecionados no controle de *M. javanica* foi confirmada em uma segunda triagem (Figura 1). Nas plantas tratadas com os isolados *Trichoderma* sp. 22F, *T. erinaceum* 610F e *T. erinaceum* 20F as porcentagens de redução do número de ovos comparado com o controle foram de 87, 86 e 83%, porcentagens que corresponderam com os valores de 3.281, 3.554 e 4.519 ovos por grama de raiz, respectivamente (Figura 1). Os outros isolados e o tratamento com Rizotec® apresentaram porcentagens de redução de ovos entre 34-52 %, sem diferenças significativas em relação ao tratamento controle (Figura 1).

Para a variável número de galhas, os isolados *Trichoderma* sp. 22F, *T. erinaceum* 610F e *T. erinaceum* 20F, junto com o tratamento Rizotec® foram eficientes na redução do número de galhas com porcentagens de redução de 37, 24, 22 e 39 % que corresponderam aos valores de número de galhas por grama de raiz de 26, 31, 32 e 25, respectivamente, comparado com o tratamento controle (Figura 1). Os isolados *T. erinaceum* 610F e *Trichoderma* sp. 22F foram selecionados para os testes de parasitismo de ovos de *M. javanica in vitro*, para determinar o efeito dos fungos sobre a penetração de juvenis em raízes de tomate e para avaliar a indução de respostas de defesas sistêmicas em experimentos de plantas com raiz bipartida.

Parasitismo de ovos de *M. javanica*

O parasitismo de ovos de *M. javanica* é um mecanismo conhecido por *Trichoderma* spp. e foi confirmado com os isolados transformados com gene da proteína vermelha fluorescente usados neste estudo. As hifas dos transformantes *T.*

erinaceum 610F-PVF e *Trichoderma* sp. 22F-PVF foram observadas no interior dos ovos de *M. javanica*, demonstrando claramente o parasitismo dos ovos do nematoide e como consequência a perda de viabilidade dos ovos (Figura 2 a, b).

Redução da penetração de juvenis de *M. javanica* em plantas de tomate tratadas com isolados de *Trichoderma* spp.

O tratamento preventivo com os fungos *T. erinaceum* 610F e *Trichoderma* sp. 22F reduziram a porcentagem de juvenis de *M. javanica* que penetraram nas raízes das plantas de tomate 10 dias após a inoculação com os juvenis (Figura 3). As porcentagens de juvenis que penetraram as raízes foram 39 e 41% para as plantas tratadas com *T. erinaceum* 610F e *Trichoderma* sp. 22, respectivamente, comparado com o tratamento controle onde 73 % dos nematoides conseguiram penetrar. Os resultados demonstraram a menor penetração de juvenis (Figura 3), resultado que pode explicar uma das causas do menor número de galhas desenvolvidas e o menor número de ovos do nematoide das galhas nas plantas tratadas com os isolados de *Trichoderma* spp. (Figura 1).

Respostas sistêmicas de defesa reduzem o número de ovos de *M. javanica* nas plantas com raiz bipartida

Além do efeito direto contra o nematoide confirmado com o parasitismo de ovos (Figura 2), foi confirmada a indução de respostas de defesa sistêmicas usando a técnica de raiz bipartida nas plantas de tomate. Nas plantas tratadas com os isolados *T. erinaceum* 610F e *Trichoderma* sp. 22F em sua porção oposta da raiz foi detectada a redução do número de ovos de *M. javanica* em 41 e 32 %, respectivamente, comparado com o tratamento controle. Sem ter contato direto dos fungos com o nematoide, os fungos conseguiram induzir a redução do número de ovos de *M. javanica* (Figura 4).

DISCUSSÃO

***Trichoderma* spp. como agente de biocontrole de nematoides**

As espécies do gênero *Trichoderma* são parte dos componentes ativos de biodefensivos usados no controle de fitopatógenos (Zin & Badaluddin, 2020). Frente aos fitonematoides, diferentes espécies têm sido relatadas como agentes de biocontrole do nematoide das galhas *Meloidogyne* spp. e incluem *T. asperellum* (Hernández-Ochandía et al., 2015), *T. atroviride* (Medeiros et al., 2017), *T. citrinoviride* (Fan et al., 2020), *T. harzianum* (Mukhtar, 2018; Yan et al., 2021) e *T. viride* (Mukhtar, 2018). No entanto, outras espécies precisam ser estudadas para o controle do nematoide das galhas. Nós estamos demonstrando pela primeira vez o potencial de biocontrole do fungo *T. erinaceum* 610F, além do isolado *Trichoderma* sp. 22F para o controle de *M. javanica*. Os isolados foram selecionados pelas maiores porcentagens de redução do número de ovos e galhas de *M. javanica* com porcentagens acima do 83 e 37%, respectivamente. Nossos resultados conseguiram reduções superiores a relatos prévios que mostram reduções do 42% no número de galhas e reduções do 60% no número de massas de ovos de *M. javanica* em plantas de tomate tratadas com *T. atroviride* (Medeiros et al., 2017), além disso, em plantas de tomate tratadas com *T. citrinoviride* a eficiência de biocontrole do *M. incognita* foi do 50% (Fan et al., 2020) e de 62% com *T. harzianum* (Yan et al., 2021).

Nossos resultados fornecem informações da ação combinada de alguns mecanismos de ação da espécie *T. erinaceum* 610F e do isolado *Trichoderma* sp. 22F contra o nematoide das galhas *M. javanica*, que explicam as reduções na capacidade reprodutiva e na formação de galhas do nematoide *M. javanica*. Entre os mecanismos confirmados se incluem o parasitismo de ovos (Figura 2), a capacidade de agir de forma sistêmica contra o nematoide (Figura 4), além do efeito negativo sobre a penetração dos juvenis nas raízes das plantas tratadas (Figura 3). Previamente foram relatados alguns mecanismos de ação das espécies de *Trichoderma* contra *Meloidogyne* spp. e incluem o parasitismo de ovos de *Meloidogyne* spp. (Sharon et al., 2001, 2007), a indução de respostas de defesa contra o nematoide das galhas (Martinez-Medina et al., 2013; Medeiros et al., 2017; Yan et al., 2021) e a produção de compostos nematicidas (Cristóbal-Alejo et al., 2018; Khan et al., 2020).

O parasitismo de ovos

Os ovos do *Meloidogyne* spp. constituem uma fonte importante de inoculo do nematoide (Moens et al., 2009). As estratégias que afetam a viabilidade e o desenvolvimento dos ovos constituem uma excelente alternativa de controle do nematoide das galhas e incluem os fungos parasitas de ovos do gênero *Trichoderma* (Sharon et al., 2007, 2011). O uso de fungos transformantes com genes que codificam proteínas fluorescentes permite confirmar o parasitismo de ovos (Sharon et al., 2007). Nós confirmamos o parasitismo de ovos de *M. javanica* sob condições *in vitro* com o uso de fungos transformados com os genes que codificam para a proteína vermelha fluorescente *T. erinaceum* 610F-PVF e *Trichoderma* sp. 22F-PVF. Resultados que coincidem com relatos prévios que confirmam a capacidade das espécies *T. atroviride* e *T. asperellum* para atravessar a matriz gelatinosa, substância onde são mantidos os ovos externamente na raiz, até atingir os ovos de *M. javanica*, penetrando a casca (Sharon et al., 2001, 2007), principal barreira de proteção, constituída por várias camadas que incluem uma membrana vitelina externa, uma camada de quitina e uma camada lipídica interna (Bird & McClure, 1976).

A produção de enzimas líticas tem sido relatada para estar relacionada com o sucesso do parasitismo de ovos de nematoides. A importância do sistema enzimático das espécies *Trichoderma* no parasitismo de ovos de nematoides têm sido estudada por vários anos (Sharon et al., 2001, 2007; Suarez et al., 2004; Szabó et al., 2012). O conhecimento dos componentes da casca dos ovos destaca a importância do estudo das enzimas líticas no processo de parasitismo. Isolados selvagens de *T. harzianum* e transformantes com várias cópias do gene da proteinase Prb1 demonstraram parasitismo de ovos na matriz gelatinosa *in vitro*, sendo que as maiores reduções do número de galhas observadas em plantas de tomate tratadas foram obtidas com os fungos transformantes, quando comparadas com o tratamento controle e os isolados selvagens (Sharon et al., 2001). Por outro lado, a expressão dos genes que codificam enzimas quitinolíticas de *T. harzianum* durante o processo de parasitismo de ovos do nematoide modelo *Caenorhabditis elegans* foi demonstrada. Durante as primeiras horas após da infecção dos ovos a expressão dos genes *chi18-12* e *chi18-5* foi significativamente aumentada (Szabó et al., 2012), confirmando a importância das enzimas líticas no controle do nematoide.

Isolados de *Trichoderma* sp. reduzem a penetração de juvenis de *M. javanica* em raízes de tomate

Além do parasitismo de ovos, nossos resultados demonstraram que o tratamento preventivo das raízes de tomateiro com os fungos *T. erinaceum* 610F e *Trichoderma* sp. 22F afetaram a penetração de juvenis de *Meloidogyne* spp., e um menor número de juvenis no interior das raízes foram quantificados. Estudos prévios confirmaram a capacidade do transformante GFP-*T. asperellum* de afetar os sítios de penetração do *M. javanica* e como consequência menor número de galhas foram desenvolvidas nas plantas tratadas (Sharon et al., 2007). Além disso, o crescimento endofítico de *T. atroviride* foi confirmado no apoplasto, o que ocasionou competição direta pelo sítios de alimentação do nematoide, a redução do número de galhas e a redução dos danos causados pelo nematoide (Medeiros et al., 2017). Por outro lado, o uso de *T. asperellum* endofítico de tomate também afetou a penetração de *M. incognita* nas plantas de tomate tratadas (Bogner et al., 2016). Estudos mais recentes usando o mesmo isolado transformante *T. erinaceum* 610F-PVF demonstraram o crescimento endofítico do fungo em plantas de feijão e o controle de *Colletotrichum lindemuthianum* (Alvarado-Moreno, 2021), demonstrando o potencial desse isolado em controlar diferentes fitopatógenos. No entanto, a redução da penetração dos juvenis nas plantas tratadas com fungos do gênero *Trichoderma* pode estar relacionada com a indução de respostas sistêmicas.

Ação sistêmica de *Trichoderma* spp. no número de ovos de *M. javanica*

Algumas espécies de *Trichoderma* conseguem proteger as plantas dos patógenos gerando uma pré-ativação de diferentes mecanismos de defesa de maneira que quando acontece o ataque dos patógenos, as respostas de defesa da planta são ativadas de forma mais rápida e eficiente (Hermosa et al., 2012; Van Wees et al., 2008). Uma das estratégias para confirmar a indução de defesas sistêmicas pelos agentes de biocontrole contra o *Meloidogyne* spp. é o uso do sistema de raiz bipartida, (Martinez-Medina et al., 2013; Medeiros et al., 2017). Neste estudo, *T. erinaceum* 610F e *Trichoderma* sp. 22F foram inoculados separadamente do nematoide *M. javanica* usando o sistema de raiz bipartida e os resultados demonstraram a redução do número de ovos de *M. javanica*, 34 dias após a infecção do nematoide, confirmando

a indução de respostas de defesa na planta. Estudos prévios conduzidos por Martinez-Medina et al. (2013) e Medeiros et al., (2017) demonstraram a redução do número de galhas de *M. incognita* em raízes de tomate quando o *T. harzianum* ou *T. atroviride*, respectivamente, foram inoculados separadamente do nematoide em uma das metades das raízes.

Martinez-Medina et al. (2013) mostraram que as plantas pré-tratadas com *T. harzianum* em uma das metades das raízes, responderam com maior expressão dos genes *PR1a* e *PR-P6* induzidos durante a etapa de invasão do nematoide atrasando e reduzindo a penetração dos juvenis. A expressão de defesas dependentes do ácido jasmônico nas mesmas plantas afetou o desenvolvimento do nematoide e a fecundidade das fêmeas de *M. incognita* afetando também o desenvolvimento dos ovos do nematoide (Martinez-Medina et al., 2013). Além disso, as respostas defesas induzidas nas plantas interferiram na migração do nematoides e no estabelecimento dos sítios de alimentação nas raízes, resultando em menor número de galhas (Medeiros et al., 2017).

Os relatos da indução de resistência da espécie *T. erinaceum* em plantas de tomate foram confirmadas contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. As plantas tratadas com *T. erinaceum* apresentaram aumento da expressão de genes relacionados com enzimas antioxidantes, respostas que favoreceram a redução de espécies reativas de oxigênio, H₂O₂ e o reforço da parede celular, além disso, a ativação da expressão de proteínas PR, quitinases e glucanases foi confirmada (Aamir et al., 2019). No entanto, relatos dirigidos ao controle de nematoides ainda não foram publicados.

O controle de outros tipos de patógenos do solo com isolados da espécie de *T. erinaceum* por outros mecanismos de ação foram demonstrados. Foi observado o micoparasitismo *in vitro* contra *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium oryzae*. Além disso, plantas de arroz tratadas apresentaram menor incidência das doenças (Swain et al., 2018). O antagonismo do agente de biocontrole *T. erinaceum* ao patógeno do solo *Pythium myriotylum*, agente causal da podridão da raiz também foi observado. O fungo *inibiu* o crescimento do patógeno *in vitro* e a atividade antimicrobiana foi atribuído pela confirmação das atividade das enzimas celulases, xilanasas e proteases produzidas pelo fungo (Tchameni et al., 2019). Apesar de ter sido estudado contra outros patógenos habitantes de solo, essa é a primeira vez que *T. erinaceum* é investigado no controle de fitonematoides.

Os fungos *T. erinaceum* 610F e *Trichoderma* spp. 22F endofíticos da seringueira conseguiram controlar de maneira eficiente o nematoide das galhas *M. javanica* em plantas de tomate. Como os mecanismos de ação dos fungos contra o nematoide foram confirmados (parasitismo de ovos, redução da penetração dos juvenis na raiz) e houve indução de defesas sistêmicas, esses fungos são ótimos candidatos a agentes de controle do nematoides das galhas.

REFERÊNCIAS

- Aamir, M., Kashyap, S. P., Zehra, A., Dubey, M. K., Singh, V. K., Ansari, W. A., Upadhyay, R. S., & Singh, S. (2019). *Trichoderma erinaceum* Bio-Priming Modulates the WRKYs Defense Programming in Tomato Against the *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) Challenged Condition. *Frontiers in Plant Science*, 30, 10:901. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00911>
- Al-Hazmi, A. S., & TariqJaveed, M. (2016). Effects of different inoculum densities of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* against *Meloidogyne javanica* on tomato. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23(2), 288-292. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.04.007>
- Araújo, K. S., Brito, V. N., Veloso, T. G. R., Leite, T. de S., Pereira, O. L., Mizubuti, E. S. G., & Queiroz, M. V. de. (2018). Diversity of culturable endophytic fungi of *Hevea guianensis*: A latex producer native tree from the Brazilian Amazon. *African Journal of Microbiology Research*, 12(42), 953-964. <https://doi.org/10.5897/AJMR2018.8980>
- Araújo, K. S., Brito, V. N., Veloso, T. G. R., de Leite, T. S., Alves, J. L., da Hora Junior, B. T., Moreno, H. L. A., Pereira, O. L., Mizubuti, E. S. G., & de Queiroz, M. V. (2020). Diversity and distribution of endophytic fungi in different tissues of *Hevea brasiliensis* native to the Brazilian Amazon forest. *Mycological Progress*, 19(10), 1057-1068. <https://doi.org/10.1007/s11557-020-01613-4>
- Baldoni, D. B., Antonioli, Z. I., Mazutti, M. A., Jacques, R. J. S., Dotto, A. C., de Oliveira Silveira, A., Ferraz, R. C., Soares, V. B., & de Souza, A. R. C. (2020). Chitinase production by *Trichoderma koningiopsis* UFSMQ40 using solid state fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology*, 51(4), 1897-1908. <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00334-w>

- Bird, A. F., & McClure, M. A. (1976). The tylenchid (Nematoda) egg shell: Structure, composition and permeability. *Parasitology*, 72(1), 19-28. <https://doi.org/10.1017/S0031182000043158>
- Bogner, C. W., Kariuki, G. M., Elashry, A., Sichtermann, G., Buch, A.-K., Mishra, B., Thines, M., Grundler, F. M. W., & Schouten, A. (2016). Fungal root endophytes of tomato from Kenya and their nematode biocontrol potential. *Mycological Progress*, 15(3), 30. <https://doi.org/10.1007/s11557-016-1169-9>
- Bonetti, J., & Ferraz, J. B. S. (1981). Modificações do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* em raízes de cafeeiro. *Undefined. Fitopatologia Brasileira*, 6(3): 553.
- Bybd, D. W., Kirkpatrick, T., & Barker, K. R. (1983). An Improved Technique for Clearing and Staining Plant Tissues for Detection of Nematodes. *Journal of Nematology*, 15(1), 142-143. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2618249/>
- Cristóbal-Alejo, J., Cetz-Chi, J. I., Tún-Suárez, J. M., Moo-Koh, F. A., Peraza-Luna, F. A., Candeleró-De la Cruz, J., Cristóbal-Alejo, J., Cetz-Chi, J. I., Tún-Suárez, J. M., Moo-Koh, F. A., Peraza-Luna, F. A., & Candeleró-De la Cruz, J. (2018). Filtrados fúngicos de *Trichoderma* con actividad nematocida contra *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood. *Revista de Protección Vegetal*, 33(3). http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1010-27522018000300005&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Escobar, C., Barcala, M., Cabrera, J., & Fenoll, C. (2015). Chapter One—Overview of Root-Knot Nematodes and Giant Cells. En C. Escobar & C. Fenoll (Eds.), *Advances in Botanical Research* (Vol. 73, pp. 1-32). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.abr.2015.01.001>
- Fan, H., Yao, M., Wang, H., Zhao, D., Zhu, X., Wang, Y., Liu, X., Duan, Y., & Chen, L. (2020). Isolation and effect of *Trichoderma citrinoviride* Snef1910 for the biological control of root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *BMC Microbiology*, 20, 299. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01984-4>
- Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I., & Monte, E. (2012). Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology (Reading, England)*, 158(Pt 1), 17-25. <https://doi.org/10.1099/mic.0.052274-0>
- Hernández-Ochandía, D., Rodríguez, M. G., Peteira, B., Miranda, I., Arias, Y., & Martínez, B. (2015). Efecto de cepas de *Trichoderma asperellum* Samuels,

- Lieckfeldt y Nirenberg sobre el desarrollo del tomate y *Meloidogyne incognita* (Kofoid y White) Chitwood. *Revista de Protección Vegetal*, 30(2), 139-147.
- Khan, R. A. A., Najeeb, S., Mao, Z., Ling, J., Yang, Y., Li, Y., & Xie, B. (2020). Bioactive Secondary Metabolites from *Trichoderma* spp. Against Phytopathogenic Bacteria and Root-Knot Nematode. *Microorganisms*, 8(3), 401. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8030401>
- Martínez-Medina, A., Fernandez, I., Lok, G. B., Pozo, M. J., Pieterse, C. M. J., & Van Wees, S. C. M. (2017). Shifting from priming of salicylic acid- to jasmonic acid-regulated defences by *Trichoderma* protects tomato against the root knot nematode *Meloidogyne incognita*. *The New Phytologist*, 213(3), 1363-1377. <https://doi.org/10.1111/nph.14251>
- Martinez-Medina, A., Fernandez, I., Sánchez-Guzmán, M. J., Jung, S. C., Pascual, J. A., & Pozo, M. J. (2013). Deciphering the hormonal signalling network behind the systemic resistance induced by *Trichoderma harzianum* in tomato. *Frontiers in Plant Science*, 4. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00206>
- Medeiros, H. A. de, Filho, J. V. de A., Freitas, L. G. de, Castillo, P., Rubio, M. B., Hermosa, R., & Monte, E. (2017). Tomato progeny inherit resistance to the nematode *Meloidogyne javanica* linked to plant growth induced by the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride*. *Scientific Reports*, 7(1), 1-13. <https://doi.org/10.1038/srep40216>
- Moens, M., Perry, R. N., & Starr, J. L. (2009). *Meloidogyne* species—A diverse group of novel and important plant parasites. En R. N. Perry, M. Moens, & J. L. Starr (Eds.), *Root-knot nematodes* (pp. 1-17). CABI. <https://doi.org/10.1079/9781845934927.0001>
- Monteiro, T. S. A., Balbino, H. M., Mello, I. N. K. de, Coutinho, R. R., de Araújo, J. V., Freitas, L. G., Monteiro, T. S. A., Balbino, H. M., Mello, I. N. K. de, Coutinho, R. R., de Araújo, J. V., & Freitas, L. G. (2020). *Duddingtonia flagrans* preying a plant parasitic nematode. *Brazilian Journal of Biology*, 80(1), 197-198. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.209748>
- Mukhtar, T. (2018). Short Communication—Management of Root-Knot Nematode, *Meloidogyne incognita*, in Tomato with Two *Trichoderma* Species. *Pakistan Journal of Zoology*, 50(4), 1589-1589. <https://doi.org/10.17582/journal.pjz/2018.50.4.sc15>

- Mulatu, A., Alemu, T., Megersa, N., & Vetukuri, R. R. (2021). Optimization of Culture Conditions and Production of Bio-Fungicides from *Trichoderma* Species under Solid-State Fermentation Using Mathematical Modeling. *Microorganisms*, 9(8), 1675. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081675>
- Navarrete, X., Ron, L., Viteri, P., Viera, W., Navarrete, X., Ron, L., Viteri, P., & Viera, W. (2018). Parasitism of the root knot nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White) chitwood in five wild Solanaceae species. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 71(1), 8367-8373. <https://doi.org/10.15446/rfna.v71n1.67122>
- Patil, J. A., Yadav, S., & Kumar, A. (2021). Management of root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* and soil borne fungus, *Fusarium oxysporum* in cucumber using three bioagents under polyhouse conditions. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(12), 7006-7011. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.07.081>
- Rodiuc, N., Vieira, P., Banora, M. Y., & de Almeida Engler, J. (2014). On the track of transfer cell formation by specialized plant-parasitic nematodes. *Frontiers in Plant Science*, 5. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2014.00160>
- Rubio, M. B., de Medeiros, H. A., Morán-Diez, M. E., Castillo, P., Hermosa, R., & Monte, E. (2019). A Split-Root Method to Study Systemic and Heritable Traits Induced by *Trichoderma* in Tomato Plants. En D. Reinhardt & A. K. Sharma (Eds.), *Methods in Rhizosphere Biology Research* (pp. 151-166). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-13-5767-1_9
- Sahebani, N., & Hadavi, N. (2008). Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(8), 2016-2020. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.03.011>
- Sasser, J. N. (1977). Worldwide Dissemination and Importance of the Root-knot Nematodes, *Meloidogyne* spp. *Journal of Nematology*, 9(1), 26-29.
- Sharon, E., Bar-Eyal, M., Chet, I., Herrera-Estrella, A., Kleifeld, O., & Spiegel, Y. (2001). Biological Control of the Root-Knot Nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology*, 91(7), 687-693. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2001.91.7.687>
- Sharon, E., Chet, I., & Spiegel, Y. (2011). *Trichoderma* as a Biological Control Agent. En K. Davies & Y. Spiegel (Eds.), *Biological Control of Plant-Parasitic Nematodes: Building Coherence between Microbial Ecology and Molecular*

- Mechanisms* (pp. 183-201). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9648-8_8
- Sharon, E., Chet, I., Viterbo, A., Bar-Eyal, M., Nagan, H., Samuels, G. J., & Spiegel, Y. (2007). Parasitism of *Trichoderma* on *Meloidogyne javanica* and role of the gelatinous matrix. *European Journal of Plant Pathology*, *118*(3), 247-258. <https://doi.org/10.1007/s10658-007-9140-x>
- Suarez, B., Rey, M., Castillo, P., Monte, E., & Llobell, A. (2004). Isolation and characterization of PRA1, a trypsin-like protease from the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* CECT 2413 displaying nematocidal activity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *65*(1), 46-55. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1610-x>
- Swain, H., Adak, T., Mukherjee, A. K., Mukherjee, P. K., Bhattacharyya, P., Behera, S., Bagchi, T. B., Patro, R., Shasmita, Khandual, A., Bag, M. K., Dangar, T. K., Lenka, S., & Jena, M. (2018). Novel *Trichoderma* strains isolated from tree barks as potential biocontrol agents and biofertilizers for direct seeded rice. *Microbiological Research*, *214*, 83-90. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.05.015>
- Szabó, M., Csepregi, K., Gálber, M., Virányi, F., & Fekete, C. (2012). Control plant-parasitic nematodes with *Trichoderma* species and nematode-trapping fungi: The role of chi18-5 and chi18-12 genes in nematode egg-parasitism. *Biological Control*, *63*(2), 121-128. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2012.06.013>
- Tchameni, S. N., Cotârleț, M., Ghinea, I. O., Bedine, M. A. B., Sameza, M. L., Borda, D., Bahrim, G., & Dinică, R. M. (2019). Involvement of lytic enzymes and secondary metabolites produced by *Trichoderma* spp. In the biological control of *Pythium myriotylum*. *International Microbiology*, *23*(2), 179-188. <https://doi.org/10.1007/s10123-019-00089-x>
- Van Wees, S. C., Van der Ent, S., & Pieterse, C. M. (2008). Plant immune responses triggered by beneficial microbes. *Current Opinion in Plant Biology*, *11*(4), 443-448. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.05.005>
- Yan, Y., Mao, Q., Wang, Y., Zhao, J., Fu, Y., Yang, Z., Peng, X., Zhang, M., Bai, B., Liu, A., Chen, S., & Ahammed, G. J. (2021). *Trichoderma harzianum* induces resistance to root-knot nematodes by increasing secondary metabolite synthesis and defense-related enzyme activity in *Solanum lycopersicum* L.

Biological Control, 158, 104609.
<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104609>

Zin, N. A., & Badaluddin, N. A. (2020). Biological functions of *Trichoderma* spp. For agriculture applications. *Annals of Agricultural Sciences*, 65(2), 168-178.
<https://doi.org/10.1016/j.aoas.2020.09.003>

Tabela 1. Isolados do gênero *Trichoderma* endofíticos de seringueiras usados neste estudo

Código isolado	Espécies	Origem
4F	<i>T. ovalisporum</i>	Raiz de <i>Hevea guianensis</i> -Acre
14F	<i>Trichoderma</i> sp.	Raiz de <i>Hevea brasiliensis</i> -Amazonas
17F	<i>Trichoderma</i> sp.	Raiz de <i>Hevea brasiliensis</i> -Amazonas
20F	<i>T. erinaceum</i>	Caule de <i>Hevea brasiliensis</i> -Amazonas,
22F	<i>Trichoderma</i> sp.	Caule de <i>Hevea brasiliensis</i> -Acre
23F	<i>T. endophyticum</i>	Caule de <i>Hevea brasiliensis</i> -Acre
24F	<i>T. koningiopsis</i>	Caule de <i>Hevea brasiliensis</i> -Amazonas
58F	<i>T. koningiopsis</i>	Caule de <i>Hevea brasiliensis</i> -Amazonas
84F	<i>T. virens</i>	Caule de <i>Hevea brasiliensis</i> -Amazonas
245F	<i>T. koningiopsis</i>	Caule de <i>Hevea brasiliensis</i> -Acre
247F	<i>T. lentiforme</i>	Raiz de <i>Hevea brasiliensis</i> -Acre
265F	<i>T. koningiopsis</i>	Caule de <i>Hevea brasiliensis</i> -Amazonas
432F	<i>T. ararianum.</i>	Caule de <i>Hevea brasiliensis</i> -Amazonas
518F	<i>T. lentiforme</i>	Caule de <i>Hevea brasiliensis</i> -Amazonas
549F	<i>T. endophyticum</i>	Caule de <i>Hevea brasiliensis</i> -Acre
15F	<i>Trichoderma</i> sp.	Raiz de <i>Hevea brasiliensis</i> -Amazonas
610F	<i>T. erinaceum</i>	Caule de <i>Hevea brasiliensis</i> -Amazonas
763F	<i>Trichoderma</i> sp.	Folhas de <i>Hevea brasiliensis</i> -Amazonas
765F	<i>T. lentiforme</i>	Caule de <i>Hevea brasiliensis</i> -Amazonas
815F	<i>T. koningiopsis</i>	Caule de <i>Hevea brasiliensis</i> -Amazonas

Tabela 2. Número de ovos e galhas de *M. javanica* em plantas de tomate inoculadas com *Trichoderma* spp., após 45 dias da infestação com o nematoide.

Tratamento	Ovos por grama raiz	Galhas por grama raiz
<i>T. erinaceum</i> 610F	34376 a	61 a
Rizotec ®	61149 a	35 a
<i>T. koningiopsis</i> 245F	89907 b	102 b
<i>Trichoderma</i> sp. 22F	94501 b	112 b
<i>T. koningiopsis</i> 265F	95314 b	118 b
<i>T. ararianum</i> 432F	103991 b	122 b
<i>T. ovalisporum</i> 4F	104509 b	124 b
<i>T. virens</i> 84F	104570 b	117 b
<i>Trichoderma</i> sp. 17F	107178 b	120 b
<i>Trichoderma</i> sp. 763F	107523 b	134 b
<i>T. lentiforme</i> 247F	108437 b	134 b
<i>T. koningiopsis</i> 58F	110354 b	125 b
<i>Trichoderma</i> sp. 14F	110991 b	165 c
<i>T. erinaceum</i> 20F	113332 b	111 b
<i>T. koningiopsis</i> 815F	114887 b	105 b
Controle	132045 c	154 c
<i>T. koningiopsis</i> 24F	133946 c	128 b
<i>T. lentiforme</i> 518F	138137 c	171 c
<i>T. endophyticum</i> 23F	143332 c	142 c
<i>T. lentiforme</i> 765F	146811 c	156 c
<i>Trichoderma</i> sp. 15F	154239 c	117 b
<i>T. endophyticum</i> 549F	177152 c	122 b

Diferentes letras indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre tratamentos de acordo com o teste de Scott-knott

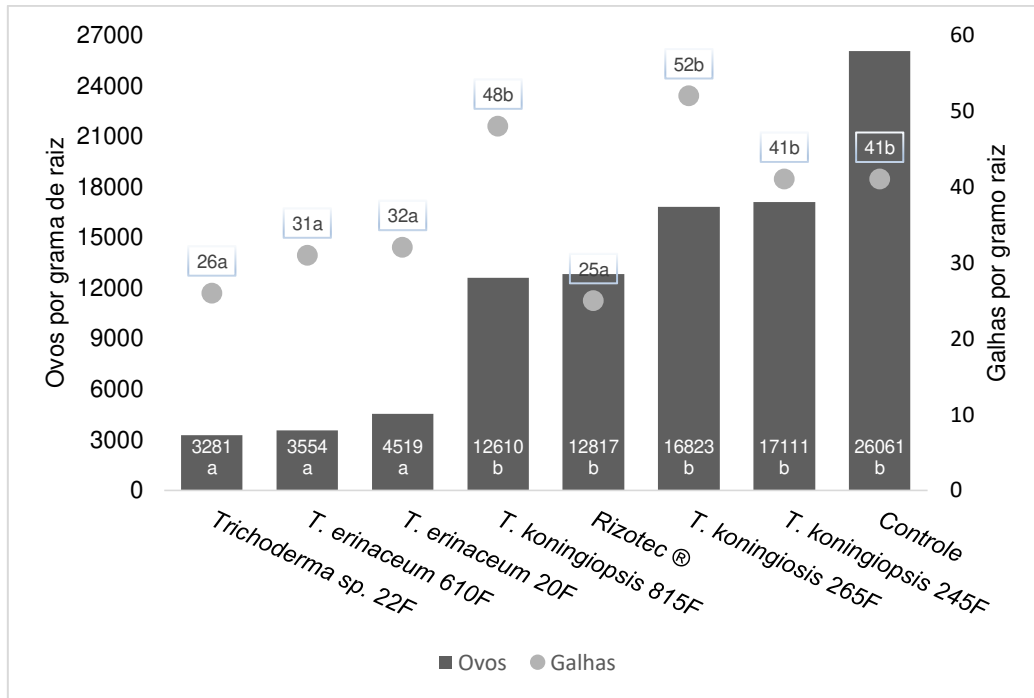


Figura 1. Número de ovos e galhas de *M. javanica* em plantas de tomate inoculadas com *Trichoderma* spp., após 46 dias da infestação com o nematoide. Diferentes letras indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre tratamentos de acordo com o teste de Scott-knott.

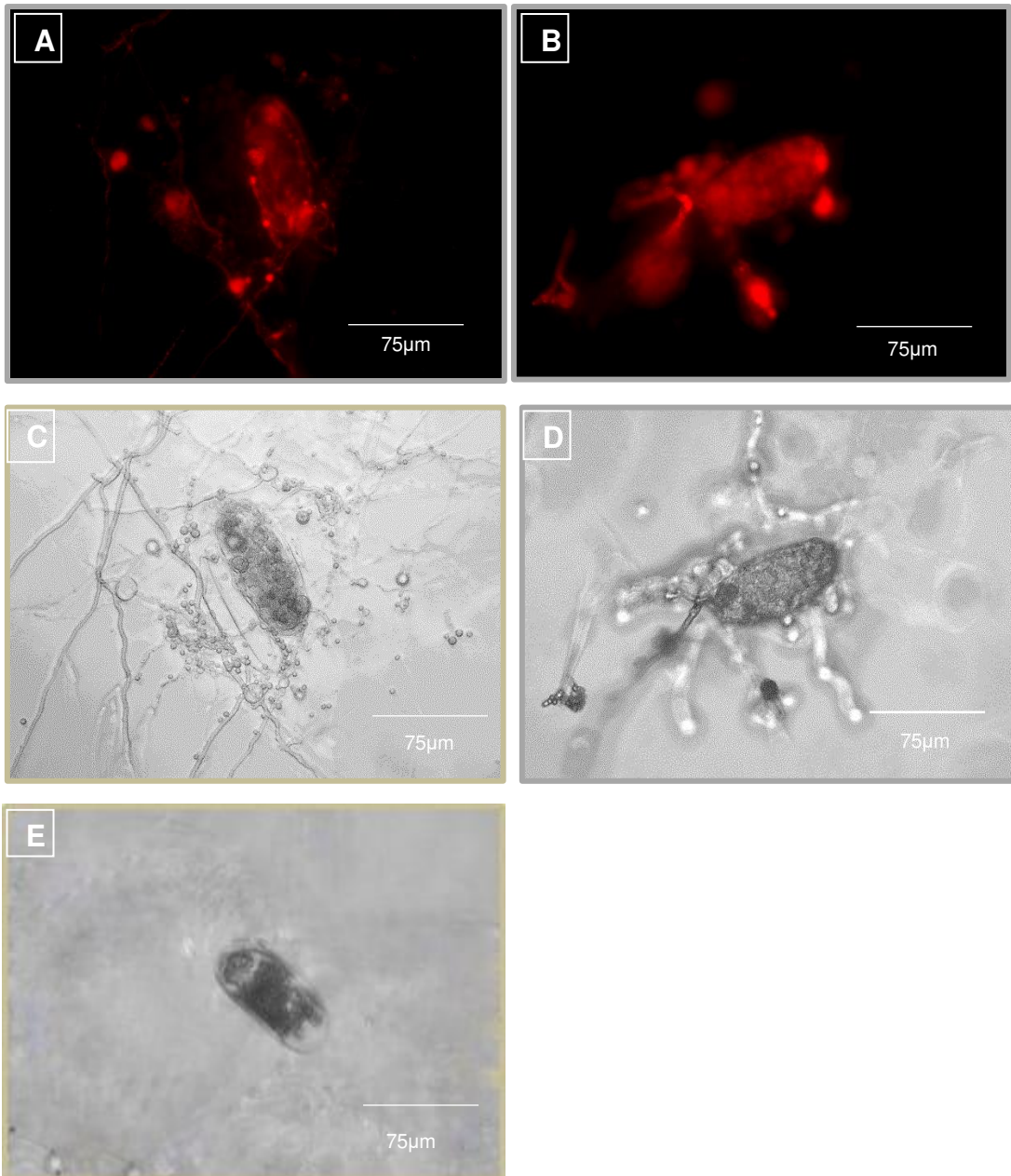


Figura 2. Parasitismo de ovos de *M. javanica* pelos isolados de *Trichoderma* spp. expressando a proteína vermelha fluorescente (PVF). A e C. *T. erinaceum* 610F-PVF. B e D. *Trichoderma* sp. 22F-PVF. E. Controle (ovo sem tratamento).

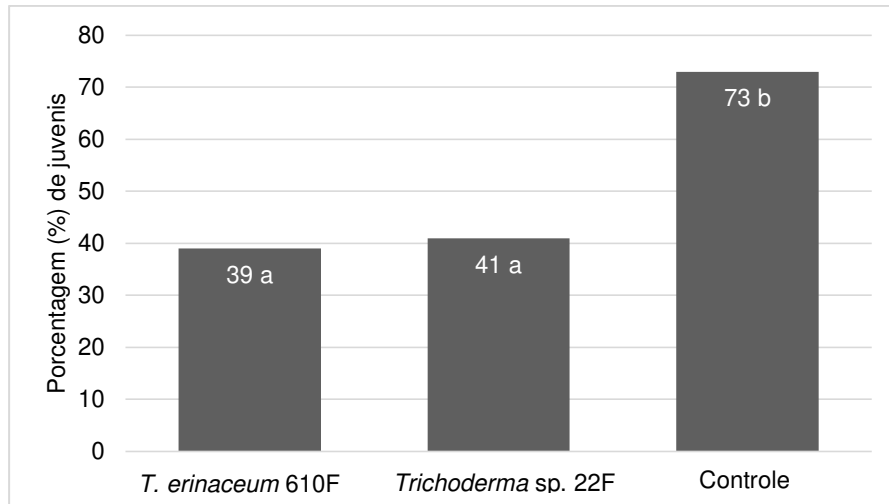


Figura 3. Porcentagem de penetração de juvenis de *M. javanica* nas raízes de tomateiro tratadas com *T. erinaceum* 610F e com *Trichoderma* sp. 22F, após 10 dias da infestação com o nematoide. Diferentes letras indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre tratamentos de acordo com o teste de Scott-knott.

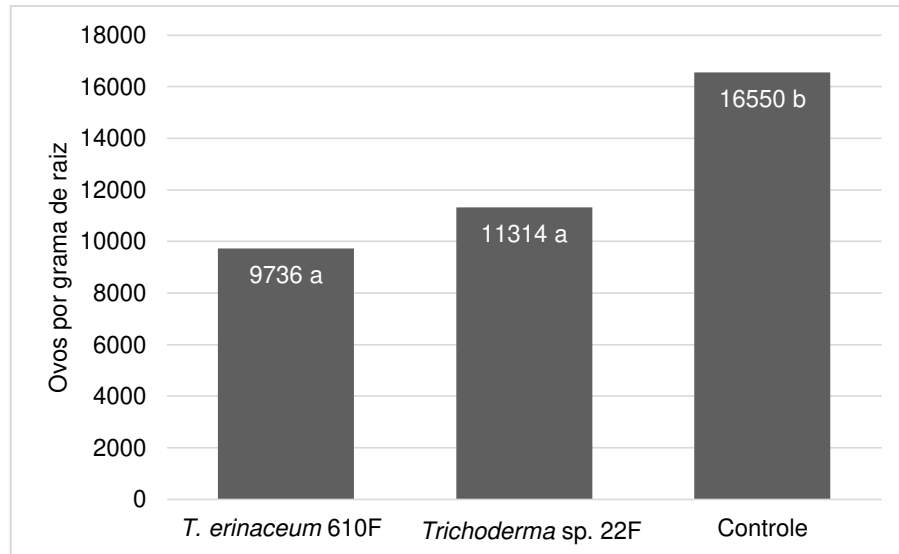


Figura 4. Número de ovos de *M. javanica* em plantas de tomate com raiz bipartida tratadas com *T. erinaceum* 610F ou *Trichoderma* sp. 22F, 34 dias após a infestação com o nematoide. Diferentes letras indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre tratamentos de acordo com o teste de Scott-knott.

Capitulo 2

Potencial de diferentes espécies de actinobactérias no manejo de nematoide de galhas

Potencial de diferentes espécies de actinobactérias no manejo de nematoide de galhas

Ángela M. Mogollón-Ortiz¹, Leandro G. de Freitas², Thalita A. Monteiro² e Marisa V de Queiroz^{1*}

¹Departamento de Microbiologia – Bioagro, Universidade Federal de Viçosa, Av. PH: Rolfs s/n, Campus Universitário, Viçosa, CEP 36570 900 MG, Brazil

²Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Av. PH: Rolfs s/n. Campus Universitário, Viçosa, CEP 36570 900 MG, Brazil

*Corresponding author: M. V. de Queiroz; E-mail: mvqueiro@ufv.br

RESUMO

As actinobactérias são bactérias cosmopolitas, amplamente conhecidas pela capacidade de controlar fitopatógenos por diferentes mecanismos de ação que incluem a produção de compostos antimicrobianos, o parasitismo, a indução de resistência na planta e a competição pelo espaço. Embora *Streptomyces* seja o gênero mais estudado, em relação ao controle de fitonematóides ainda precisam ser exploradas outras espécies de actinobactérias. Nosso objetivo foi selecionar actinobactérias do solo com potencial de biocontrole do nematoide das galhas (*Meloidogyne javanica*) e avaliar alguns dos seus mecanismos de ação. Um total de 10 actinobactérias do solo (1A, 2AE, 3F, 4L, 5N, 6O, 7P, 8S, 9T e 10U) foram testadas no controle de *M. javanica* em plantas de tomate. Os isolados foram identificados pela análise da sequência do gene que codifica o rRNA 16s. Os mecanismos envolvidos no biocontrole avaliados foram: parasitismo de ovos; redução da penetração de juvenis em raízes de tomate; indução de respostas de defesa na planta pelo método de raiz bipartida, realizado com os isolados que apresentaram as maiores reduções do número de ovos e galhas (2AE, 4L, 5N, 6O, 8S, 10U); avaliação da expressão de genes de defesa relacionados a Resposta Sistêmica Induzida (RSI) e a Resposta Sistêmica Adquirida (RSA). Os genes avaliados foram *TomLoxA* e *ACCO*, relacionados a RSI, e *PR1* e *RBOH1* relacionados a RSA, e a actinobactéria

selecionada para as análises foi *Streptomyces* sp. 4L. Houve reduções dos números de ovos e de galhas totais acima do 50% e 27%, respectivamente. Os isolados 5N, 2AE, 6O e 4L proporcionaram maiores reduções do número de ovos e 2AE, 4L, 8S e 10U proporcionaram às maiores porcentagens de redução do número de galhas. Todos os isolados tiveram a capacidade de parasitar ovos. Além disso, os isolados 10U, 9T, 3F, 6O, 5N, 2AE e 4L conseguiram reduzir a penetração de juvenis nas raízes e os isolados 6O, 4L, 8S, 10U e 5N induziram defesas sistêmicas em tomateiro contra *M. javanica*. As análises filogenéticas indicam que as actinobactérias isoladas correspondem a *Streptomyces* (1A, 3F, 4L, 6O, 8S, 9T e 10U), *Kribbella* sp. 5N, *Kitasatospora* sp. 2AE e *Lentzea* sp. 7P. Nas plantas tratadas com *Streptomyces* sp. 4L + *M. javanica* houve aumento significativo do número de transcritos dos genes *TomLoxA* e *ACCO*. Além disso, 35 dias após a infecção com o nematoide, o número de ovos foi reduzido significativamente. Nas plantas tratadas apenas com o nematoide, nas primeiras horas após da infecção, foi induzida somente a expressão dos genes *RBOH1* e *PR1*. A indução de respostas de defesa ao nematoide *M. javanica* ocorreu por meio das vias do ácido jasmônico e etileno, ativadas pelo pré-tratamento da planta com *Streptomyces* sp. 4L. Todos os isolados testados neste estudo apresentaram algum mecanismo de ação contra o nematoide de galhas e foi relatada pela primeira vez a eficácia de isolados dos gêneros *Kitasatospora*, *Kribbella* e *Lentzea* e confirmada a eficácia dos isolados gênero *Streptomyces* no controle do nematoide *M. javanica*.

Palavras chaves: Bactérias filamentosas, biocontrole, fitonematoide, *Meloidogyne*

INTRODUÇÃO

As espécies de fitonematoides do gênero *Meloidogyne*, conhecidos como os nematoides das galhas, são endoparasitas obrigatórios, polípagos, os quais induzem alterações nas raízes do hospedeiro conhecidas como galhas (Escobar et al., 2015; Moens et al., 2009). Nas raízes, os sintomas são produtos da indução de células gigantes que funcionam como os sítios de alimentação do nematoide durante o ciclo de vida (Moens et al., 2009). As alterações induzidas no sistema radicular causam reduções no rendimento das culturas e perdas econômicas consideráveis (Wesemael et al., 2011).

Entre as estratégias de manejo de nematoides, o uso de bioprodutos, ou seja de produtos comerciais com microrganismos como componente ativo tem demonstrado alta eficiência no controle do nematoide das galhas, além disso, nas plantas tratadas o estímulo do crescimento vegetal tem sido confirmado (Radwan et al., 2012). As bactérias são agentes de controle biológico de nematoides, porém poucos gêneros de bactérias fazem parte de formulações de produtos comerciais no Brasil para o controle do nematoide das galhas. Os produtos comerciais registrados atualmente são baseados nas espécies do gênero *Bacillus* e incluem as espécies *B. firmus*, *B. methylotrophicus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis* e *B. amyloliquefaciens* (Carneiro et al., 2020). Pesquisas focadas no estudo de outros gêneros de bactérias permitiram ampliar os agentes de controle biológico do nematoide das galhas. Entre as bactérias, as actinobactérias apresentam potencial para o controle de nematoides, e compreendem um dos principais e mais abundante filo de bactérias habitantes do solo (Altieri, 1999; Doumbou et al., 2001; Whitman et al., 2012), incluindo os solos supressivos (Mendes et al., 2011), desempenhando um papel importante na proteção de plantas contra patógenos por diferentes mecanismos de ação (Sharma & Salwan, 2018). Frente aos nematoides, as actinobactérias atuam de diferentes formas: de maneira direta pela produção de compostos nematicidas, por exemplo as actinomicinas (Sharma et al., 2019), o *3-benzyl-1,4-diaza-2,5-dioxobicyclo[4.3.0]nonane (BDDB)* (Yoon et al., 2012) ou a fungicromina (Zeng et al., 2013); pelo parasitismo de ovos (Jin et al., 2017; Yoon et al., 2012); pela colonização de tecidos das raízes das plantas (Bonaldi et al., 2015; Meij et al., 2017; Patel et al., 2018); ou de maneira indireta pela ativação dos mecanismos de defesa da planta (Abbasi et al., 2019, 2020; Nishad et al., 2020). Essas características somadas a facilidade de produção indicam que as espécies do filo actinobactéria têm potencial para serem utilizadas em formulações no controle biológico (Doumbou et al., 2001) de fitonematoides.

Entre os gêneros de actinobactérias, o *Streptomyces* é amplamente estudado no controle do nematoide das galhas (Jin et al., 2017; Sharma et al., 2019; Yoon et al., 2012; Zeng et al., 2013). Espécies desse gênero são conhecidas pela habilidade de produzir uma variedade de metabólitos nematicidas contra juvenis do gênero *Meloidogyne*, destacando as espécies *S. albogriseolus* (Zeng et al., 2013), *S. cacaoi* (Yoon et al., 2012), *S. antibioticus* (Sharma et al., 2019) e *S. rubrogriseus* (Jin et al., 2017). Além do efeito sobre os juvenis, a ação sobre a redução da eclosão de ovos

de *M. incognita*, tem sido confirmada após a exposição aos filtrados de *S. rubrogriseus* (Jin et al., 2017) e de *S. cacaoi*, e para este último, a atividade de enzimas quitinases também é conhecida (Yoon et al., 2012). A capacidade de parasitar ovos é outro mecanismo importante no controle de nematoides pelas actinobactérias, tanto que a espécie *S. rubrogriseus* foi isolada de ovos de *M. incognita* (Jin et al., 2017).

A indução de resistência é outro mecanismo de ação das actinobactérias. Foi previamente confirmado a indução de respostas de defesa contra fungos fitopatogênicos em plantas tratadas com isolados de *Streptomyces* spp. (Abbasi et al., 2019; Kurth et al., 2014). Isolados de *Streptomyces* spp. são capazes de induzir respostas de defesa que incluem a indução da síntese do etileno (ET), do ácido salicílico (AS) (Abbasi et al., 2020) e do ácido jasmônico (AJ) (Abbasi et al., 2019; Kurth et al., 2014), fitohormônios que atuam como moléculas sinalizadoras, ativando a expressão de genes relacionados com a defesa das plantas (De Vos et al., 2005; Glazebrook et al., 2003).

Quanto aos mecanismos de defesa das plantas, o ácido jasmônico e o etileno estão relacionados com a resistência sistêmica induzida (RSI), ativada pela colonização de microrganismos benéficos que preparam a planta, colocando-a em um estado de “priming” contra patógenos e insetos (Conrath, 2011; Pieterse et al., 2014; Van der Ent et al., 2009). Entre os genes estudados como marcadores das vias do AJ, o gene *LOX* codifica para a enzima lipoxigenase que participa da biossíntese dos jasmonatos (Feussner & Wasternack, 2002). Por outro lado, na biossíntese do etileno, o gene *ACC* codifica para uma ACC oxidase que participa do último passo para converter o ACC (1-Aminociclopropane-1-carboxylic acid) em etileno (Dilley et al., 2013; Molinari & Leonetti, 2019). A resistência sistêmica adquirida (RSA) é ativada pelo contato com padrões moleculares associados aos microrganismos (MPMA), pela colonização com microrganismos benéficos e por efetores (Conrath, 2011), ou pelo H₂O₂ que cumpre um papel importante na indução da RSA. O H₂O₂ participa da hidrólise de ácidos graxos para gerar o ácido azelaico AZA (El-Shetehy et al., 2015) que junto com o ácido salicílico (Conrath, 2011), o glicerol-3-fosfato (Chanda et al., 2011), o óxido nítrico e as espécies reativas de oxigênio (C. Wang et al., 2014), funcionam como sinais químicos que estimulam RSA. Enquanto as proteínas PR são um componente importante do sistema imune da planta e os genes *PR* são usados como marcadores da RSA (Ali et al., 2018).

Levando em consideração o potencial de uso de actinobactérias no controle de fitonematoides e a abundância e diversidade desse grupo presente no solo brasileiro, os objetivos desse estudo foram: selecionar actinobactérias para controle de *M. javanica* e desvendar alguns dos mecanismos de ação envolvidos.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolamento de actinobactérias

Dez actinobactérias foram isoladas de solos da mata da Universidade Federal de Viçosa e de solos cultivados com soja em São Gabriel do Oeste, Mato Grosso do Sul e Primavera do Leste, Mato Grosso (Tabela 1). Os solos foram coletados em uma profundidade de 20 cm depois de remover 2 – 3 cm da superfície do solo (Law et al., 2019) e as bactérias foram isoladas usando o método de diluições seriadas (Chen et al., 2018) seguido de plaqueamento em meio de cultura composto por amido 10 g.L⁻¹, fosfato de potássio monobásico 1 g.L⁻¹, sulfato de amônio 2 g.L⁻¹, sulfato de magnésio 0,5 g.L⁻¹, sulfato de ferro 0,01 g.L⁻¹, ágar 15 g.L⁻¹, pH 7,6. Após 10 dias de incubação a 28°C em BOD FANEM Mod 347, as colônias das actinobactérias foram purificadas e mantidas em meio GYM (glicose 4 g.L⁻¹; extrato de levedura 4 g.L⁻¹ extrato de malte g.L⁻¹; CaCO₃ 2 g.L⁻¹ Ágar 12 g.L⁻¹, pH 7,2) descrito por Shima et al. (1996) a 28°C. As bactérias foram preservadas em suspensão de glicerol (20% v/v) a -80° e -20° C.

Identificação de actinobactérias pelo sequenciamento do gene do rRNA 16S

Para a extração do DNA genômico as bactérias foram crescidas sobre discos de celofane (Čihák et al., 2017) em placas de Petri com ágar GYM a 28° C por 3 dias. O DNA genômico foi extraído usando o kit de purificação de DNA da promega (WizardGenomic DNA Purification Kit) de acordo com as instruções do fabricante para bactérias Gram positivas. O gene que codifica o rRNA 16S foi amplificado usando os *primers* universais 27F (5´-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3) e 1492R (5´TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3´) (Lee et al., 2014). A PCR foi realizada em um volume final de 25 µL usando o termociclador Eppendorf Martercycler® com condiciones de desnaturação inicial 95°C por 5 min, 35 ciclos de 94 °C por 50 s, 63°C

por 1 min e 72 °C por 1:30 min e um alongamento final de 72° por 8 min. Os produtos da PCR foram sequenciados pela Macrogen Inc. (Seúl, Coreia do Sul).

As sequências obtidas de todos os isolados foram comparadas com as sequências do gene que codifica o rRNA 16S das espécies tipo disponíveis na base de dados pública ExBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net>). Para cada isolado foi realizado uma análise filogenética separada. O algoritmo MUSCLE (Edgar, 2004) foi usado nos alinhamentos, e estes foram verificados manualmente. As sequências de todos os isolados foram corrigidas manualmente e para os isolados 6O e 7P foi usado o algoritmo Gblocks (http://molevol.cmima.csic.es/castresana/Gblocks_server.html) para corrigir posições redundantes. Foram realizadas análises de Inferência Bayesiana (IB) e calculados os modelos de substituição de nucleotídeos de cada reconstrução utilizando o software MrMODELTEST v.3.04. Os modelos foram selecionados de acordo com Akaike information criterion (AIC). O modelo selecionado para os isolados 1A, 2Ae, 3F, 4L, 5N, 6O, 7P, 8S e 9T foi GTR+I+G e para o isolado U foi HKY+I. As análises de Inferência Bayesiana foram estimadas no servidor CIPRES usando Mr. Bayes e as árvores filogenéticas foram visualizadas usando o software ITOL.

Multiplicação de *M. javanica*

O nematoide *M. javanica* foi multiplicado em plantas susceptíveis de tomate da variedade Santa Cruz Kada sob condições de casa vegetação. Os ovos foram extraídos segundo a técnica de Hussey e Barker (1973) modificada por Bonetti and Ferraz (1981).

Produção de inóculo das actinobactérias

A produção de inóculo das actinobactérias foi realizada em grãos de arroz esterilizado (Soares et al., 2007). Trinta gramas de arroz foram autoclavadas em sacos plásticos de polipropileno (121°C, 20 min). As actinobactérias foram crescidas previamente em meio GYM durante 9 dias a 28°C e 4 discos com crescimento bacteriano foram transferidos para os sacos plásticos contendo o arroz esterilizado. As bactérias foram incubadas durante 9 dias a 28 °C para produção de inóculo necessário nos experimentos em plantas.

Controle de *M. javanica* com actinobactérias

O experimento foi conduzido em casa de vegetação. Foram usadas sementes de tomate Santa Cruz Kada semeadas em substrato comercial Tropstrato®. Cinco semanas depois, foi realizado o transplante para vasos de 1,5 L contendo substrato previamente autoclavado (121°C, 2h) constituído de solo argiloso do horizonte C e areia em uma proporção 1:1 (V:V)

Cada tratamento correspondeu a uma actinobactéria (Tabela 1), além do produto comercial Rizotec® (*Pochonia chlamydosporia* isolado Pc-10) e o tratamento controle (água).

No momento do transplante, nas parcelas que receberam as actinobactérias foram adicionadas uma suspensão de 2×10^4 esporos.g⁻¹ de solo ajustada com a câmara de Neubauer e preparada a partir das bactérias crescidas em arroz. As parcelas do tratamento Rizotec® receberam 5000 clamidosporos.g⁻¹. Cinco dias após do tratamento com as actinobactérias todas as parcelas foram infestadas com 800 ovos de *M. javanica*. O delineamento foi inteiramente casualizado com 8 repetições.

Parasitismo *in vitro* de ovos de *M. javanica* por espécies de actinobactérias

Os experimentos de parasitismo *in vitro* de ovos foram realizados com todos os isolados das actinobactérias (Tabela 1). A interação das actinobactérias e ovos de *M. javanica* foi verificada em placas de Petri com ágar-água 2%. As actinobactérias foram cultivadas previamente durante 3 dias e 90 ovos de *M. javanica* previamente desinfestados foram adicionados por placa. Os ovos foram desinfestados com lavagens sucessivas em soluções de antibióticos separadamente durante 20 min: (i) nistatina (Merck) 100000 UI, cloranfenicol (Sigma-Aldrich) 0,12% e penicilina 0,02%; (ii) Cloramide T (Merck) 4%; (iii) cloranfenicol (Sigma-Aldrich) 0,03 % e ampicilina (Sigma-Aldrich) 0,02%. A lavagem com a última solução foi realizada duas vezes e os ovos foram lavados três vezes com água destilada esterilizada (ADE). Tubos estéreis de 2 mL foram usados no processo de desinfecção. Após três semanas foram capturadas imagens no microscópio Olympus CX41 dotado de câmera BestScope.

Penetração de juvenis de *M. javanica* em mudas de tomate tratadas com actinobactérias

Sementes de tomate Santa Cruz Kada foram semeadas em substrato comercial Tropstrato® previamente autoclavado (121°C, 2 h). Foram usados potes plásticos com capacidade de 60 g. As plântulas com um par de folhas definitivas receberam os tratamentos constituídos pelas actinobactérias (Tabela 1) e o controle (água). As actinobactérias foram ajustadas para uma concentração de 2×10^4 esporos.g⁻¹ de solo. Todas as parcelas foram infestadas com 100 juvenis de *M. javanica* cinco dias após da aplicação das actinobactérias. A variável número de juvenis que penetraram nas raízes foi avaliada 10 dias após a aplicação dos nematoides. A coloração com fucsina ácida dos nematoides no sistema radicular das plantas foi feita segundo a metodologia de Bybd et al. (1983). Foram usadas 6 repetições por tratamento seguindo um delineamento inteiramente casualizado.

Método de raiz bipartida para avaliar a indução por actinobactérias de respostas relacionadas a resistência sistêmica da planta contra *M. javanica*

Foi realizado o método de raiz bipartida (Medeiros et al., 2017; Rubio et al., 2019) para avaliar a indução de respostas da planta relacionadas a resistência sistêmica pelos isolados 2AE, 4L, 5N, 6O, 8S e 10U contra *M. javanica*. No momento do transplântio das mudas de tomate Santa Cruz Kada com 5 semanas após a germinação, foram separadas as raízes em duas partes iguais e transplantadas para potes plásticos distintos com capacidade de 250 g preenchidos com substrato constituído por solo do horizonte C e areia em uma proporção 1:1. Nas parcelas com a actinobactérias foram adicionadas 2×10^4 esporos.g⁻¹ em uma das metades das raízes e na outra metade foram aplicados 500 ovos de *M. javanica*. No tratamento controle (água), uma metade das raízes das plantas recebeu água e a outra metade os ovos do nematoide. As plantas foram mantidas sob condições de casa de vegetação. Após a aplicação dos nematoide (34 dias), foi avaliada a variável número de ovos de *M. javanica*. O delineamento foi inteiramente casualizado com 8 repetições.

Teste de biocontrole e análises da expressão de genes de resistência

Sementes de tomate Santa Cruz Kada foram semeadas em substrato comercial Tropstrato® e cinco semanas depois foi realizado o transplante para recipientes com capacidade de 500 g contendo substrato constituído de solo do horizonte C e areia em uma proporção 1:1 (V:V), previamente autoclavado (121°C, 2h). A actinobactéria *Streptomyces* sp. 4L foi selecionada pela capacidade de controle de *M. javanica*. Os tratamentos foram: i) *Streptomyces* sp. 4L; ii) *M. javanica*; iii) *Streptomyces* sp. 4L + *M. javanica*; iv) controle (água). No momento do transplante, os tratamentos com a actinobactéria receberam 2×10^4 esporos.g⁻¹ de solo. Os tratamentos com o nematoide foram realizados cinco dias após o transplante. Para cada planta foram inoculados 500 juvenis de *M. javanica*.

Após 30h e 9 dias da infestação com o nematoide, três raízes de três diferentes réplicas foram usadas na extração de RNA. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. As raízes foram lavadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C (Medeiros et al., 2017). Trinta e cinco dias após a infestação com o nematoide foram coletadas raízes de 6 réplicas diferentes para avaliar a eficácia das actinobactérias no controle do nematoide, por meio da avaliação do número de ovos. Os tratamentos foram i) *M. javanica*; ii) *Streptomyces* sp. 4L + *M. javanica*. O delineamento foi inteiramente casualizado.

Extração de RNA

As raízes foram maceradas em nitrogênio líquido e a partir de cada amostra o RNA total foi extraído usando o reagente Trizol® (Invitrogen). O RNA das amostras foi tratado com DNase RQ1 (Promega) e a síntese do cDNA foi realizada a partir de 1 µg de RNA tratado utilizando o kit ImProm-II Reverse Transcription System (Promega Corporation, Madison, WI, USA) de acordo com as recomendações do fabricante.

Expressão diferencial de genes por qPCR

A PCR quantitativa foi realizada utilizando SYBR Green PCR-Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e as leituras foram realizadas no equipamento CFX96 Touch TM Real-Time PCR Detection System (BIO-RAD). Os

primers usados neste estudo são apresentados na tabela 2. A eficiência e o coeficiente de determinação (R^2) de cada par de *primers* foram calculados. A quantificação relativa foi realizada pela curva padrão obtida para cada gene pela equação linear que relaciona Ct médio e log10 da concentração de cDNA. O gene *actin* que codifica actina foi utilizado para a normalização dos níveis de expressão.

Análise estatística

Foram realizadas análises de variância dos dados. Nos experimentos de controle de *M. javanica* com actinobactérias, de penetração de juvenis em mudas de tomate tratadas com actinobactérias e na indução de defesas sistêmicas de actinobactérias contra *M. javanica* com o método de raiz bipartida as médias foram comparadas pelo teste Scott-Knott. Para a análise da expressão a comparação de médias foi realizada pelo teste de Tukey. Todas as análises foram feitas com o software Sisvar 5.6.

Os dados número de ovos totais de *M. javanica* em raízes de tomateiro inoculadas com actinobactérias foram transformados com raiz quadrada (Figura 5).

Os dados de porcentagem de penetração de juvenis de *M. javanica* em raízes de tomateiro foram transformados com Log X (Figura 7)

Os dados número de ovos de *M. javanica* em raízes de tomateiro tratadas com actinobactérias e submetidas a técnica de raiz bipartida foram transformados com Ln X (Figura 8).

RESULTADOS

Identificação dos isolados

As análises de IB das sequências do rDNA 16s demonstraram que os isolados 1A, 3F, 4L, 6O, 8S, 9T e 10U (Figura 1) pertencem ao gênero *Streptomyces* e que os isolados 2AE, 5N e 7P pertencem aos gêneros *Kitasatospora* (Figura 2), *Kribbella* (Figura 3) e *Lentzea* (Figura 4), respectivamente.

Controle de *M. javanica* com actinobactérias

Os isolados das actinobactérias dos diferentes gêneros usadas no tratamento de plantas de tomate contra *M. javanica* foram capazes de reduzir o número de ovos e galhas (Figura 5). Os isolados *Kribbella* sp. 5N, *Kitasatospora* sp. 2AE, *Streptomyces* sp. 6O e *Streptomyces* sp. 4L induziram a redução do número de ovos em 63, 57, 51 e 50%, respectivamente, sem diferença significativa em relação ao tratamento com produto comercial Rizotec® (Figura 5). As plantas tratadas com os isolados *Streptomyces* sp. 8S, *Streptomyces* sp. 9T, *Streptomyces* sp. 10U, *Streptomyces* sp. 3F, *Streptomyces* sp. 1A e *Lentzea* sp. 7P não apresentaram diferenças em relação ao tratamento controle (Figura 5).

Os isolados *Kitasatospora* sp. 2AE e *Streptomyces* sp. 4L, além da redução do número de ovos também se destacaram na redução do número de galhas junto com os isolados *Streptomyces* sp. 8S e 10U. As porcentagens de redução de galhas foram de 28, 26, 25 e 16% para os isolados *Streptomyces* sp. 8S, *Streptomyces* sp. 4L, *Streptomyces* sp. 10U e *Kitasatospora* sp. 2AE, respectivamente (Figura5).

Parasitismo de ovos e juvenis

O parasitismo *in vitro* de ovos de *M. javanica* foi confirmado com todas as actinobactérias usadas neste estudo (Figura 6). O contato das actinobactérias com os ovos confirmou a capacidade das actinobactérias para crescer sobre a superfície da casca dos ovos causando deformações, enrugamento da casca e confirmando a perda de viabilidade dos ovos comparado com o tratamento controle onde não foram observadas alterações (Figura 6).

Penetração de juvenis de *M. javanica* em mudas de tomate tratadas com actinobactérias

O tratamento preventivo das plantas de tomate com as actinobactérias afetou significativamente a penetração dos juvenis de *M. javanica* nas raízes de tomate. O número de juvenis foi significativamente menor comparado com o tratamento controle. No total, 27, 33, 35, 35, 35, 39 e 39% dos juvenis conseguiram penetrar nas raízes das plantas tratadas com *Streptomyces* sp. 10U, *Streptomyces* sp. 9T, *Streptomyces*

sp. 3F, *Streptomyces* sp. 6O, *Kribbella* sp. 5N, *Kitasatospora* sp. 2AE e *Streptomyces* sp. 4L, respectivamente, comparado com o tratamento controle, onde 74 % dos juvenis penetraram nas raízes. Os isolados *Streptomyces* sp. 8S, *Streptomyces* sp. 1A e *Lentzea* sp. 7P não apresentaram diferenças do tratamento controle (Figura 7).

Indução de defesas sistêmicas da planta por actinobactérias contra *M. javanica* pelo método de raiz bipartida

Para confirmar a capacidade das actinobactérias de induzir as defesas sistêmicas da planta foi realizado o método de raiz bipartida com os isolados *Kribbella* sp. 5N, *Kitasatospora* sp. 2AE, *Streptomyces* sp. 6O, *Streptomyces* sp. 4L, *Streptomyces* sp. 10U e *Streptomyces* sp. 8S que se destacaram pelas reduções significativas do número de ovos e galhas nas plantas tratadas (Figura 5). Todos os isolados testados, com exceção do isolado *Kitasatospora* sp. 2AE, induziram reduções significativas do número de ovos de *M. javanica* comparado com o tratamento controle. As porcentagens de redução do número total de ovos foram de 48, 43, 38, 37 e 25% nas plantas tratadas com *Streptomyces* sp. 8S, *Streptomyces* sp. 6O, *Streptomyces* sp. 4L, *Streptomyces* sp. 10U e *Kribbella* sp. 5N, respectivamente (Figura 8). Nós confirmamos a redução na reprodução do nematoide por diferentes espécies de actinobactérias aplicando o método de raiz bipartida e a capacidade desses microrganismos induzirem defesas sistêmicas na planta.

Biocontrole e análise da expressão de genes de resistência nas plantas tratadas com *Streptomyces* sp. 4L

Pelo destaque na redução do número de ovos e galhas nas plantas tratadas, a capacidade de parasitismo ovos e o efeito sobre a penetração de juvenis nas raízes das plantas foi selecionado o isolado *Streptomyces* sp. 4L para a análise da expressão de genes de resistência em plantas de tomate.

As análises dos transcritos dos genes marcadores da via do ácido jasmônico (*TomLoxA*), do etileno (*ACCO*) e relacionados a RSA (*PR1* e *RBOH1*) demonstraram diferenças entre os tratamentos, tanto nas primeiras horas após da inoculação do nematoide (30 horas), quanto na etapa em que o nematoide se localiza no sitio definitivo de alimentação (9 dias) (Figuras 9, 10, 11 e 12).

O tratamento preventivo das plantas com *Streptomyces* sp. 4L e a posterior inoculação com *M. javanica* (*Streptomyces* sp. 4L + *M. javanica*) aumentou significativamente os transcritos dos genes relacionados com as vias do ácido jasmônico e a do etileno, *TomLoxA* e *ACCO*, respectivamente, 30h após a inoculação do nematoide (Figuras 9 e 10). Depois de nove dias, apenas nas plantas do tratamento com *Streptomyces* sp. 4L + *M. javanica* somente a expressão do gene *ACCO* continuou sendo significativamente maior em comparação ao observado nas plantas do tratamento controle (Figura 10).

Nas plantas tratadas com a actinobactéria *Streptomyces* sp. 4L, ocorreu um aumento significativo dos transcritos do gene *TomLoxA* comparado com o tratamento controle após 30 h (Figura 9), o que não ocorreu com os genes *ACCO* (Figura 10), *RBOH1* (Figura 11) e *PR1* (Figura 12). Por outro lado, as plantas tratadas apenas com *M. javanica* apresentaram um aumento significativo da expressão dos genes *RBOH* (Figura 11) e *PR1* (Figura 12) nas primeiras horas após o tratamento com o nematoide. Depois de nove dias, apenas o gene *PR1* continuou apresentando maior expressão comparado com o tratamento controle (Figura 12). Os genes *TomLoxA* (Figura 9) e *ACCO* (Figura 10) não foram significativamente expressos após o tratamento com o nematoide comparado com o tratamento controle.

Nós demonstramos que o tratamento das plantas com *Streptomyces* sp. 4L + *M. javanica* induziu a expressão dos genes *TomLoxA* e *ACCO* e provocou a redução de 25 % do número de ovos do nematoide das galhas em relação ao tratamento com apenas com *M. javanica* (Figura 13).

DISCUSSÃO

As actinobactérias no controle de nematoides

Neste trabalho foram isoladas, identificadas e analisadas quanto ao controle do nematoide das galhas, dez actinobactérias do solo. As actinobactérias são componentes importantes da microbiota do solo e entre estas, as espécies do gênero *Streptomyces* são as mais estudadas frente ao controle do nematoide das galhas (Yoon et al., 2012; Zeng et al., 2013; Jin et al., 2017; Sharma et al., 2019). A maioria das actinobactérias isoladas pertence ao gênero *Streptomyces* (isolados 1A, 3F, 4L, 6O,

8S, 9T e 10U) e as demais pertencem aos gêneros *Kitasatospora* (2AE), *Kribbella* (5E) e *Lentzea* (7P).

Nos experimentos realizados com os isolados do gênero *Streptomyces* foram observadas reduções significativas do número de ovos e galhas nas plantas tratadas. Resultados semelhantes foram obtidos anteriormente com outros isolados do gênero *Streptomyces* no controle do *Meloidogyne* spp. em plantas de tomate tratadas com a espécie *S. rubrogriseus*, onde foram obtidas reduções do número de galhas e juvenis de *M. incognita* acima de 46 e 70%, respectivamente (Jin et al., 2017, 2019). Em plantas da mesma espécie e usando *S. antibioticus* foram obtidas reduções acima do 50% do número de galhas e massas de ovos de *M. incognita* (Sharma et al., 2019). Da mesma maneira menor número de juvenis e massas de ovos de *M. incognita* em plantas de pimenta tratadas com *S. yatensis* e *S. misionensis* foram confirmadas (Park et al., 2020). Os relatos prévios mencionados junto com nossos resultados confirmam a eficácia do tratamento de plantas com espécies do gênero *Streptomyces*, além de isolados dos gêneros *Kitasatospora*, *Kribbella* e *Lentzea* contra o *M. javanica*. Esses resultados estão relacionados com a capacidade dos isolados de parasitar ovos, induzir respostas de defesa contra *M. javanica* e afetar a penetração dos juvenis nas raízes das plantas tratadas.

Com o isolado *Kribbella* sp. 5N, a combinação de diferentes mecanismos de ação contra *M. javanica* também foi confirmada. Por outro lado, estudos prévios com isolados do gênero *Kribbella* realizados por Mülner et al. (2019) mostraram que isolados de *Kribbella* sp. são parte da microbiota dos esclerócios de *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum*. Essa é microbiota considerada fonte de agentes de biocontrole, além disso, foi confirmada a atividade de protease *in vitro* de isolados endofíticos do gênero *Kribbella* (Borah & Thakur, 2020). Nossos resultados e os relatos prévios confirmam a importância dos isolados do gênero *Kribbella* no controle de patógenos do solo.

Foi demonstrado anteriormente que actinobactérias do gênero *Kitasatospora*, podem controlar fitopatógenos do filo Oomycota e fungos dos filos Ascomycota e Basidiomycota. O efeito antagonista foi demonstrado com a inibição do crescimento *in vitro* de *Phytophthora citricola* por isolados do gênero *Kitasatospora* (Haesler et al., 2008). Além disso, os filtrados do meio de cultura da actinobactéria afetaram o crescimento *in vitro* dos fungos *Curvularia oryzae* e *Ganoderma boninense* (Pithakkit et al., 2015). Entre os compostos antifúngicos produzidos por *K. cheerisanensis* foi

observada a presença de KCTC 2395, a bafilomicina C1-amida (Hwang et al., 2014). A redução e o parasitismo de ovos e o efeito negativo sobre a penetração de juvenis de *M. javanica* nas plantas tratadas confirmam a importância das espécies do gênero *Kribbella* tanto no controle de fitonematoides quanto no potencial de biocontrole de outros fitopatógenos previamente relatados.

Neste estudo, nós demonstramos o potencial do *Lentzea* sp. 7P no parasitismo de ovos de *M. javanica*. Em relatos prévios, isolados do gênero *Lentzea* foram achados como parte de consórcios microbianos de solos supressivos e esses isolados foram também associados com cistos do nematoide *Heterodera glycines* (Hussain et al., 2018), no entanto, não houve suporte para ação das espécies no controle efetivo de fitonematoides.

Parasitismo de ovos de *M. javanica*

Entre os mecanismos de ação utilizados por agentes de controle biológico de fitonematoides, destaca-se o parasitismo de ovos que tem a participação de enzimas proteolíticas como quitinases e proteases (Kim et al., 2011). Nós demonstramos a capacidade de todos os isolados das actinobactérias (Tabela 1) de parasitar ovos de *M. javanica*, que inclui tanto isolados do gênero *Streptomyces* quanto isolados dos gêneros *Kitasatospora*, *Kribbella* e *Lentzea*, antes não relatados como parasitas de ovos de *M. javanica*.

A utilização desse mecanismo de ação já foi demonstrada em isolados do gênero *Streptomyces*. A espécie *S. sampsonii* produz enzimas quitinases e proteases, além de seus filtrados reduzirem a eclosão de ovos e causarem mortalidade de juvenis de *Meloidogyne* sp. (Kim et al., 2011). Por outro lado, o parasitismo de ovos de *M. incognita* por *S. rubrogriseus* foi confirmado, tendo sido observadas alterações na casca e o crescimento de hifas nas partes externa e interna (Jin et al., 2017).

Actinobactérias afetam a penetração de juvenis de *M. javanica*

O tratamento preventivo com actinobactérias afetou a penetração dos juvenis de *M. javanica* nas raízes de tomate tratadas. Além da redução na penetração dos juvenis (Figura 7), o tratamento com actinobactérias provocou a redução nas variáveis

número de galhas e ovos de *M. javanica* (Figura 5). Até a apresentação destes resultados, não existiam relatos sobre o efeito das actinobactérias na penetração de juvenis. Anteriormente, foi demonstrada a capacidade das actinobactérias de produzir metabólitos nematocidas que causam a mortalidade de juvenis sob condições *in vitro* (Kaur et al., 2016; Meidani et al., 2020; Park et al., 2020) e a capacidade dos isolados de *Streptomyces* spp. de colonizar endofiticamente os tecidos das raízes de plantas de arroz (Patel et al., 2018) e alface (Bonaldi et al., 2015); de *S. olivochromogenes* colonizar as raízes de *Arabidopsis thaliana* inter e intracelularmente (Meij et al., 2017); e de *Streptomyces* sp. EN27 colonizar o embrião, o endosperma e a radícula emergente de trigo (Coombs & Franco, 2003). Todos esses exemplos mostram que as actinobactérias são excelentes aliadas das plantas no controle do nematoide das galhas, somada a capacidade de induzir respostas de defesas das plantas (Abbasi et al., 2019, 2019; Abo-Zaid et al., 2020; Ferraz et al., 2015; Kurth et al., 2014).

Redução de ovos de *M. javanica* pela indução de respostas sistêmicas de defesa

O efeito indireto das actinobactérias sobre o nematoide das galhas foi confirmado usando o método de raiz bipartida. A redução na reprodução do nematoide foi confirmada com as actinobactérias *Kribbella* sp. 5N, *Streptomyces* sp. 6O, *Streptomyces* sp. 4L, *Streptomyces* sp. 10U e *Streptomyces* sp. 8S quando foram inoculadas nas raízes do lado oposto do nematoide. Nossos resultados confirmam relatos prévios que demonstraram a indução de respostas de defesa relacionados a resistência sistêmica contra patógenos fúngicos em plantas tratadas com as espécies do gênero *Streptomyces* (Abbasi et al., 2019; Kurth et al., 2014), vírus (Abo-Zaid et al., 2020), oomicetes (Abbasi et al., 2020) e bactérias (Ferraz et al., 2015). Entre as respostas de defesa induzidas por *Streptomyces* spp. em plantas de tomateiro contra o *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* incluem a ativação de enzimas antioxidantes catalase e peroxidase, além da expressão de genes relacionados com as respostas de resistência sistêmica induzida (Abbasi et al., 2019). Kurth et al. (2014) confirmaram a ativação das vias do ácido jasmônico e etileno e do ácido salicílico que levaram a supressão da infecção causada pelo agente causal do oídio do carvalho. Além dos fungos, a redução da severidade dos sintomas do *Tobacco Mosaic Virus* em plantas de tomate como consequência das respostas de defesa induzidas pela actinobactéria *S. cellulosa* incluíram o incrementado dos níveis de enzimas peroxidases e

quitinases, e o aumento da expressão de genes de proteínas relacionadas com patogênese (Abo-Zaid et al., 2020). Além disso, plantas de pimenta tratadas com a combinação das actinobactérias *S. vinaceusdrappus* e *S. rochei* apresentaram redução nos sintomas causados por *Phytophthora capsici*, confirmando o aumento da expressão de genes relacionados com a resistência sistêmica adquirida (Abbasi et al., 2020). No entanto, estudos focados no controle de nematoides fitoparasitas ainda não foram relatados.

Nós conseguimos selecionar pela combinação de diferentes mecanismos contra *M. javanica* os isolados *Streptomyces* sp., 4L, *Streptomyces* sp. 6O e *Kribbella* sp. 5N, os quais se destacaram pela redução de ovos ou galhas, indução de defesas sistêmicas, parasitismo de ovos e redução da penetração de juvenis de *M. javanica*. O isolado *Streptomyces* sp. 10U se destacou na redução de galhas, na indução de defesas sistêmicas e na redução da penetração de juvenis e o isolado *Kitasatospora* sp. 2AE se destacou na redução do número de ovos e na penetração de juvenis. Nós demonstramos que todas as actinobactérias usadas neste estudo apresentaram pelo menos um mecanismo de ação no controle do nematoide de galhas *M. javanica* e confirmamos o potencial de isolados do filo Actinobactéria no controle do nematoide das galhas.

Biocontrole e análise da expressão de genes de resistência nas plantas tratadas com *Streptomyces* sp. 4L

Pelo destaque frente ao controle de *M. javanica* com diferentes mecanismos de ação foi selecionada a bactéria *Streptomyces* sp. 4L para as análises da expressão de genes de resistência nas plantas de tomate. A ativação das vias de defesa associadas com o ácido jasmônico e etileno são parte das estratégias de defesa contra patógenos estimuladas nas plantas tratadas com as espécies do gênero *Streptomyces* (Abbasi et al., 2019, 2019; Ebrahimi-Zarandi et al., 2021; Patel et al., 2018). Nossos resultados demonstraram a redução do número de ovos de *M. javanica* em plantas pré-tratadas com *Streptomyces* sp. 4L, além disso foi confirmada a maior expressão dos genes *LOX* e *ACCO* relacionados com a biossíntese de jasmonatos e do etileno, respectivamente, nas primeiras 30 h após a inoculação do nematoide. Esses resultados coincidem com o observado com outros isolados de *Streptomyces*

spp., usados como agentes de biocontrole que ativaram as respostas de defesa das plantas contra patógenos (Abbasi et al., 2019; 2020).

A indução da expressão dos genes associados com AJ nas plantas tratadas com *Streptomyces* spp. foi previamente relatada e confirmam a redução dos níveis de doenças nas plantas tratadas. As espécies *S. enissocaesilis* e *S. rochei* isoladas de solos rizosféricos de tomate e pepino e usadas no pré-tratamento de plantas de tomate para controle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* confirmaram o aumento da expressão do genes *LOX*, similar ao tratamento químico com metil jasmonato, além disso, a eficácia do controle da doença nas plantas tratadas com as actinobactérias foi similar ao tratamento químico com Carbendazim® (Abbasi et al., 2019). Da mesma maneira, plantas de arroz pré-tratadas com *Streptomyces* spp. apresentaram menores danos causados pelo patógeno *Pyricularia oryzae* e o mecanismo de biocontrole foi associado ao aumento da expressão dos genes *LOX2*, *PR10* e *NPR1* (Patel et al., 2018). A ativação da expressão dos genes *LOXB* e *PAL1*, que codificam para as enzimas lipoxigenase (LOX) e fenilalanina amônia liase, respectivamente, relacionados com vias do ácido jasmônico e a fenil propanoídes, foi induzida nas plantas de tomate tratadas com *S. globisporus* e *S. praecox*, onde as actinobactérias se comportaram como endófitas nas raízes de tomate e induziram respostas de defesa contra *Rhizoctonia solani* (Ebrahimi-Zarandi et al., 2021).

A síntese do etileno constitui outra das respostas induzida nas plantas pré-tratadas com actinobactérias do gênero *Streptomyces*. Plantas de pimenta tratadas com *S. rochei* apresentaram reduções na severidade da doença causada por *Phytophthora capsici*, ocorrendo maior expressão do gene *ACCO* nos frutos em relação ao tratamento controle (Abbasi et al., 2020). Igualmente, plantas de tomate pré-tratadas com a Micosat F®, uma mistura dos agentes benéficos *Streptomyces* spp. *Agrobacterium radiobacter*, *Bacillus subtilis*, *Pichia pastoris*, *Glomus* spp., *G. mosseae*, *G. viscosum*, *Trichoderma harzianum*, *Pochonia chlamydosporia*, ativaram a expressão do gene *ACCO*, e como consequência o número de fêmeas e as massas de ovos do nematoide *M. javanica* foi reduzido significativamente (Molinari & Leonetti, 2019). Relatos que coincidem com nossos resultados, em que a redução do número de ovos de *M. javanica* poderia ser explicada pela ativação da expressão do gene *ACCO*, tanto nas primeiras 30 h, quanto nove dias depois da inoculação do nematoide.

A importância das vias do ácido jasmônico e do etileno durante o ciclo da doença do nematoide das galhas foi previamente estudada. O tratamento de plantas

de soja com jasmonato confirmou a indução do gene *LOX*. Nas plantas tratadas, a formação dos sítios de alimentação e o desenvolvimento do nematoide *M. hapla* foram afetados (Hu et al., 2017). No entanto, nas plantas de tomate tratadas com o nematoide *M. incognita*, os genes *ACCO*, *LOX* e *PR1* apresentaram menor expressão em relação ao controle, e como consequência, aconteceu a supressão da biossíntese do etileno, do ácido jasmônico, e a síntese de proteínas relacionadas com patogênese, favorecendo o estabelecimento nos sítios de alimentação e desenvolvimento do nematoide *M. incognita* (Shukla et al., 2018). Além disso, o papel dos genes associados com as vias do ácido jasmônico e do etileno no controle de nematoides fitoparasitas têm sido estudados em plantas mutantes de *Arabidopsis thaliana*. Em mutantes da via do etileno, houve o rápido estabelecimento e o sucesso no desenvolvimento do nematoide *Heterodera schachtii*, mas nos hospedeiros selvagens, a síntese de etileno induzida em resposta às feridas feitas pelos nematoides afetou o processo de infecção (Marhavý et al., 2019). Da mesma maneira, mutantes *lox4* de *A. thaliana* foram mais susceptíveis ao *M. javanica*, e o desenvolvimento e a reprodução do nematoide aconteceu com sucesso (Ozalvo et al., 2014).

Por outro lado, os nossos resultados mostraram que nas plantas inoculadas só com o nematoide *M. javanica* foi confirmada a expressão significativamente maior do gene *RBOH1* comparado com o tratamento controle. Estudos prévios demonstraram o aumento da atividade de NADPH oxidase e o acúmulo de H_2O_2 no início da infecção de *M. incognita* (Wang et al., 2019). O H_2O_2 atua como uma molécula sinalizadora da RSA. Nas plantas infiltradas com H_2O_2 , o desenvolvimento do patógeno *Pseudomonas syringae* foi afetado, e as plantas mutantes para *rboh1* inoculadas com o patógeno foram incapazes de acumular H_2O_2 afetando a ativação de respostas de defesa da planta (Wang et al., 2014). Junto com a indução de ROS nas primeiras 30 h após a infecção com o nematoide, nós confirmamos o aumento da expressão dos genes *PR1*. Previamente em plantas de soja infectadas com *M. hapla* foi confirmada a expressão dos genes *PR1* e *PR5* (Hu et al., 2017). Da mesma maneira, as análises da expressão do gene *PR1* em plantas infestadas com *M. javanica* demonstraram o aumento da expressão do gene nas primeiras 24 h (Medeiros et al., 2017). Por outro lado, a não indução da expressão do gene *PR1* em plantas tratadas com *Streptomyces* sp. pode ser explicada pela capacidade dos microrganismos

biocontroladores de reprimir as respostas imunes relacionadas com o AS (Morán-Diez et al., 2012).

O tratamento de tomateiro com *Streptomyces* sp. 4L + *M. javanica* não conduziu a um aumento significativo dos transcritos dos genes associados com a via do AS comparado com o tratamento controle. Esses resultados diferem dos resultados obtidos anteriormente em plantas pré-tratadas com a mistura de microrganismos benéficos incluindo o *Streptomyces* spp., que estimularam a expressão dos genes *PR-1b*, *PR-3*, e *PR-5*, onde as plantas tratadas foram menos sensíveis a infecção pelo nematoide *M. incognita* (Molinari & Leonetti, 2019). Em plantas de pimenta tratadas com *S. vinaceusdrappus* e *S. rochei* para controle de *Phytophthora capsici* não foi observada diferença significativa na expressão do gene *PR1* nos frutos das plantas tratadas, mas nas folhas das mesmas plantas os tratamentos com as actinobactérias e a combinação actinobactéria-patógeno estimularam a expressão do gene *PR1* (Abbasi et al., 2020). Da mesma maneira, a indução da expressão do gene *PR1* foi confirmada no tratamento de plantas com *S. rochei* e *S. enissocaesilis* e posterior inoculação com *F. oxysporum* (Abbasi et al., 2019).

Nossos resultados demonstram que o pré-tratamento com *Streptomyces* sp. 4L e posterior inoculação do patógeno *M. javanica* ativou a expressão dos genes *TomLoxA* e *ACCO*, associados com as vias de defesa do AJ e ET, respectivamente. O pré-tratamento com a actinobactéria *Streptomyces* sp. 4L ocasionou a redução da capacidade reprodutiva do nematoide, mostrando a ativação das respostas de defesa que afetam o desenvolvimento do nematoide.

REFERÊNCIAS

- Abbasi, S., Safaie, N., Sadeghi, A., & Shamsbakhsh, M. (2019). *Streptomyces* Strains Induce Resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Race 3 in Tomato Through Different Molecular Mechanisms. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01505>
- Abbasi, S., Safaie, N., Sadeghi, A., & Shamsbakhsh, M. (2020). Tissue-specific synergistic bio-priming of pepper by two *Streptomyces* species against *Phytophthora capsici*. *PLOS ONE*, 15(3), e0230531. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230531>

- Abo-Zaid, G. A., Matar, S. M., & Abdelkhalek, A. (2020). Induction of Plant Resistance against Tobacco Mosaic Virus Using the Biocontrol Agent *Streptomyces cellulosa* Isolate Actino 48. *Agronomy*, 10(11), 1620. <https://doi.org/10.3390/agronomy10111620>
- Ali, S., Ganai, B. A., Kamili, A. N., Bhat, A. A., Mir, Z. A., Bhat, J. A., Tyagi, A., Islam, S. T., Mushtaq, M., Yadav, P., Rawat, S., & Grover, A. (2018). Pathogenesis-related proteins and peptides as promising tools for engineering plants with multiple stress tolerance. *Microbiological Research*, 212-213, 29-37. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.04.008>
- Altieri, M.A., 1999. The ecological role of biodiversity in agroecosystems, in: Paoletti, M.G. (Ed.), *Invertebrate Biodiversity as Bioindicators of Sustainable Landscapes*. Elsevier, Amsterdam, pp. 19–31. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-50019-9.50005-4>
- Bonaldi, M., Chen, X., Kunova, A., Pizzatti, C., Saracchi, M., & Cortesi, P. (2015). Colonization of lettuce rhizosphere and roots by tagged *Streptomyces*. *Frontiers in Microbiology*, 6, 25. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00025>
- Borah, A., & Thakur, D. (2020). Phylogenetic and Functional Characterization of Culturable Endophytic Actinobacteria Associated With *Camellia* spp. For Growth Promotion in Commercial Tea Cultivars. *Frontiers in Microbiology*, 11, 318. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00318>
- Carneiro, R., Monteiro, T., Eckstein, B, Freitas, L. (2020). Controle de nematoides fitoparasitas. In E. M. G. Fontes, & M. C. Valadares-Inglis (Eds). *Controle biológico de pragas da agricultura* (pp. 371-411). Embrapa. <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/212490/1/CBdocument.pdf>
- Chanda, B., Xia, Y., Mandal, M. K., Yu, K., Sekine, K.-T., Gao, Q., Selote, D., Hu, Y., Stromberg, A., Navarre, D., Kachroo, A., & Kachroo, P. (2011). Glycerol-3-phosphate is a critical mobile inducer of systemic immunity in plants. *Nature Genetics*, 43(5), 421-427. <https://doi.org/10.1038/ng.798>
- Chen, C., Ye, Y., Wang, R., Zhang, Y., Wu, C., Debnath, S. C., Ma, Z., Wang, J., & Wu, M. (2018). *Streptomyces nigra* sp. Nov. Is a Novel Actinobacterium Isolated From Mangrove Soil and Exerts a Potent Antitumor Activity *in vitro*. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1587. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01587>

- Čihák, M., Kameník, Z., Šmídová, K., Bergman, N., Benada, O., Kofroňová, O., Petříčková, K., & Bobek, J. (2017). Secondary Metabolites Produced during the Germination of *Streptomyces coelicolor*. *Frontiers in Microbiology*, 0. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02495>
- Conrath, U. (2011). Molecular aspects of defence priming. *Trends in Plant Science*, 16(10), 524-531. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.06.004>
- Coombs, J. T., & Franco, C. M. M. (2003). Visualization of an Endophytic *Streptomyces* Species in Wheat Seed. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(7), 4260-4262. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.7.4260-4262.2003>
- De Vos, M., Van Oosten, V. R., Van Poecke, R. M. P., Van Pelt, J. A., Pozo, M. J., Mueller, M. J., Buchala, A. J., Métraux, J.-P., Van Loon, L. C., Dicke, M., & Pieterse, C. M. J. (2005). Signal signature and transcriptome changes of *Arabidopsis* during pathogen and insect attack. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 18(9), 923-937. <https://doi.org/10.1094/MPMI-18-0923>
- Dilley, D. R., Wang, Z., Kadirjan-Kalbach, D. K., Ververidis, F., Beaudry, R., & Padmanabhan, K. (2013). 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase reaction mechanism and putative post-translational activities of the ACCO protein. *AoB PLANTS*, 5(plt031). <https://doi.org/10.1093/aobpla/plt031>
- Doumbou, C. L., Hamby Salove, M. K., Crawford, D. L., & Beaulieu, C. (2001). Actinomycetes, promising tools to control plant diseases and to promote plant growth. *Phytoprotection*, 82(3), 85-102. <https://doi.org/10.7202/706219ar>
- Ebrahimi-Zarandi, M., Bonjar, G. H. S., Riseh, R. S., El-Shetehy, M., Saadoun, I., & Barka, E. A. (2021). Exploring Two *Streptomyces* Species to Control *Rhizoctonia solani* in Tomato. *Agronomy*, 11(7), 1384. <https://doi.org/10.3390/agronomy11071384>
- El-Shetehy, M., Wang, C., Shine, M. B., Yu, K., Kachroo, A., & Kachroo, P. (2015). Nitric oxide and reactive oxygen species are required for systemic acquired resistance in plants. *Plant Signaling & Behavior*, 10(9), e998544. <https://doi.org/10.1080/15592324.2014.998544>
- Escobar, C., Barcala, M., Cabrera, J., & Fenoll, C. (2015). Chapter One—Overview of Root-Knot Nematodes and Giant Cells. En C. Escobar & C. Fenoll (Eds.), *Advances in Botanical Research* (Vol. 73, pp. 1-32). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.abr.2015.01.001>

- Ferraz, H. G. M., Resende, R. S., Moreira, P. C., Silveira, P. R., Milagres, E. A., Oliveira, J. R., & Rodrigues, F. Á. (2015). Antagonistic rhizobacteria and jasmonic acid induce resistance against tomato bacterial spot. *Bragantia*, *74*, 417-427. <https://doi.org/10.1590/1678-4499.0074>
- Feussner, I., & Wasternack, C. (2002). The lipoxygenase pathway. *Annual Review of Plant Biology*, *53*, 275-297. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.53.100301.135248>
- Glazebrook, J., Chen, W., Estes, B., Chang, H.-S., Nawrath, C., Métraux, J.-P., Zhu, T., & Katagiri, F. (2003). Topology of the network integrating salicylate and jasmonate signal transduction derived from global expression phenotyping. *The Plant Journal*, *34*(2), 217-228. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01717.x>
- Haesler, F., Hagn, A., Frommberger, M., Hertkorn, N., Schmitt-Kopplin, P., Munch, J. C., & Schloter, M. (2008). *In vitro* antagonism of an actinobacterial *Kitasatospora* isolate against the plant pathogen *Phytophthora citricola* as elucidated with ultrahigh resolution mass spectrometry. *Journal of Microbiological Methods*, *75*(2), 188-195. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.05.028>
- Hu, Y., You, J., Li, C., Hua, C., & Wang, C. (2017). Exogenous application of methyl jasmonate induces defence against *Meloidogyne hapla* in soybean. *Nematology*, *19*(3), 293-304. <https://doi.org/10.1163/15685411-00003049>
- Hussain, M., Hamid, M. I., Tian, J., Hu, J., Zhang, X., Chen, J., Xiang, M., & Liu, X. (2018). Bacterial community assemblages in the rhizosphere soil, root endosphere and cyst of soybean cyst nematode-suppressive soil challenged with nematodes. *FEMS Microbiology Ecology*, *94*(10). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy142>
- Hwang, J. Y., Kim, S. H., Oh, H. R., Cho, Y.-J., Chun, J., Chung, Y. R., & Nam, D. H. (2014). Draft Genome Sequence of *Kitasatospora cheerisanensis* KCTC 2395, Which Produces Plecomacrolide against Phytopathogenic Fungi. *Genome Announcements*, *2*(3), e00604-14. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00604-14>
- Jin, N., Lu, X., Wang, X., Liu, Q., Peng, D., & Jian, H. (2019). The effect of combined application of *Streptomyces rubrogriseus* HDZ-9-47 with soil biofumigation on soil microbial and nematode communities. *Scientific Reports*, *9*(1), 16886. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52941-9>

- Jin, N., Xue, H., Li, W., Wang, X., Liu, Q., Liu, S., Liu, P., Zhao, J., & Jian, H. (2017). Field evaluation of *Streptomyces rubrogriseus* HDZ-9-47 for biocontrol of *Meloidogyne incognita* on tomato. *Journal of Integrative Agriculture*, 16(6), 1347-1357. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(16\)61553-8](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(16)61553-8)
- Kaur, T., Jasrotia, S., Ohri, P., & Manhas, R. K. (2016). Evaluation of in vitro and in vivo nematicidal potential of a multifunctional streptomycete, *Streptomyces hydrogenans* strain DH16 against *Meloidogyne incognita*. *Microbiological Research*, 192, 247-252. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.07.009>
- Kim, S.-S., Kang, S.-I., Kim, J.-S., Lee, Y.-S., Hong, S.-H., Naing, K. W., & Kim, K.-Y. (2011). Biological Control of Root-knot Nematode by *Streptomyces sampsonii* KK1024. *Korean Journal of Soil Science and Fertilizer*, 44(6), 1150-1157. <https://doi.org/10.7745/KJSSF.2011.44.6.1150>
- Kurth, F., Mailänder, S., Bönn, M., Feldhahn, L., Herrmann, S., Große, I., Buscot, F., Schrey, S. D., & Tarkka, M. T. (2014). *Streptomyces*-induced resistance against oak powdery mildew involves host plant responses in defense, photosynthesis, and secondary metabolism pathways. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 27(9), 891-900. <https://doi.org/10.1094/MPMI-10-13-0296-R>
- Law, J. W.-F., Chan, K.-G., He, Y.-W., Khan, T. M., Ab Mutalib, N.-S., Goh, B.-H., & Lee, L.-H. (2019). Diversity of *Streptomyces* spp. From mangrove forest of Sarawak (Malaysia) and screening of their antioxidant and cytotoxic activities. *Scientific Reports*, 9, 15262. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51622-x>
- Lee, L.-H., Zainal, N., Azman, A.-S., Eng, S.-K., Ab Mutalib, N.-S., Yin, W.-F., & Chan, K.-G. (2014). *Streptomyces pluripotens* sp. Nov., a bacteriocin-producing streptomycete that inhibits meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(Pt 9), 3297-3306. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.065045-0>
- Marhavý, P., Kurenda, A., Siddique, S., Dénervaud Tendon, V., Zhou, F., Holbein, J., Hasan, M. S., Grundler, F. M., Farmer, E. E., & Geldner, N. (2019). Single-cell damage elicits regional, nematode-restricting ethylene responses in roots. *The EMBO Journal*, 38(10), e100972. <https://doi.org/10.15252/embj.2018100972>
- Medeiros, H. A. de, Filho, J. V. de A., Freitas, L. G. de, Castillo, P., Rubio, M. B., Hermosa, R., & Monte, E. (2017). Tomato progeny inherit resistance to the nematode *Meloidogyne javanica* linked to plant growth induced by the biocontrol

- fungus *Trichoderma atroviride*. *Scientific Reports*, 7(1), 1-13.
<https://doi.org/10.1038/srep40216>
- Meidani, C., Savvidis, A., Lampropoulou, E., Sagia, A., Katsifas, E., Monokrousos, N., Hatzinikolaou, D. G., Karagouni, A. D., Giannoutsou, E., Adamakis, I.-D. S., & Ntalli, N. G. (2020). The Nematicidal Potential of Bioactive *Streptomyces* Strains Isolated from Greek Rhizosphere Soils Tested on *Arabidopsis* Plants of Varying Susceptibility to *Meloidogyne* spp. *Plants*, 9(6), 699.
<https://doi.org/10.3390/plants9060699>
- Meij, A. van der, Willemse, J., Schneijderberg, M. A., Geurts, R., Raaijmakers, J. M., & Wezel, G. P. van. (2017). Inter- and intracellular colonization of *Arabidopsis* roots by endophytic actinobacteria and the impact of plant hormones on their antimicrobial activity (p. 222844). <https://doi.org/10.1101/222844>
- Mendes, R., Kruijt, M., de Bruijn, I., Dekkers, E., van der Voort, M., Schneider, J. H. M., Piceno, Y. M., DeSantis, T. Z., Andersen, G. L., Bakker, P. A. H. M., & Raaijmakers, J. M. (2011). Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. *Science (New York, N.Y.)*, 332(6033), 1097-1100. <https://doi.org/10.1126/science.1203980>
- Moens, M., Perry, R. N., & Starr, J. L. (2009). *Meloidogyne* species—A diverse group of novel and important plant parasites. In R. N. Perry, M. Moens, & J. L. Starr (Eds.), *Root-knot nematodes* (pp. 1-17). CABI. <https://doi.org/10.1079/9781845934927.0001>
- Molinari, S., & Leonetti, P. (2019). Bio-control agents activate plant immune response and prime susceptible tomato against root-knot nematodes. *PLOS ONE*, 14(12), e0213230. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213230>
- Morán-Diez, E., Rubio, B., Domínguez, S., Hermosa, R., Monte, E., & Nicolás, C. (2012). Transcriptomic response of *Arabidopsis thaliana* after 24 h incubation with the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. *Journal of Plant Physiology*, 169(6), 614-620. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2011.12.016>
- Mülner, P., Bergna, A., Wagner, P., Sarajlić, D., Gstöttenmayr, B., Dietel, K., Grosch, R., Cernava, T., & Berg, G. (2019). Microbiota Associated with Sclerotia of Soilborne Fungal Pathogens – A Novel Source of Biocontrol Agents Producing Bioactive Volatiles. *Phytobiomes Journal*, 3(2), 125-136.
<https://doi.org/10.1094/PBIOMES-11-18-0051-R>

- Nishad, R., Ahmed, T., Rahman, V. J., & Kareem, A. (2020). Modulation of Plant Defense System in Response to Microbial Interactions. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 1298. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01298>
- Ozalvo, R., Cabrera, J., Escobar, C., Christensen, S. A., Borrego, E. J., Kolomiets, M. V., Castresana, C., Iberkleid, I., & Brown Horowitz, S. (2014). Two closely related members of Arabidopsis 13-lipoxygenases (13-LOXs), LOX3 and LOX4, reveal distinct functions in response to plant-parasitic nematode infection. *Molecular Plant Pathology*, *15*(4), 319-332. <https://doi.org/10.1111/mpp.12094>
- Park, E.-J., Jang, H.-J., Park, C. S., Lee, S.-J., Lee, S., Kim, K.-H., Yun, B.-S., & Rho, S. W. L. and M.-C. (2020). *Evaluation of Nematicidal Activity of Streptomyces yatsensis* KRA-28 against *Meloidogyne incognita*. *30*(5), 700-707. <https://doi.org/10.4014/jmb.1908.08038>
- Patel, J. K., Madaan, S., & Archana, G. (2018). Antibiotic producing endophytic *Streptomyces* spp. Colonize above-ground plant parts and promote shoot growth in multiple healthy and pathogen-challenged cereal crops. *Microbiological Research*, *215*, 36-45. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.06.003>
- Pieterse, C. M. J., Zamioudis, C., Berendsen, R. L., Weller, D. M., Van Wees, S. C. M., & Bakker, P. A. H. M. (2014). Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual Review of Phytopathology*, *52*, 347-375. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102340>
- Pithakkit, S., Petcharat, V., Chuenchit, S., Pornsuriya, C., & Sunpapao, A. (2015). Isolation of Antagonistic Actinomycetes Species from Rhizosphere as Effective Biocontrol Against Oil Palm Fungal Diseases. *Walailak Journal of Science and Technology (WJST)*, *12*(5), 481-490.
- Radwan, M. A., Farrag, S. A. A., Abu-Elamayem, M. M., & Ahmed, N. S. (2012). Biological control of the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* on tomato using bioproducts of microbial origin. *Applied Soil Ecology*, *56*, 58-62. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.02.008>
- Sharma, M., Jasrotia, S., Ohri, P., & Manhas, R. K. (2019). Nematicidal potential of *Streptomyces antibioticus* strain M7 against *Meloidogyne incognita*. *AMB Express*, *9*(1), 168. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0894-2>
- Sharma, V., & Salwan, R. (2018). Chapter 6—Biocontrol Potential and Applications of Actinobacteria in Agriculture. En B. P. Singh, V. K. Gupta, & A. K. Passari (Eds.),

- New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering* (pp. 93-108). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63994-3.00006-0>
- Shima, J., Penyige, A., & Ochi, K. (1996). Changes in patterns of ADP-ribosylated proteins during differentiation of *Streptomyces coelicolor* A3(2) and its development mutants. *Journal of Bacteriology*, 178(13), 3785-3790. <https://doi.org/10.1128/jb.178.13.3785-3790.1996>
- Shukla, N., Yadav, R., Kaur, P., Rasmussen, S., Goel, S., Agarwal, M., Jagannath, A., Gupta, R., & Kumar, A. (2018). Transcriptome analysis of root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*)-infected tomato (*Solanum lycopersicum*) roots reveals complex gene expression profiles and metabolic networks of both host and nematode during susceptible and resistance responses. *Molecular Plant Pathology*, 19(3), 615-633. <https://doi.org/10.1111/mpp.12547>
- Soares, A. C. F., Sousa, C. da S., Garrido, M. da S., & Perez, J. O. (2007). Production of streptomycete inoculum in sterilized rice. *Scientia Agricola*, 64, 641-644. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162007000600013>
- Van der Ent, S., Van Wees, S. C. M., & Pieterse, C. M. J. (2009). Jasmonate signaling in plant interactions with resistance-inducing beneficial microbes. *Phytochemistry*, 70(13), 1581-1588. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.06.009>
- Wang, C., El-Shetehy, M., Shine, M. B., Yu, K., Navarre, D., Wendehenne, D., Kachroo, A., & Kachroo, P. (2014). Free Radicals Mediate Systemic Acquired Resistance. *Cell Reports*, 7(2), 348-355. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.03.032>
- Wang, G., Hu, C., Zhou, J., Liu, Y., Cai, J., Pan, C., Wang, Y., Wu, X., Shi, K., Xia, X., Zhou, Y., Foyer, C. H., & Yu, J. (2019). Systemic Root-Shoot Signaling Drives Jasmonate-Based Root Defense against Nematodes. *Current Biology*, 29(20), 3430-3438.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.08.049>
- Wesemael, W., Viaene, N., & Moens, M. (2011). Root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in Europe. *Nematology*, 13(1), 3-16. <https://doi.org/10.1163/138855410X526831>
- Whitman, W. B., Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H.-J., Trujillo, M. E., Ludwig, W., & Suzuki, K. (2012). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 5: The Actinobacteria*. Springer Science & Business Media.

- Yoon, G. Y., Lee, Y. S., Lee, S. Y., Park, R. D., Hyun, H. N., Nam, Y., & Kim, K. Y. (2012). Effects on *Meloidogyne incognita* of chitinase, glucanase and a secondary metabolite from *Streptomyces cacaoi* GY525. *Nematology*, *14*(2), 175-184. <https://doi.org/10.1163/138855411X584124>
- Zeng, Q., Huang, H., Zhu, J., Fang, Z., Sun, Q., & Bao, S. (2013). A new nematocidal compound produced by *Streptomyces albogriseolus* HA10002. *Antonie van Leeuwenhoek*, *103*(5), 1107-1111. <https://doi.org/10.1007/s10482-013-9890-8>

Tabela 1. Isolados de actinobactérias usados neste estudo

Código	Origem
1A	Universidade Federal de Viçosa (UFV)- Viçosa, MG
2AE	UFV, Viçosa, MG
3F	UFV, Viçosa, MG
4L	UFV, Viçosa, MG
5N	São Gabriel do Oeste, <i>MS</i>
6O	São Gabriel do Oeste, MS
7P	São Gabriel do Oeste, MS
8S	Primavera do Leste, MT
9T	Primavera do Leste, MT
10U	Primavera do Leste, MT

Tabela 2. *Primers* usados na qRT-PCR

Gene	Primer (5'-3')	Referencia
<i>TomLoxA</i>	<i>fw</i> TGAACCATGGTGGGCTGAAA <i>rv</i> CTGCCCGAAATTGACTGCTG	(Tucci et al., 2011)
<i>ACCO</i>	<i>fw</i> GCCCTGCTTATCTTCGATTG <i>rv</i> TTCGTGCTTGATCAGAATGC	(Lindo et al., 2020)
<i>PR1</i>	<i>fw</i> TCCGAGAGGCCAAGCTATAA <i>rv</i> GACTGAGTTGCGCCAGACTA	(Song et al., 2018)
<i>RBOH1</i>	<i>fw</i> GGAGCTCCAGCACAAGATTA <i>rv</i> CTTGTTGCAGCACTCATGTC	(Song et al., 2018)
<i>Actin</i>	<i>fw</i> CACCACTGCTGAACGGGAA <i>rv</i> GGAGCTGCTCCTGGCAGTTT	(Tucci et al., 2011)

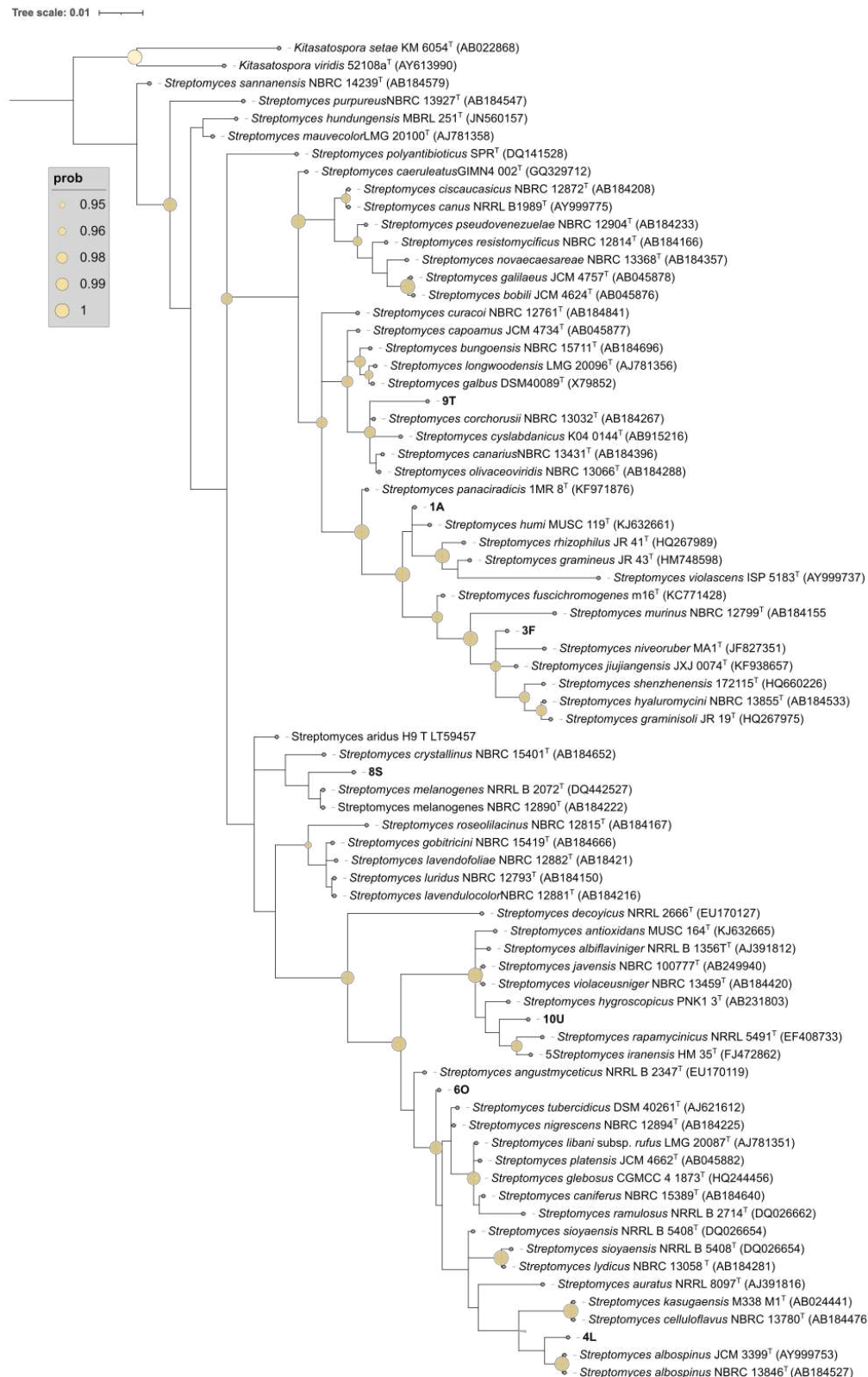


Figura 1. Filograma baseado na Inferência Bayesiana de seqüências de rDNA 16S das actinobactérias do solo 1A, 3F, 4L, 6O, 8S, 9T, 10U e espécies do gênero *Streptomyces* selecionadas. A probabilidade posterior está indicada próxima aos nós dos ramos. A árvore foi enraizada em *Kitasatospora viridis* e *K. setae*.

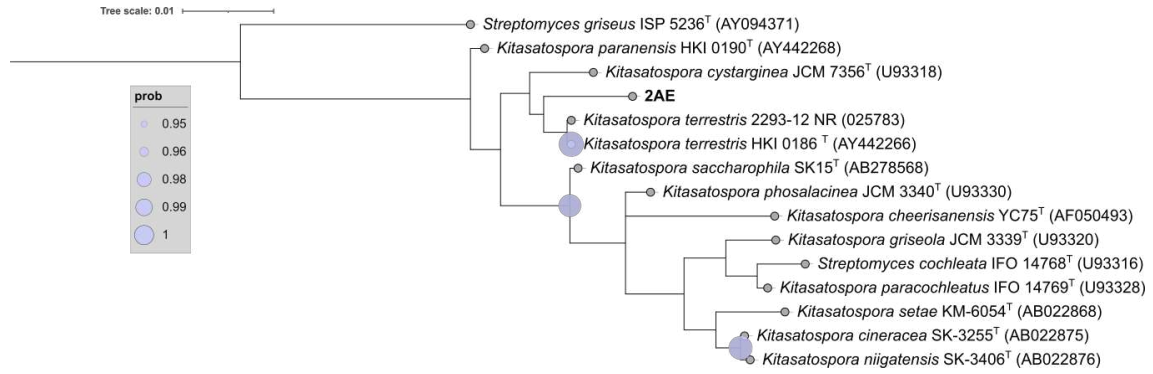


Figura 2. Filograma baseado na Inferência Bayesiana de sequências de rDNA 16S da actinobactéria do solo 2AE e espécies do gênero *Kitasatospora* selecionadas. A probabilidade posterior está indicada próxima aos nós dos ramos. A árvore foi enraizada em *S. griseus*

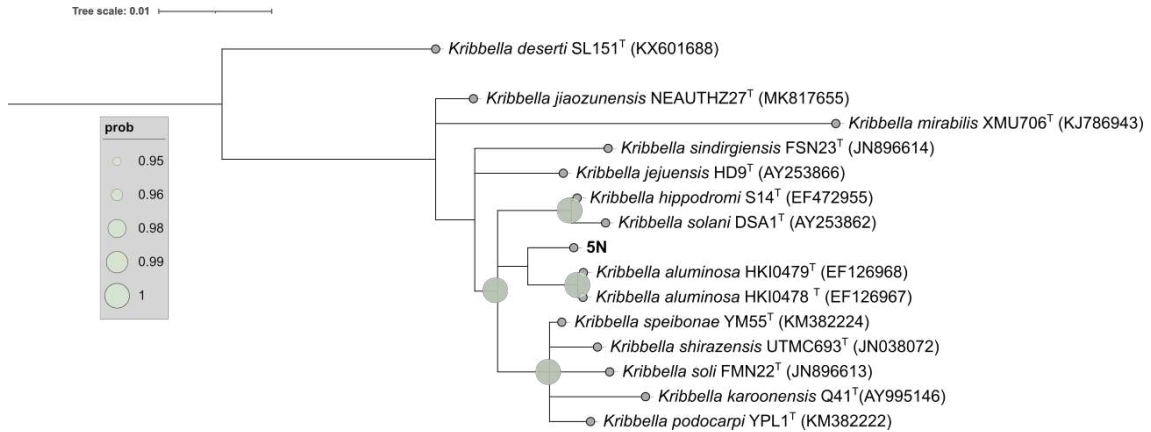


Figura 3. Filograma baseado na Inferência Bayesiana de seqüências de rDNA 16S da actinobactéria do solo 5N e de espécies do gênero *Kribbella* selecionadas. A probabilidade posterior está indicada próxima aos nós dos ramos. A árvore foi enraizada em *K. deserti*

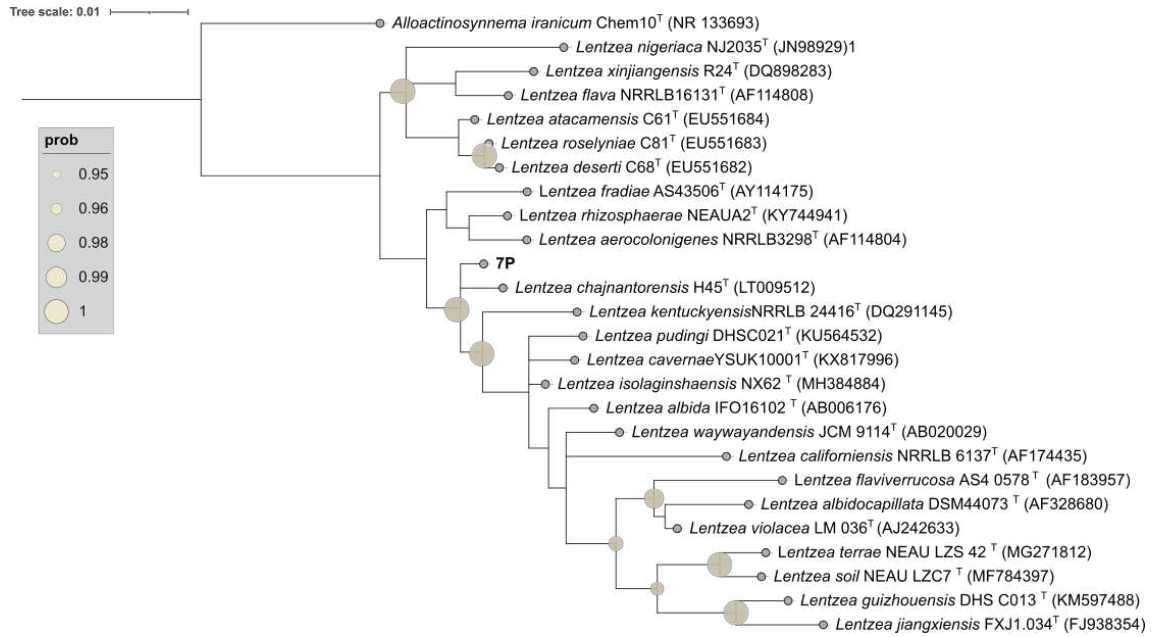


Figura 4. Filograma baseado na Inferência Bayesiana de sequências de rDNA 16S da actinobactéria do solo 7P e de espécies do gênero *Lentzea* selecionadas. A probabilidade posterior está indicada próxima aos nós dos ramos. A árvore foi enraizada em *A. iranicum*.

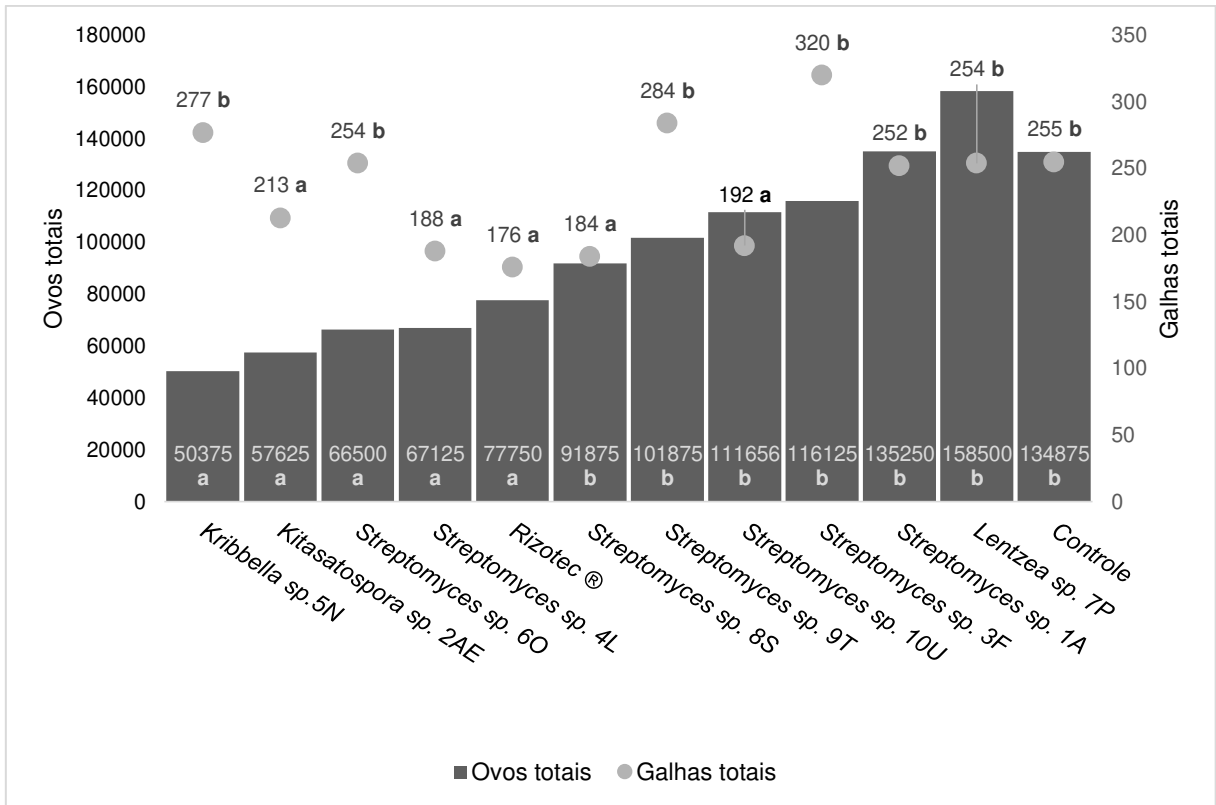


Figura 5. Número de ovos e galhas de *M. javanica* em raízes de tomateiro inoculadas com actinobactérias, após 46 dias da infestação com o nematoide. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre tratamentos de acordo com o teste de Scott-knott.

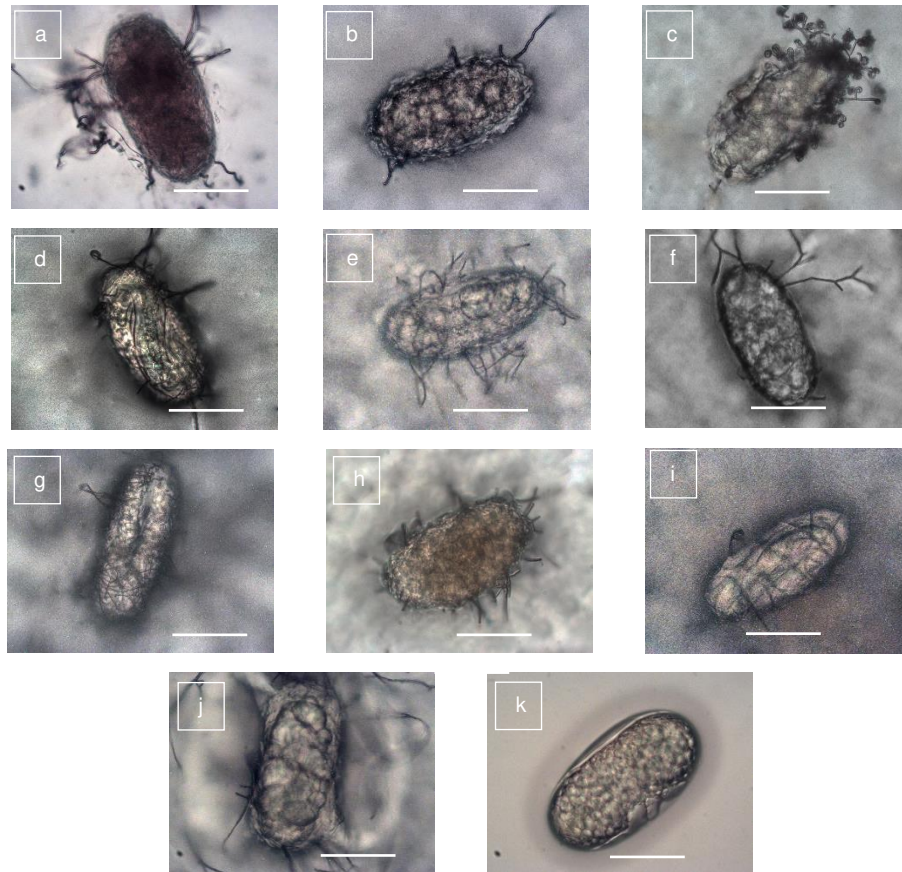


Figura 6. Parasitismo de ovos de *M. javanica* pelas actinobactérias do solo. **a.** *Streptomyces* sp. 1A. **b.** *Kitasatospora* sp. 2AE. **c.** *Streptomyces* sp. 3F. **d.** *Streptomyces* sp. 4L. **e.** *Kribbella* sp. 5N. **f.** *Streptomyces* sp. 6O. **g.** *Lentzea* sp. 7P. **h.** *Streptomyces* sp. 8S. **i.** *Streptomyces* sp. 9T. **j.** *Streptomyces* sp. 10U. **k.** Controle. As barras correspondem a 50 μm .

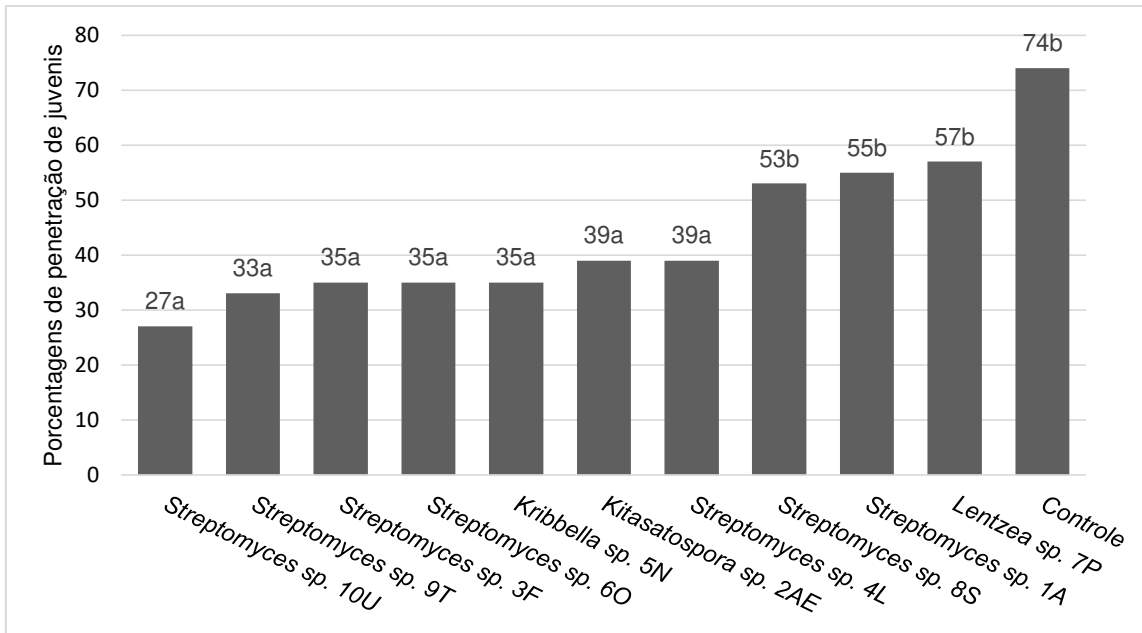


Figura 7. Porcentagem de penetração de juvenis de *M. javanica* em raízes de tomateiro tratadas com actinobactérias, após 10 dias da infestação com o nematoide. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre tratamentos de acordo com o teste de Scott-knott.

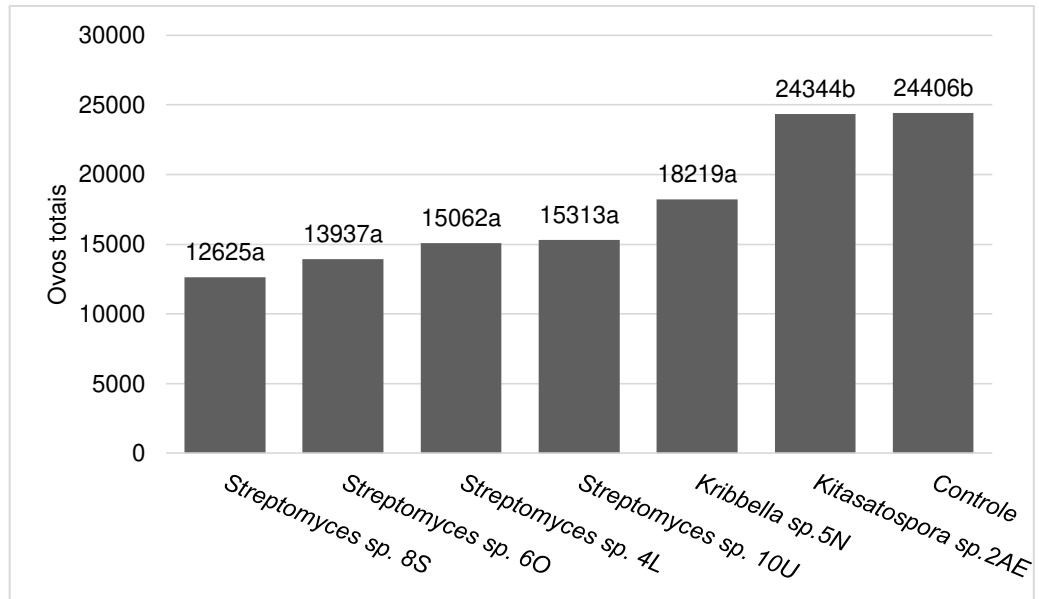


Figura 8. Número de ovos de *M. javanica* em raízes de tomateiro tratadas com actinobactérias e submetidas a técnica de raiz bipartida para avaliar indução de resistência sistêmica, 34 dias após a infestação com o nematoide. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre tratamentos de acordo com o teste de Scott-knott.

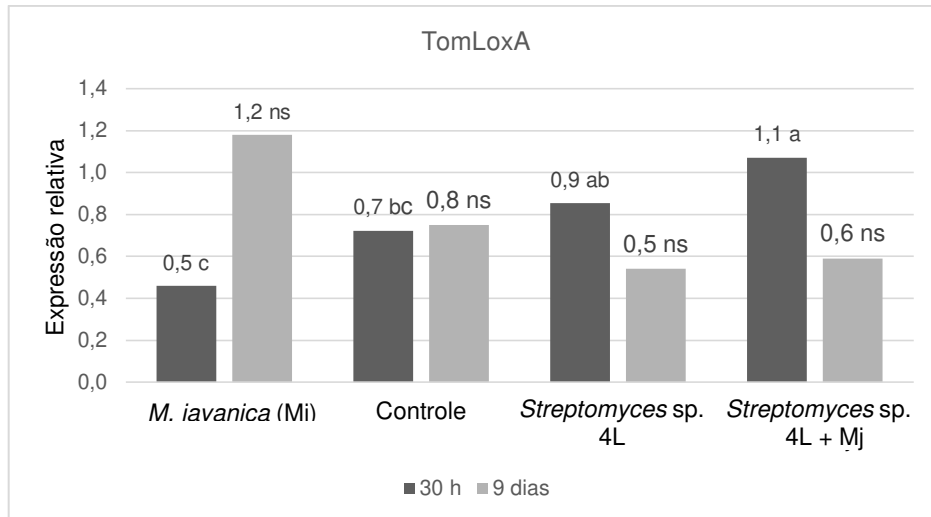


Figura 9. Expressão do gene *TomLoxA* que codifica lipoxigenase em plantas de tomate tratadas com *M. javanica*, *Streptomyces* sp. 4L, *Streptomyces* sp. 4L + *M. javanica* após 30 h e 9 dias do tratamento com o nematoide. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os tratamentos de acordo com o teste de Tukey 5%. ns: não diferenças significativas.

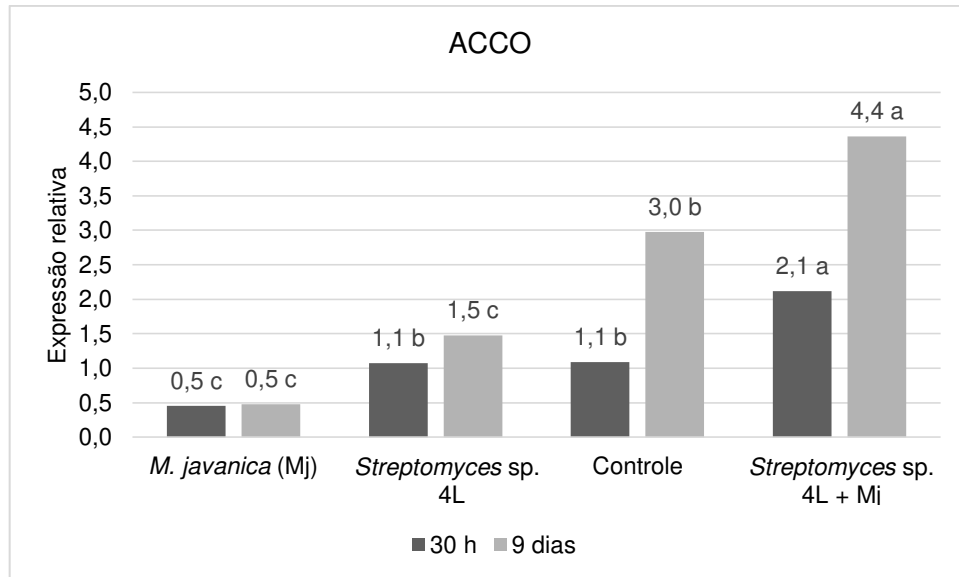


Figura 10. Expressão do gene *ACCO* que codifica ACC oxidase em plantas de tomate tratadas com *M. javanica*, *Streptomyces* sp. 4L, *Streptomyces* sp. 4L + *M. javanica* após 30 h e 9 dias do tratamento com o nematoide. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre tratamentos de acordo com o teste de Tukey 5%

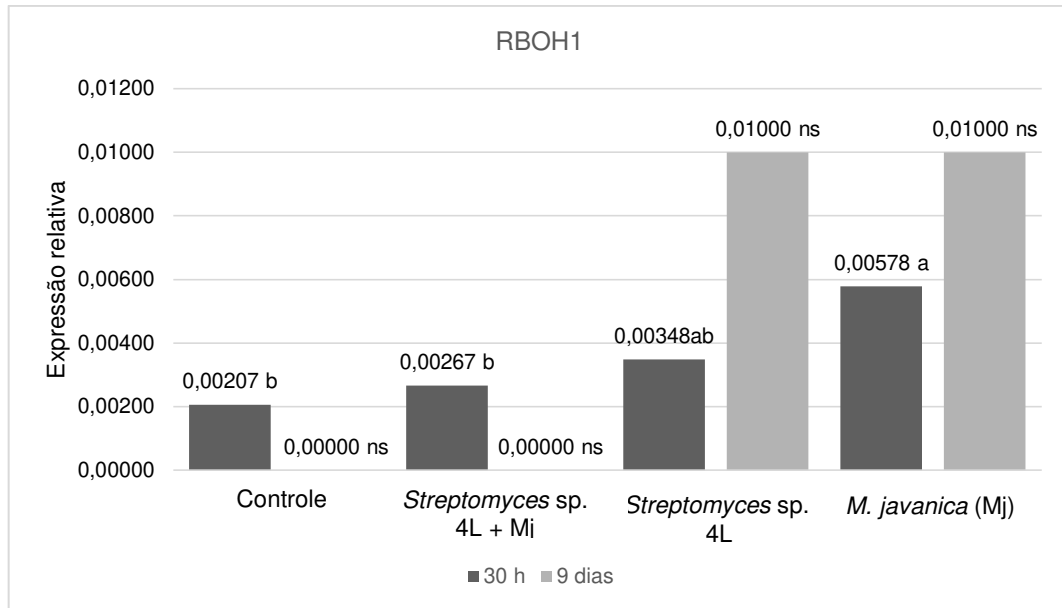


Figura 11. Expressão do gene *RBOH1* que codifica ADPH oxidase em plantas de tomate tratadas com *M. javanica*, *Streptomyces sp.* 4L, *Streptomyces sp.* 4L + *M. javanica* após 30 h e 9 dias do tratamento com o nematoide. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre tratamentos de acordo com o teste de Tukey 5%. ns: Não diferenças significativas

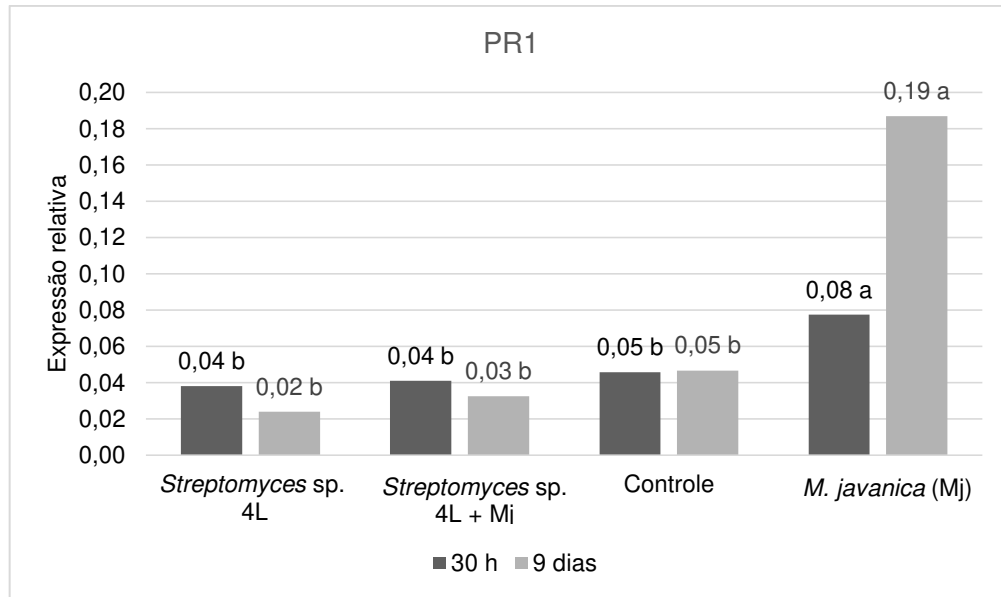


Figura 12. Expressão do gene *PR1* que codifica proteína relacionada com patogênese em plantas de tomate tratadas com *M. javanica*, *Streptomyces* sp. 4L, *Streptomyces* sp. 5L + *M. javanica* após 30 h e 9 dias do tratamento com o nematoide. Diferentes letras indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre tratamentos de acordo com o teste de Tukey 5%

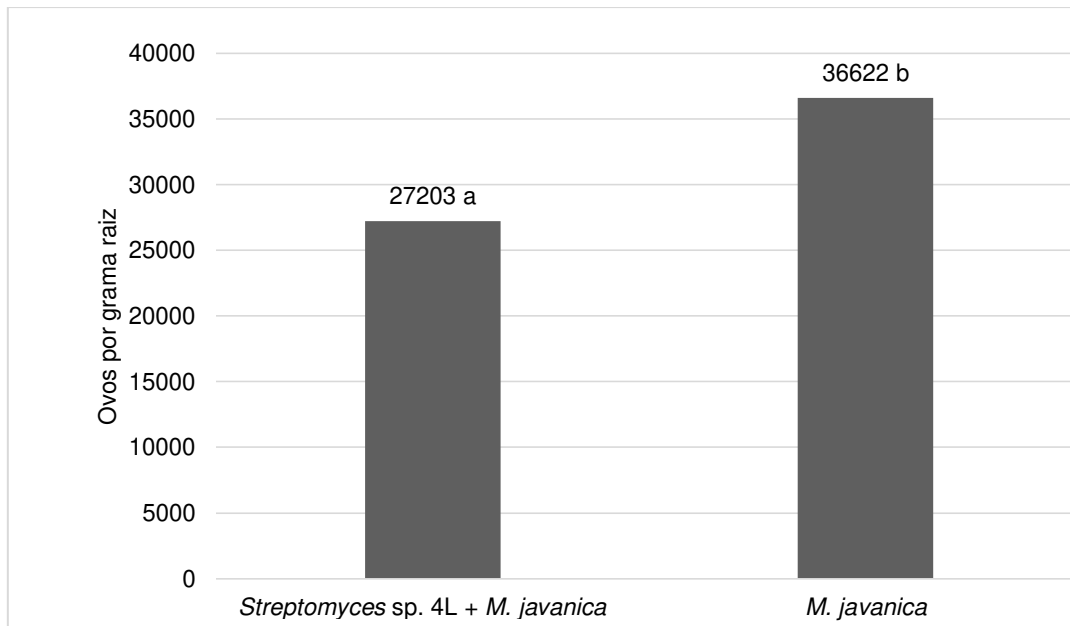


Figura 13. Número de ovos de *M. javanica* em raízes de tomateiro tratadas com *Streptomyces* sp. 4L após 35 dias do tratamento com o nematoide. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre tratamentos de acordo com o teste de Tukey 5%.

CONCLUSÕES

Os fungos *T. erinaceum* 610F e *Trichoderma* sp. 22F controlam de maneira eficiente o nematoide de galhas *M. javanica* em plantas de tomate.

As actinobactérias do solo dos gêneros *Streptomyces*, *Kitasatospora*, *Kribbella* e *Lentzea* tem potencial de biocontrole contra o nematoide de galhas *M. javanica*.

Streptomyces sp. 4L, *Streptomyces* sp. 6O, *Kribbella* sp.5N se destacaram pela eficácia de biocontrole de *M. javanica*, atuando com diferentes mecanismos de ação. As reduções do número de ovos e galhas de *M. javanica* demonstradas em nosso estudo estão associadas com a ação combinada dos diferentes mecanismos confirmados, que incluem o parasitismo de ovos, a indução de respostas de defesa sistêmicas e o efeito na redução da penetração dos juvenis de *M. javanica* nas raízes.

Tanto fungos quanto actinobactérias atuaram por meio de parasitismo de ovos, redução da penetração dos juvenis na raiz e indução de defesas sistêmicas nas plantas.

O pré-tratamento de plantas com *Streptomyces* sp. 4L. e posterior inoculação com o *M. javanica* induz as respostas de defesa associadas com as vias do ácido jasmonico (gene *TomLoxA*) e do etileno (gene *ACCO*).