

**LUIZ FELIPE DE CASTRO DO CARMO PINTO**

**ATIVIDADE DE RIZOBACTÉRIAS DE PLANTAS ANTAGONISTAS SOBRE OS  
NEMATOIDES DAS GALHAS (*Meloidogyne incognita* e *Meloidogyne javanica*) EM  
PLANTAS DE SOJA**

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

Orientador: Leandro Grassi de Freitas

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2023**

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

T

- P659a  
2023
- Pinto, Luiz Felipe de Castro do Carmo, 1995-  
Atividade de rizobactérias de plantas antagonistas sobre os  
nematoides das galhas (*Meloidogyne incognita* e *Meloidogyne  
javanica*) em plantas de soja / Luiz Felipe de Castro do Carmo Pinto. -  
Viçosa, MG, 2023.  
1 dissertação eletrônica (39 f.): il. (algumas color.).
- Inclui apêndice.  
Orientador: Leandro Grassi de Freitas.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,  
Departamento de Fitopatologia, 2023.  
Referências bibliográficas: f. 31-36.  
DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.767>  
Modo de acesso: World Wide Web.
1. Soja - Doenças e pragas - Controle biológico. 2. Rizobactérias  
promotoras do crescimento de plantas. 3. Nematóide-das-galhas -  
Populações. I. Freitas, Leandro Grassi de, 1963-. II. Universidade  
Federal de Viçosa. Departamento de Fitopatologia. Programa de Pós-  
Graduação em Fitopatologia. III. Título.

CDD 22. ed. 633.3496

Bibliotecário(a) responsável: Alice Regina Pinto Pires CRB-6/2523


**LUIZ FELIPE DE CASTRO DO CARMO PINTO**

**ATIVIDADE DE RIZOBACTÉRIAS DE PLANTAS ANTAGONISTAS SOBRE OS NEMATÓIDES DAS GALHAS (*Meloidogyne incognita* e *Meloidogyne javanica*) EM PLANTAS DE SOJA**

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


APROVADA: 20 de junho de 2023.

Assentimento:

Documento assinado digitalmente  
 **LUIZ FELIPE DE CASTRO DO CARMO PINTO**  
Data: 11/12/2023 12:23:59-0300  
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

---

Luiz Felipe de Castro do Carmo Pinto  
Autor

Documento assinado digitalmente  
 **LEANDRO GRASSI DE FREITAS**  
Data: 11/12/2023 15:22:04-0300  
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

---

Leandro Grassi de Freitas  
Orientador

*A Deus,  
Aos meus pais, Marcelo e Edna.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre comigo, mesmo nos momentos de incertezas.

Aos meus pais Marcelo e Edna, por sempre acreditarem e me incentivarem, e por serem sempre meu ponto de apoio e acolhimento nos momentos difíceis. Muito obrigado por tudo.

Aos meus avós Erotildes e Elza, por todos os conselhos e pelo carinho de sempre.

Aos meus amigos e companheiros de sempre: Guilherme, Samuelson e Thiago, pela amizade duradoura e pelos momentos de alegria e descontração.

Aos colegas do laboratório de Controle Biológico de Fitonematoides (BIONEMA): Osmar, Dyenici, Cássia, Huarlen, Sol e Jadhe, pelos auxílios nas avaliações e por tornarem esta caminhada mais leve.

À Thalita, pelas sugestões e ideias para realização deste trabalho.

Ao Huarlen, pela ajuda na finalização deste trabalho.

Ao Túlio, por ceder os estudos filogenéticos realizados.

Ao Sr. Mário e dona Neusa, funcionários do Viveiro de Café, pelo auxílio e cuidado com meus experimentos e, claro, pelos cafezinhos ao final da tarde.

Ao meu orientador Leandro Grassi de Freitas, pela atenção, confiança e ensinamentos a mim transmitidos.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar a pós-graduação.

Ao programa de pós-graduação em Fitopatologia.

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

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho,

muito OBRIGADO!

## **BIOGRAFIA**

Luiz Felipe de Castro do Carmo Pinto, filho de Marcelo do Carmo Pinto e Edna Aparecida de Castro do Carmo Pinto, nasceu em Cataguases, Minas Gerais, no dia 08 de setembro de 1995.

Em março de 2014, ingressou no curso de Agronomia na Universidade Federal de Viçosa (UFV), concluindo a graduação em janeiro de 2021.

Em março de 2021 iniciou o mestrado em Fitopatologia na Universidade Federal de Viçosa (UFV), defendendo a dissertação em junho de 2023.

## RESUMO

PINTO, Luiz Felipe de Castro do Carmo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2023. **Atividade de rizobactérias de plantas antagonistas sobre os nematoides das galhas (*Meloidogyne incognita* e *Meloidogyne javanica*) em plantas de soja.** Orientador: Leandro Grassi de Freitas.

Os nematoides das galhas, em especial as espécies *Meloidogyne incognita* e *M. javanica*, são os nematoides de maior relevância na cultura da soja. Dentre as medidas de controle para estes nematoides, o controle biológico tem se tornado uma ferramenta cada vez mais eficaz na diminuição dos níveis populacionais destas espécies no campo. O uso de rizobactérias no manejo pode resultar no biocontrole de *Meloidogyne* spp. e favorecer o incremento vegetativo da planta hospedeira. O objetivo deste trabalho foi verificar a capacidade de três estirpes de rizobactérias, Cs-2, Mc-3 e Cs-12, em reduzir a reprodução ou controlar os níveis populacionais de *M. incognita* e *M. javanica*, além de verificar a capacidade destas estirpes em promover o ganho de massa vegetal em plantas de soja. Os experimentos foram realizados em casa-de-vegetação, sob temperatura média de 27 °C. Após 60 dias, foram avaliados o número de ovos e de galhas por grama de raiz e a massa da parte aérea fresca e seca e a massa da raiz fresca e seca. Não foram observados efeitos de biocontrole para ambas as espécies de *Meloidogyne* spp., fato este confirmado pela contagem do número de ovos e galhas das plantas de soja infectadas. Em contrapartida, a rizobactéria Cs-12, pertencente ao gênero *Bacillus*, foi capaz de garantir um aumento de massa seca do sistema radicular em plantas de soja saudáveis, em comparação com o tratamento testemunha. Apesar de não resultarem no biocontrole de nematoides das galhas quando aplicadas via sulco de plantio, o isolado Cs-12 foi efetivo em promover o crescimento radicular da soja.

Palavras-chave: Fitonematoides. Controle biológico. Níveis populacionais. Rizobactérias promotoras do crescimento (PGPRs).

1 **ABSTRACT**

2 PINTO, Luiz Felipe de Castro do Carmo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2023.  
3 **Antagonistic plant rhizobacteria activity on root-knot nematodes (*Meloidogyne incognita***  
4 **and *Meloidogyne javanica*) in soybean plants.** Advisor: Leandro Grassi de Freitas.

5  
6 Root-knot nematodes, especially the species *Meloidogyne incognita* and *M. javanica*, are the  
7 most important nematodes in the soybean crop. Among the control measures for these  
8 nematodes, biological control has become an increasingly effective tool in reducing the  
9 population levels of these species in the field. The use of rhizobacteria in management can result  
10 in the biocontrol of *Meloidogyne* spp. and favor the vegetative growth of the host plant. The  
11 objective of this work was to verify the capacity of three strains of rhizobacteria, Cs-2, Mc-3  
12 and Cs-12, in reducing the reproduction or controlling the population levels of *M. incognita* and  
13 *M. javanica*, besides verifying their capacity strains to promote plant mass gain in soybean  
14 plants. The experiments were carried out in a greenhouse, at an average temperature of 27 °C.  
15 After 60 days, the number of eggs and galls per gram of root and the mass of fresh and dry  
16 shoots and the mass of fresh and dry roots were evaluated. No biocontrol effects were observed  
17 for both species of *Meloidogyne* spp., a fact confirmed by counting the number of eggs and  
18 galls of infected soybean plants. On the other hand, the Cs-12 rhizobacterium, belonging to the  
19 genus *Bacillus*, was able to guarantee an increase in the dry mass of the root system in healthy  
20 soybean plants, in comparison with the control treatment. Although they did not result in the  
21 biocontrol of root-knot nematodes when applied via the planting furrow, the Cs-12 isolate was  
22 effective in promoting soybean root growth.

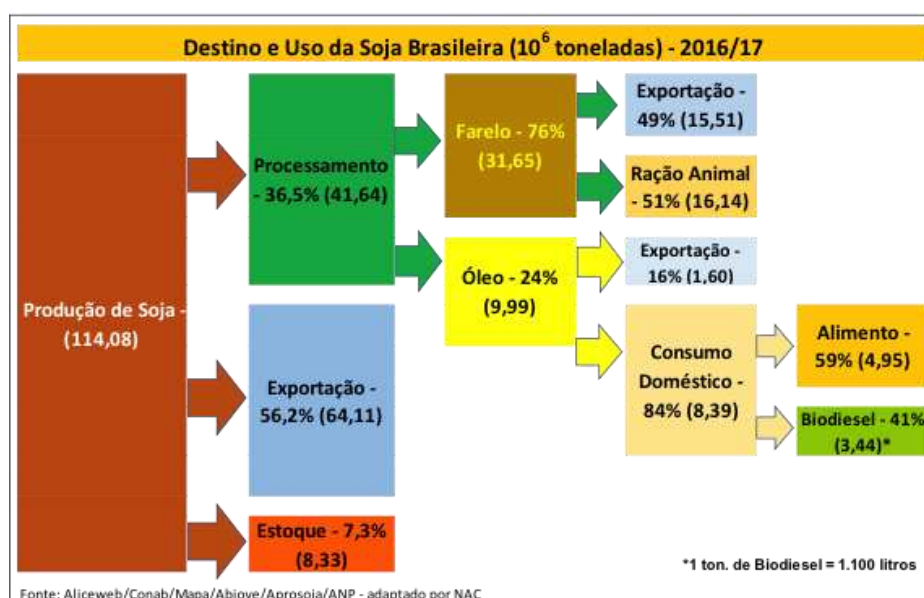
23  
24  
25 **Keywords:** Plant-parasitic nematodes. Biological control. Populations levels. Growth-  
26 promoting rhizobacteria (PGPRs).

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	4
2. MATERIAIS E MÉTODOS .....	8
2.1. Obtenção dos inóculos de <i>Meloidogyne incognita</i> e <i>M. javanica</i> .....	8
2.2. Isolados de rizobactéria selecionados .....	8
2.3. Calibração e construção da curva de crescimento <i>in vitro</i> dos isolados de rizobactérias .....	8
2.4. Calibração das suspensões de rizobactérias a serem aplicadas nos ensaios em casa- de-vegetação.....	9
2.5. Aplicação de rizobactérias no solo para o controle de <i>M. incognita</i> e <i>M. javanica</i> em plantas de soja cultivadas em casa-de-vegetação.....	9
2.6. Promoção de crescimento .....	10
2.7. Colonização rizosférica.....	11
2.8. Análise estatística.....	11
3. RESULTADOS.....	11
3.1. Curva de crescimento bacteriano .....	11
3.2. Avaliação do efeito de biocontrole de nematoide das galhas ( <i>Meloidogyne</i> spp.) por rizobactérias promotoras do crescimento (RPCPs) .....	12
3.2.1. Controle de <i>M. incognita</i> .....	12
3.2.2. Controle de <i>M. javanica</i> .....	15
3.3. Avaliação do efeito de promoção de crescimento por rizobactérias promotoras de crescimento (RPCPs) em plantas de soja.....	18
3.5. Colonização rizosférica.....	21
4. DISCUSSÃO .....	22
5. CONCLUSÕES .....	25
6. REFERÊNCIAS.....	26

## 1. INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* [L.] Merrill) é uma espécie oleaginosa conhecida por ser uma das culturas com mais destacada importância no mundo. Apesar de não ser considerada como alimento básico, esta espécie é conhecida pela sua rica fonte de óleo vegetal e proteínas (BEZERRA *et al.*, 2015). Devido a esta importante característica, a soja possui múltiplos usos, nos quais, além da alimentação humana, seu óleo extraído diretamente do grão pode ser utilizado também na produção de biodiesel, além de que o farelo produzido dos grãos possui importante papel na nutrição animal (Figura 1).



**Figura 1.** O destino e os principais usos da soja no Brasil.

Como qualquer cultura, a soja é uma planta acometida por uma gama de fitopatógenos, dentre eles os fitonematóides. Por vezes, devido ao tamanho diminuto e aos sintomas induzidos por esses vermes cilíndricos se assemelharem à algum tipo de deficiência mineral, os fitonematóides acabam sendo subestimados aos olhares dos agricultores (FREITAS *et al.*, 2012). O modo como estes fitonematóides prejudicam as plantas pode variar com a espécie do fitopatógeno e com as condições edafo-climáticas, mas, de forma geral, eles sugam seu alimento através de seu estilete inserido nas raízes, podem penetrar uma porção do corpo ou invadir de forma completa o tecido vegetal, reduzindo a translocação de água e sais minerais, ou até mesmo, através da injeção de substâncias que podem modular a fisiologia da planta parasitada, induzindo o aparecimento de sintomas característicos como as galhas (FREITAS *et al.*, 2012).

Na cultura da soja, os chamados nematoides das galhas, representados pelas espécies *Meloidogyne incognita* e *M. javanica*, são os fitonematoides de maior relevância (DHINGRA *et al.*, 2009; EMBRAPA, 2011). O sintoma mais característico do parasitismo por nematoides do gênero *Meloidogyne* spp. é o desenvolvimento de galhas no sistema radicular (MATSUO *et al.*, 2015), mas vários outros sintomas podem ser observados. Plantas atacadas também podem apresentar sintomas na parte aérea, sintomas estes reflexos do ataque no sistema radicular. Redução do crescimento, clorose foliar ou necrose internerval (folhas carijós), senescência prematura e abortamento de vagens são alguns dos sintomas de parte aérea que podem estar associados ao ataque dos nematoides das galhas (HENNING *et al.*, 2009; DIAS *et al.*, 2010).

As práticas de manejo desses nematoides mais utilizadas na cultura da soja são a utilização de cultivares resistentes, a rotação com culturas não hospedeiras e/ou antagonistas e o uso de nematicidas, sejam eles químicos ou biológicos (ASMUS *et al.*, 2023). A combinação de todas estas técnicas, além do controle biológico, de forma conjunta, pode ser eficaz e promover resultados satisfatórios no manejo de nematoides das galhas, no que é comumente chamado de manejo integrado.

Alternativamente ou combinadamente ao uso dos nematicidas químicos, produtos à base de microrganismos vêm ganhando cada vez mais destaque no mercado de defensivos (ASMUS *et al.*, 2023). Estes microrganismos são capazes de atuar via efeito nematicida ou nematostático dos metabólitos que produzem, antibiose, indução de resistência e competição além de compensar as perdas causadas pelos nematoides com a promoção do crescimento radicular (FERRAZ; BROWN, 2016).

Por definição, entende-se como controle biológico a ação de microrganismos que diminuem a níveis inferiores as populações de nematoides àqueles na ausência ou não atuação destes organismos sobre os nematoides (STIRLING, 1991). Na indústria de biodenensivos, para ser caracterizado como um bom agente de controle biológico, o microrganismo deve atender a uma série de requisitos, como reduzir ou suprimir a população de nematoides, não deve ser patogênico a plantas e animais, ser produzido em larga escala de forma viável, dentro outras características importantes (KERRY, 1989; FREITAS *et al.*, 1999). Dessa forma, fungos e bactérias são os microrganismos que possuem simultaneamente a maioria dessas características, viabilizando o uso desses agentes no controle de fitonematoides (JATALA, 1986; STIRLING, 1991; FERRAZ; SANTOS, 1995).

Dentro do cenário mundial, o Brasil vem se tornando protagonista no uso desta importante ferramenta que é o controle biológico. Segundo dados da EMBRAPA (2019), mais

de 23 milhões de hectares no país utilizam o manejo de doenças e pragas através desta tecnologia. Além disso, o Brasil segue uma tendência de crescimento maior do que a prevista para o cenário mundial, de mais de 15% ao ano para o país contra 9% do esperado para os outros países (EMBRAPA, 2019). Atualmente existem 37 produtos de controle biológico de fitonematoides registrados no Brasil, sendo 23 à base de bactérias, dentre as quais se encontram: *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus firmus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus subtilis* e *Pasteuria nishizawae* (MONNERAT *et al.*, 2021). Todas estas informações ratificam o pioneirismo do Brasil no investimento do controle biológico como ferramenta eficaz no manejo fitossanitário, principalmente de fitonematoides.

As bactérias são capazes de absorver os nutrientes e alterar a fisiologia de seus hospedeiros, no caso os nematoides, levando-os, na maioria dos casos, à morte (ALVES; FREITAS, 2014). As rizobactérias, objeto de proposição do presente trabalho, são bactérias encontradas na rizosfera e/ou no rizoplano de plantas (KLOEPPER *et al.*, 1990). Alguns isolados de rizobactérias são conhecidos por estimular o crescimento de plantas, denominação esta conhecida como rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (*PGPR - Plant growth-promoting rhizobacteria*) (KLOEPPER *et al.*, 1990). Em se tratando de controle biológico de fitonematoides, as rizobactérias mais estudadas incluem os gêneros *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Desulfovibrio*, *Pseudomonas*, *Serratia* e *Streptomyces* (ALVES; FREITAS, 2014). As rizobactérias se encontram de forma agregada na rizosfera, principalmente nas regiões intercelulares da epiderme, região de ativa exsudação das raízes (BOWEN; ROVIRA, 1976; BOWEN; FOSTER, 1978).

As rizobactérias podem agir em diferentes etapas do ciclo de vida dos nematoides: ovos, eclosão de juvenis, mobilidade e direcionamento dos juvenis à raiz, reconhecimento do hospedeiro pelos nematoides, penetração dos nematoides na raiz, alimentação e reprodução (ALVES; FREITAS, 2014). Segundo KLOEPPER *et al.* (1992), o isolamento de rizobactérias da rizosfera de plantas antagonistas aos nematoides pode aumentar as chances de obtenção de isolados mais eficientes no controle. As rizobactérias podem apresentar diferentes modos de ação contra as populações de nematoides, podendo produzir sideróforos ou compostos tóxicos como antibióticos e enzimas, competir por espaço e/ou nutrientes, e, até mesmo, induzir resistência sistêmica nas plantas. Simultaneamente, as rizobactérias podem também estimular a promoção de crescimento das plantas hospedeiras (PGPR) (OOSTENDORP; SIKORA, 1990; STIRLING, 1991; FREITAS, 2001; FERRAZ *et al.*, 2010).

Dentro do que chamamos de rizobactérias, temos as bactérias endofíticas, conhecidas por atuarem no interior das raízes, mesmo não causando dano algum às plantas hospedeiras (PODESTÁ, 2015). Plantas antagonistas a nematoides possuem, em seu sistema radicular, bactérias endofíticas distintas daquelas encontradas em plantas convencionais (KLOEPPER *et al.*, 1991). Estes autores também demonstraram que há uma maior densidade populacional de *Bacillus* formadores de esporos em plantas de centeio do que em plantas de soja (KLOEPPER *et al.*, 1991).

Há diversos relatos que comprovam a eficiência destes microrganismos no controle biológico de fitonematoides (SIDDIQUI; SHAUKAT, 2003; MUNIF *et al.*, 2013). No presente trabalho, é proposto o uso de três isolados bacterianos endofíticos (Cs-2, Cs-12 e Mc-3) para o controle de *Meloidogyne incognita* e *M. javanica* na cultura da soja, via aplicação direta no sulco de plantio. Estes isolados foram previamente obtidos de raízes das plantas antagonistas *Crotalaria spectabilis* (Cs-2 e Cs-12) e de *Mucuna pruriens* var *utilis* (Mc-3).

Após o isolamento das espécies bacterianas, PODESTÁ (2015) procedeu a seleção massal dos isolados e, cinco destes isolados, que foram nomeados como Cp-1, Cp-5, Cs-2, Cs-12 e Mc-3 foram selecionados por terem apresentado uma redução em mais de 50% do número de galhas de *M. javanica* em tomateiro. Ao verificar o efeito da microbiolização de sementes com rizobactérias (Cp-1, Cp-5, Cs-2, Cs-12 e Mc-3) no controle de *M. javanica* em tomateiros sob condições de casa-de-vegetação, observou que o isolado Mc-3 proporcionou uma redução de 65% no número de ovos em relação à testemunha. Não houveram diferenças das testemunhas para os demais tratamentos e não foi observado efeito sobre o número de galhas em nenhum dos tratamentos.

De acordo com PODESTÁ (2015), os isolados Cs-12 e Mc-3 foram identificados como *Bacillus* spp. e o isolado Cs-2 foi identificado como *Enterobacter* spp. As identificações foram realizadas através do sequenciamento da região 16S do RNA ribossomal. No apêndice A, se encontram as árvores filogenéticas das respectivas bactérias em uso neste trabalho. Os isolados Cs-12 e Mc-3 fazem parte do grupo *Bacillus cereus*.

PODESTÁ (2015) relatou que os isolados Cs-2 e Mc-3, quando aplicados diretamente no solo, proporcionaram redução no número de galhas de *M. javanica* em plantas de tomate de 32 e 38% respectivamente, em relação à testemunha. Por outro lado, o isolado Cs-12 proporcionou um aumento de 58% do número de ovos em relação à testemunha.

O objetivo deste trabalho foi investigar a capacidade, de forma individual, de três cepas de rizobactérias Cs-2, Cs-12 e Mc-3, em controlar os nematoides das galhas (*M. incognita* e *M.*

*javanica*) na cultura da soja, quando aplicadas diretamente no solo. Foi avaliado também a capacidade destas em promover o crescimento de plantas de soja quando infectadas pelos nematoides e quando inoculadas somente com as rizobactérias.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Obtenção dos inóculos de *Meloidogyne incognita* e *M. javanica***

Para a obtenção de ambos os inóculos, sementes de tomateiro cultivar Santa Clara foram semeadas em bandejas com substrato organo-mineral Tropstrato HT Hortaliças<sup>®</sup>, sendo posteriormente transplantadas para vasos de 2 L contendo substrato composto de solo de barranco (horizonte C) e areia lavada de granulometria média, na proporção de 1:1 (V:V). Uma semana após o transplante, calibrou-se uma suspensão de ovos de *M. incognita* e *M. javanica*, ambas de populações puras, e 2.000 ovos foram aplicados no substrato, em duas cavidades de 1 cm de profundidade de lados opostos e distantes 1 cm da planta de tomate nos vasos. Após 60 dias, procedeu-se a extração de ovos das plantas de tomate segundo a metodologia descrita por Hussey e Barker (1973), modificada por Boneti e Ferraz (1981).

### **2.2. Isolados de rizobactérias de plantas antagonistas a nematoides**

Os isolados de rizobactérias utilizados neste trabalho, Mc-3 e Cs-12 (obtidas de *Crotalaria spectabilis*), pertencentes ao gênero *Bacillus* spp. e Cs-2 (obtida de *Mucuna pruriens* var *utilis*), pertencente ao gênero *Enterobacter* spp., fazem parte da coleção do Laboratório de Controle Biológico de Fitonematoides (BIONEMA), vinculado ao departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

### **2.3. Calibração e construção da curva de crescimento *in vitro* dos isolados de rizobactérias**

Para a construção da curva de crescimento bacteriano para os três isolados utilizados neste trabalho, foram preparados 20 mL de meio LB (Luria Bertani) para cada bactéria em frascos do tipo Erlenmeyers de 50 mL. Foram adicionados 2 µL de cada suspensão bacteriana em cada um dos três Erlenmeyers. As amostras contendo meio LB mais 2 µL de suspensão bacteriana foram levadas à uma câmara incubadora com agitação orbital, onde foram incubadas, sob uma agitação de 180 rpm e temperatura de 28°C. As amostras foram retiradas em intervalos regulares de 12 h para leitura em espectrofotômetro, calibrando a suspensão para OD (densidade óptica) de 600 nm. De posse dos valores das OD's com seus respectivos intervalos, construiu-se a curva de crescimento para cada um dos três isolados de rizobactérias.

#### **2.4. Calibração das suspensões de rizobactérias a serem aplicadas nos ensaios em casas-de-vegetação**

Em Erlenmeyer de 50 mL, adicionou-se 20 mL de meio de cultura líquido LB (2%) e, após esterilização por 20 min a 120 °C, uma alíquota de 2 µL contendo células bacterianas dos isolados Cs-2, Cs-12 ou Mc-3 foi adicionado ao meio de cultura. Em seguida, os frascos Erlenmeyer foram incubados sob agitação a 180 rpm, a 28 °C por 24 h. Após esse período, a suspensão bacteriana foi depositada em tubos tipo Eppendorf de 2 mL de capacidade e centrifugada por 10 min, a 6.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o pelete resultante foi ressuspenso em solução salina (NaCl 0,85%) e, com o auxílio de um espectrofotômetro, a suspensão foi calibrada para OD<sub>600</sub> igual a 0,5. A fim de se estimar o número de células viáveis presentes nesta concentração, procedeu-se a técnica de microgota para contagem de células bacterianas viáveis. Através da contagem das colônias individualizadas, chegou-se a 10<sup>8</sup> UFC/mL em OD<sub>600</sub> igual a 0,5.

#### **2.5. Aplicação de rizobactérias no solo para o controle de *Meloidogyne incognita* e *M. javanica* em plantas de soja cultivadas em casa-de-vegetação**

Para esse ensaio, vasos de 2 L de capacidade foram preenchidos com substrato composto de solo de barranco (horizonte C - do tipo latossolo vermelho-amarelo) e areia lavada de granulometria média, na proporção de 1:1 (V:V) previamente tratado termicamente, como descrito em Ghini (2004) e Alfenas e Mafia (2016). Posteriormente, cada vaso recebeu duas

sementes de soja cultivar M 6410 IPRO, que previamente passaram pelo processo de desinfestação superficial em câmara de gás, que consiste em manter as sementes por 4 h em recipiente fechado na presença de HCl 37% e NaClO (3:100) (V:V). Após a formação das folhas cotiledonares, seguiu-se o desbaste deixando apenas uma planta por vaso. Passados 15 dias após o semeio, 20 mL de suspensão ( $OD_{600} = 0,5$ ) de cada isolado bacteriano foi aplicado diretamente no solo em dois orifícios de 1 cm de profundidade realizados de lados opostos da planta, de forma equidistante e a 1 cm de distância da planta. Como testemunha, foram utilizadas plantas que não receberam suspensão bacteriana. A inoculação dos nematoides foi realizada 3 dias após a aplicação das rizobactérias. Para tanto, foram inoculados 2.000 ovos de *M. incognita* ou 2.000 ovos de *M. javanica* por vaso, sendo aplicados de forma semelhante às rizobactérias, em dois buracos de 1 cm de profundidade ao redor da planta, equidistantes e a 1 cm de distância da planta. Os ensaios foram realizados separadamente por espécie de fitonematoide. O experimento foi conduzido em casa de vegetação, por um período de 60 dias, com temperatura em torno de 27 °C e em delineamento inteiramente casualizado, com 3 tratamentos (Cs-2, Mc-3 e Cs-12) mais a testemunha, todos com 7 repetições. Foram instalados dois experimentos, separados temporalmente por um período de 15 dias, durante o período de primavera/verão. Após o ciclo de 60 dias, parte aérea e sistema radicular foram separados e a parte aérea das plantas infectadas foram mantidas em estufa a 50 °C até o completo secamento das mesmas. Posteriormente, quantificou-se a massa da parte aérea seca (MPAS) das plantas de soja infectadas por ambas as espécies de nematoides das galhas.

## 2.6. Promoção de crescimento

Para verificar se as rizobactérias Cs-2, Mc-3 e Cs-12 seriam capazes de promover o crescimento de plantas de soja, o seguinte ensaio foi preparado. Sementes de soja foram semeadas em vasos de 2 L e após a germinação um desbaste foi realizado de modo a deixar apenas uma plântula por vaso. Quinze dias após o semeio, 20 mL de suspensão ( $OD_{600} = 0,5$ ) de cada isolado bacteriano foram aplicados diretamente no substrato em dois orifícios de 1 cm de profundidade realizados ao redor da planta, de forma equidistante e a 1 cm de distância da planta. Como testemunha, foram utilizadas plantas que não receberam suspensão bacteriana. Passados 60 dias, raiz e parte aérea foram separadas e as massas da parte aérea fresca (MPAF) e de massa de raiz fresca (MRF) foram determinadas. As amostras foram mantidas em estufa a 50 °C até o completo secamento das mesmas. Posteriormente, obteve-se a massa de parte aérea seca (MPAS) e massa de raiz seca (MRS). O experimento foi conduzido em casa de vegetação,

por um período de 60 dias, com temperatura em torno de 27 °C e em delineamento inteiramente casualizado, com 3 tratamentos (Cs-2, Mc-3 e Cs-12) mais a testemunha, todos com 7 repetições. Foram instalados dois experimentos, separados temporalmente por um período de 15 dias, durante o período de primavera/verão.

## **2.7. Colonização rizosférica**

Para avaliar a capacidade dos isolados de rizobactérias de colonizar o sistema radicular da planta, o método desenvolvido por Bringel (1997) e por Miranda (1997), e adaptado por Romeiro *et al.* (2000) e Silva *et al.* (2003) permite a visualização do crescimento bacteriano ao redor das raízes, e foi realizado da seguinte forma: tubos de ensaio contendo o meio ágar-água (ágar 0,8%) estéril receberam sementes de soja previamente esterilizadas superficialmente com álcool 50% (2 minutos), seguido de NaClO 2% (também 2 minutos) e lavagens sucessivas com água estéril. As sementes foram emergidas, por uma noite, na suspensão rizobacteriana, com OD<sub>600</sub> igual a 0,5 para todos os isolados. As sementes microbiolizadas foram transferidas para os tubos de ensaio, uma por tubo, incubando-os na vertical, em ambiente de laboratório, sob luz natural. As sementes germinaram e penetraram no meio de cultura. Zonas de aspecto leitoso ao redor das raízes indicaram a colonização da raiz e a competência rizosférica dos isolados (ROMEIRO, 2007). O experimento foi conduzido em ambiente de laboratório, com 3 tratamentos (Cs-2, Mc-3 e Cs-12) mais a testemunha, todos com 7 repetições.

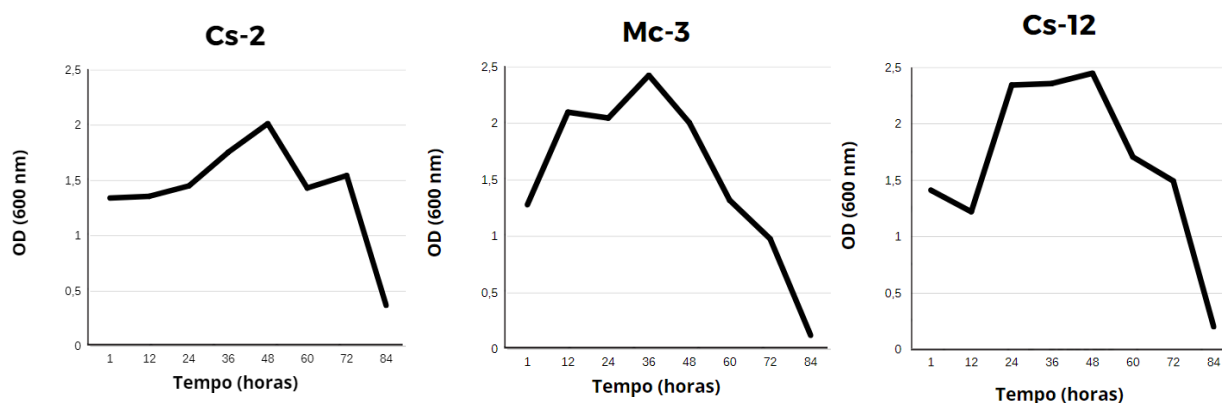
## **2.8. Análise estatística**

De posse dos dados, foram calculadas as médias e desvios-padrão dos dados e submetidos à análise de variância (ANOVA). As médias foram comparadas pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico R (R core team, 2021), com todas as pressuposições da ANOVA satisfatoriamente atendidas.

# **3. RESULTADOS**

## **3.1. Curva de crescimento bacteriano**

De acordo com a metodologia apresentada, obteve-se modelos de curvas de crescimento para cada uma das três rizobactérias em estudo (Figura 4). É possível observar a variação da taxa de crescimento microbiano típico de uma bactéria ao longo do tempo. Esta taxa de crescimento é dividida em 4 fases: fase *lag*, fase *log* ou exponencial, fase estacionária e fase de declínio ou morte celular. A fase estacionária foi a menos pronunciada entre as três bactérias, sendo que na rizobactéria Cs-2 houve um pico populacional em OD<sub>600</sub> igual a 2,0 e em Mc-3 e Cs-12 em aproximadamente OD<sub>600</sub> igual a 2,5, aproximadamente após 48 horas de registrado o início da curva de crescimento. Após este tempo, entrou-se na fase de declínio ou morte celular, em que o número de células inviáveis excede o número de células novas. Após 84 h, tem-se, para as três rizobactérias, os seus níveis populacionais de células viáveis mais baixos.

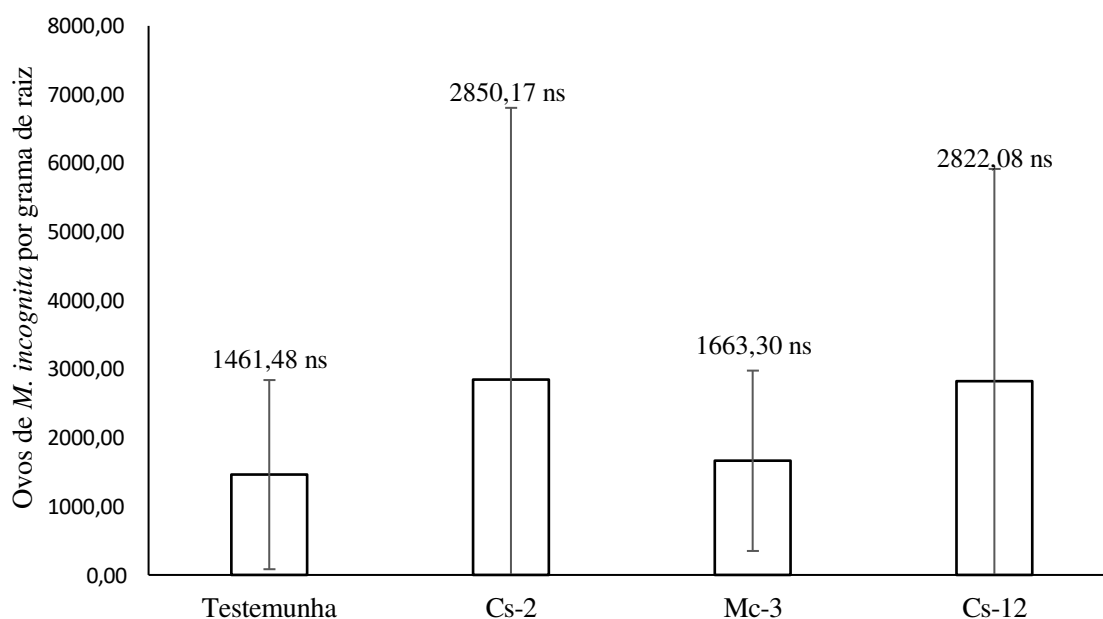


**Figura 2.** Curvas de crescimento bacteriano para as rizobactérias Cs-2, Mc-3 e Cs-12, crescidas em meio de cultura LB (Luria Bertani).

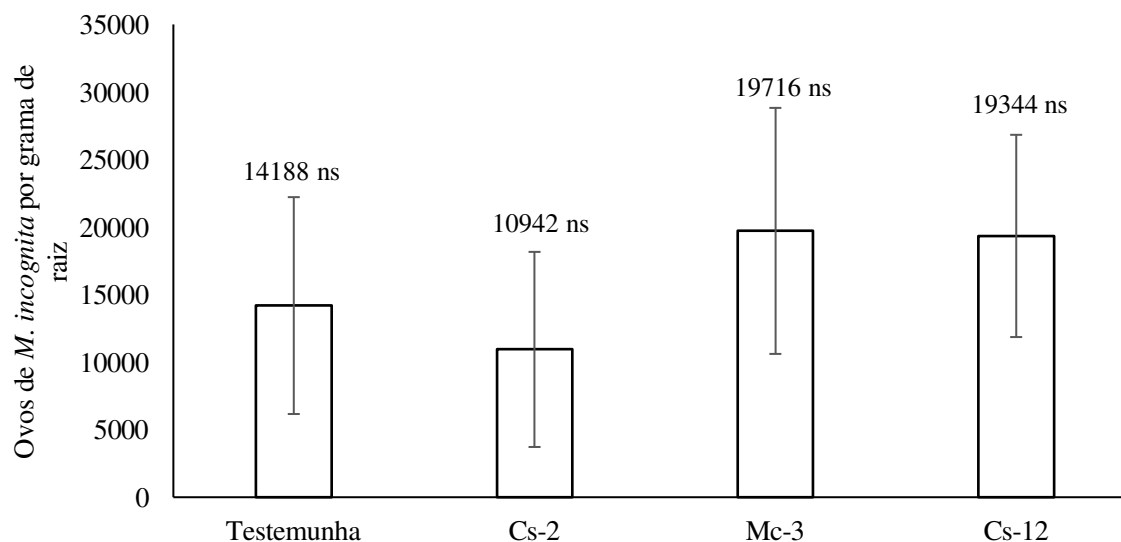
### 3.2. Avaliação do efeito de biocontrole de nematoide das galhas (*Meloidogyne* spp.) por rizobactérias de plantas antagonistas

#### 3.2.1. Controle de *M. incognita*

Ao se avaliar o possível efeito de biocontrole exercido pelas rizobactérias em estudo, no experimento 1, as rizobactérias testadas Cs-2, Mc-3 e Cs-12 não afetaram a capacidade reprodutiva de *M. incognita* em relação ao tratamento testemunha, segundo o teste Duncan ao nível de 5% de probabilidade (Figura 3). O mesmo efeito foi observado no experimento 2, não havendo diferença significativa entre quaisquer bactérias e o tratamento testemunha no sentido de diminuir as populações de *M. incognita* através da redução do número de ovos (Figura 4).



**Figura 3.** Número de ovos de *M. incognita* por grama de raiz de soja tratada com os isolados de rizobactérias dos gêneros *Enterobacter* spp. (Cs-2) ou *Bacillus* spp. (Mc-3 e Cs-12), para o experimento 1. Colunas seguidas pela mesma letra não são diferentes uma da outra pelo teste Duncan a 5% de probabilidade. As barras representam o desvio padrão (n =7).

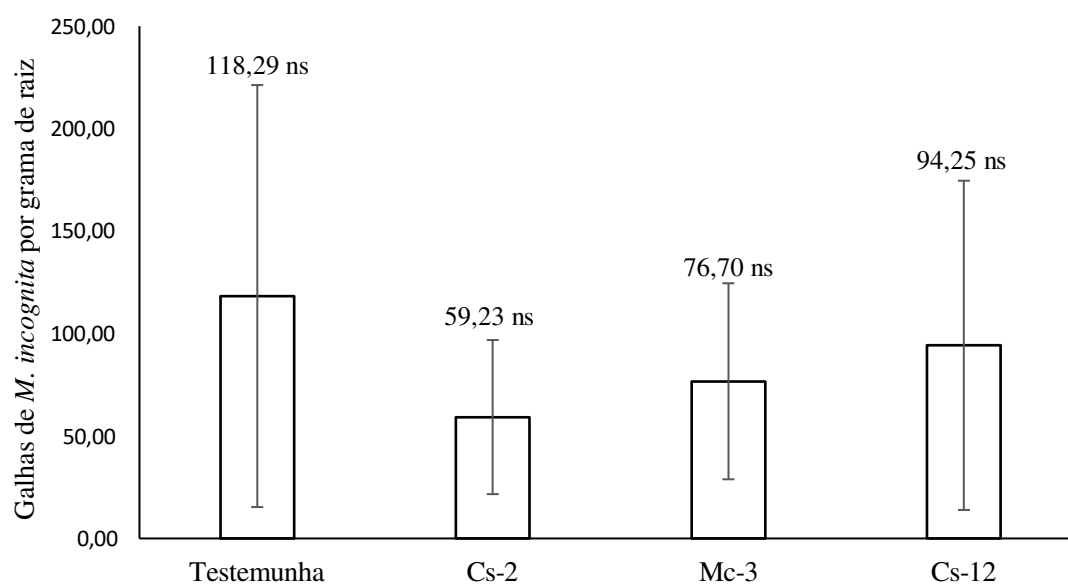


**Figura 4.** Número de ovos de *M. incognita* por grama de raiz de soja tratada com os isolados de rizobactérias dos gêneros *Enterobacter* spp. (Cs-2) ou *Bacillus* spp. (Mc-3 e Cs-12), para o experimento 2. Colunas seguidas pela mesma letra não são diferentes uma da outra pelo teste Duncan a 5% de probabilidade. As barras representam o desvio padrão (n =7).

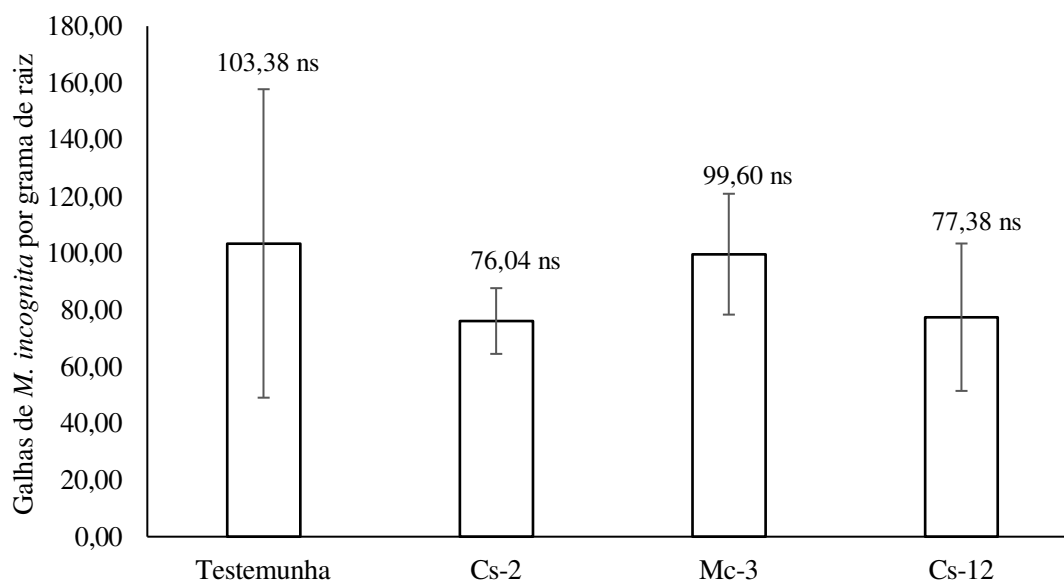
Com relação ao número de galhas observadas em plantas de soja infectadas por *M. incognita* e tratadas com as rizobactérias no experimento 1, as rizobactérias testadas Cs-2, Mc-3 e Cs-12 não afetaram a capacidade de formação de galhas de *M. incognita* em relação

ao tratamento testemunha, segundo o teste Duncan ao nível de 5% de probabilidade (Figura 5). O mesmo efeito foi observado no experimento 2, não havendo diferença significativa entre quaisquer bactérias e o tratamento testemunha no sentido de diminuir o número de galhas de *M. incognita* (Figura 6).

Para o experimento 1, ao se avaliar a massa de parte aérea seca (MPAS) de plantas de soja infectadas por *M. incognita*, não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos com os isolados Cs-2, Mc-3 ou Cs-12 com o tratamento testemunha, segundo o teste Duncan a 5% de probabilidade. Para o experimento 2 o mesmo efeito foi observado, não havendo diferença significativa entre os tratamentos com os isolados Cs-2, Mc-3 ou Cs-12 com o tratamento testemunha.



**Figura 5.** Número de galhas de *M. incognita* por grama de raiz de soja tratada com os isolados de rizobactérias dos gêneros *Enterobacter* spp. (Cs-2) ou *Bacillus* spp. (Mc-3 e Cs-12), para o experimento 1. Colunas seguidas pela mesma letra não são diferentes uma da outra pelo teste Duncan a 5% de probabilidade. As barras representam o desvio padrão (n =7).

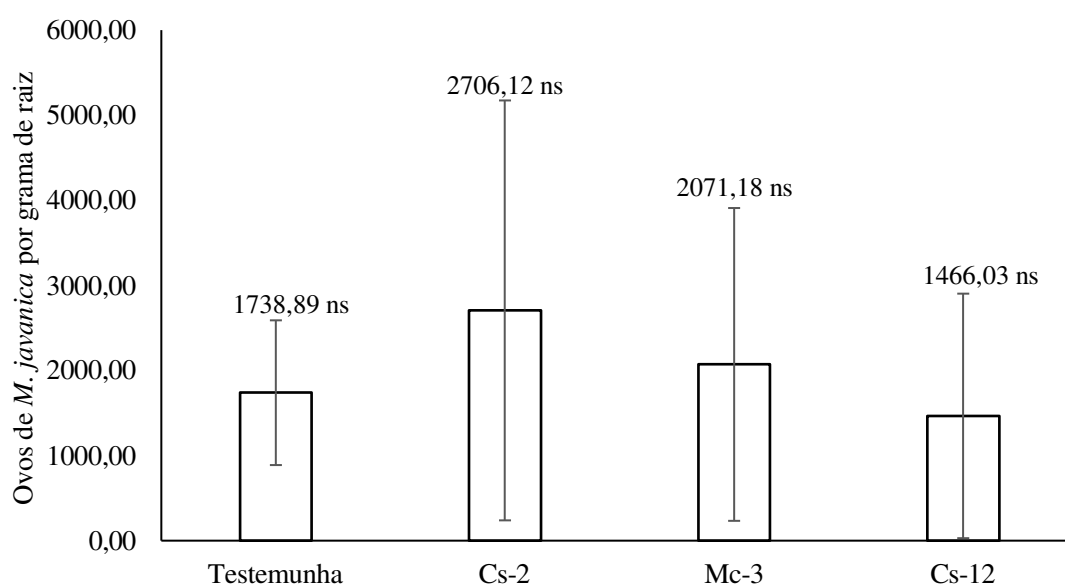


**Figura 6.** Número de galhas de *M. incognita* por grama de raiz de soja tratada com os isolados de rizobactérias dos gêneros *Enterobacter* spp. (Cs-2) ou *Bacillus* spp. (Mc-3 e Cs-12), para o experimento 2. Colunas seguidas pela mesma letra não são diferentes uma da outra pelo teste Duncan a 5% de probabilidade. As barras representam o desvio padrão (n =7).

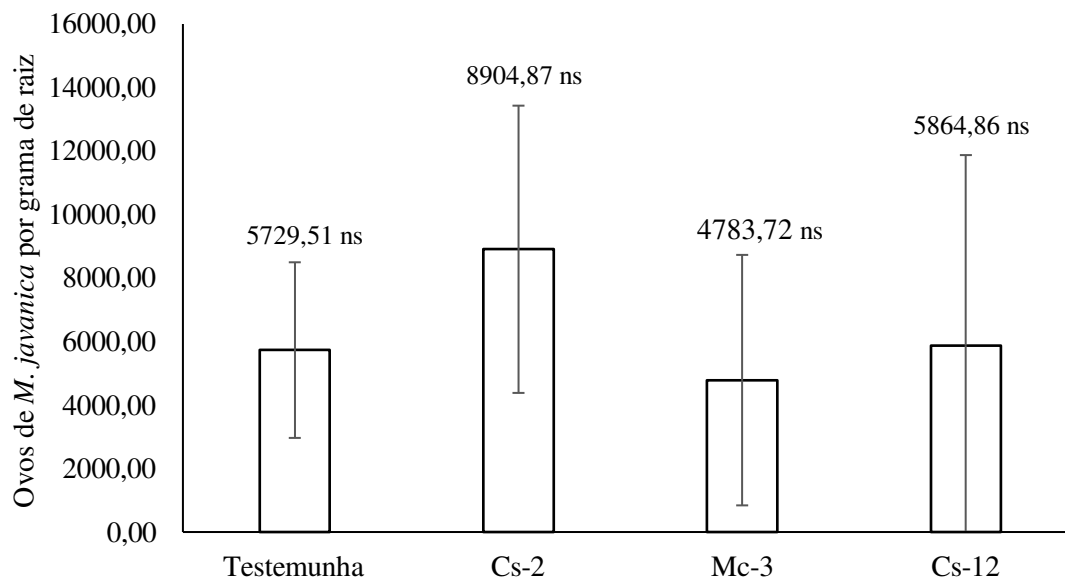
### 3.2.2. Controle de *M. javanica*

Para o experimento 1, plantas de soja infectadas com *M. javanica* e tratadas com as rizobactérias Cs-2, Mc-3 ou Cs-12, não apresentaram diferenças significativas no número de ovos entre os tratamentos com as rizobactérias e o tratamento testemunha (Figura 7). O mesmo efeito foi observado no experimento 2, não havendo redução significativa no número de ovos em plantas tratadas com Cs-2, Mc-3 ou Cs-12 em relação à testemunha (Figura 8), segundo o teste Duncan ao nível de 5% de probabilidade.

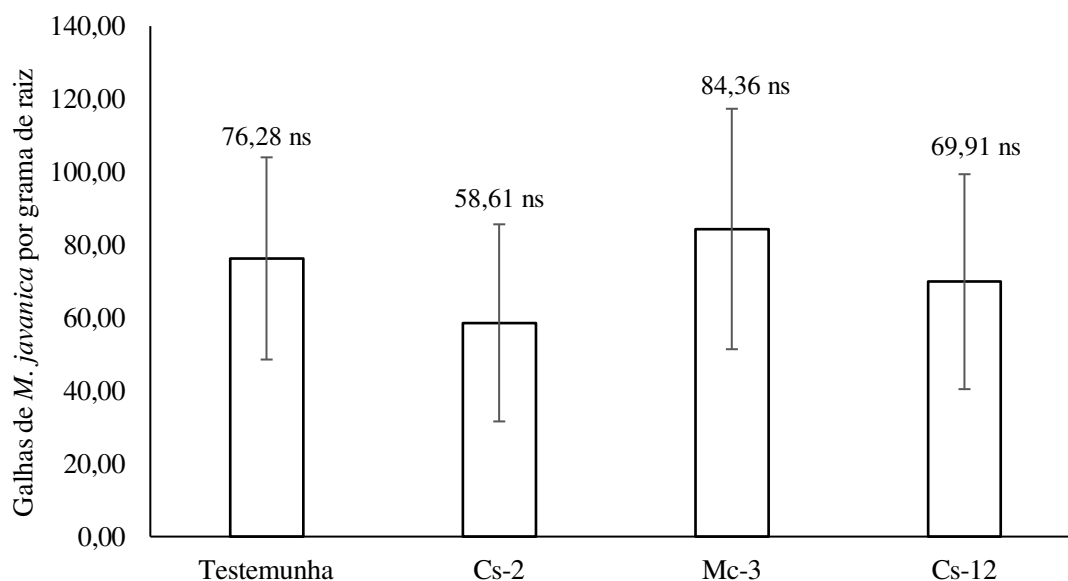
Para a avaliação do número de galhas provocadas por *M. javanica* em plantas de soja tratadas com as rizobactérias Cs-2, Mc-3 ou Cs-12, no experimento 1 não foram observadas diminuições significativas entre os tratamentos com as rizobactérias em relação à testemunha (Figura 9), segundo o teste Duncan ao nível de 5% de probabilidade. O mesmo efeito foi observado no experimento 2, não havendo diferenças estatísticas entre os tratamentos com Cs-2, Mc-3 ou Cs-12 em relação à testemunha (Figura 10).



**Figura 7.** Número de ovos de *M. javanica* por grama de raiz de soja tratada com os isolados de rizobactérias dos gêneros *Enterobacter* spp. (Cs-2) ou *Bacillus* spp. (Mc-3 e Cs-12), para o experimento 1. Colunas seguidas pela mesma letra não são diferentes uma da outra pelo teste Duncan a 5% de probabilidade. As barras representam o desvio padrão (n =7).

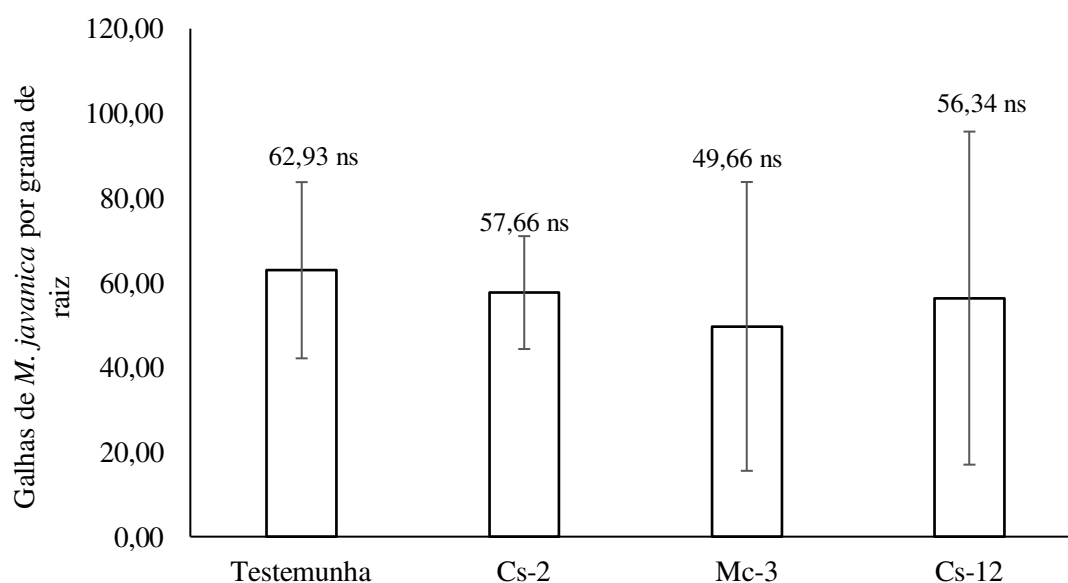


**Figura 8.** Número de ovos de *M. javanica* por grama de raiz de soja tratada com os isolados de rizobactérias dos gêneros *Enterobacter* spp. (Cs-2) ou *Bacillus* spp. (Mc-3 e Cs-12), para o experimento 2. Colunas seguidas pela mesma letra não são diferentes uma da outra pelo teste Duncan a 5% de probabilidade. As barras representam o desvio padrão (n =7).



**Figura 9.** Número de galhas de *M. javanica* por grama de raiz de soja tratada com os isolados de rizobactérias dos gêneros *Enterobacter* spp. (Cs-2) ou *Bacillus* spp. (Mc-3 e Cs-12), para o experimento 1. Colunas seguidas pela mesma letra não são diferentes uma da outra pelo teste Duncan a 5% de probabilidade. As barras representam o desvio padrão (n =7).

Para a avaliação de massa seca da parte aérea (MPAS) de plantas de soja infectadas por *M. javanica*, não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos com os isolados Cs-2, Mc-3 e Cs-12 com o tratamento testemunha, segundo o teste de Duncan a 5% de probabilidade, para o experimento 1. Também não houveram diferenças significativas entre os tratamentos com os isolados Cs-2, Mc-3 e Cs-12 com o tratamento testemunha para o experimento 2.



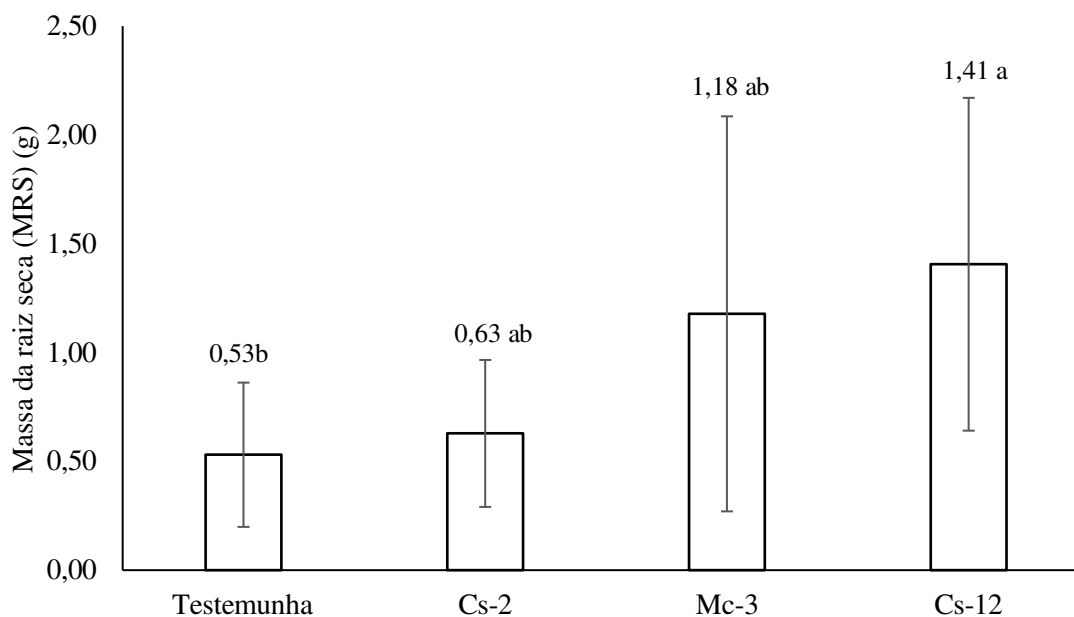
**Figura 10.** Número de galhas de *M. javanica* por grama de raiz de soja tratada com os isolados de rizobactérias dos gêneros *Enterobacter* spp. (Cs-2) ou *Bacillus* spp. (Mc-3 e Cs-12), para o experimento 2. Colunas seguidas pela mesma letra não são diferentes uma da outra pelo teste Duncan a 5% de probabilidade. As barras representam o desvio padrão (n =7).

### 3.3. Avaliação do efeito de promoção de crescimento por rizobactérias promotoras de crescimento (RPCPs) em plantas de soja

Nos ensaios nos quais plantas de soja foram tratadas apenas com as rizobactérias Cs-2, Mc-3 e Cs-12, no experimento 1, para as variáveis analisadas massa da parte aérea fresca (MPAF), massa da parte aérea seca (MPAS) e massa da raiz fresca (MRF), não houve diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos com as bactérias em comparação com o tratamento testemunha (Tabela 1), segundo o teste Duncan a 5% de probabilidade. Já para a variável massa da raiz seca (MRS), a bactéria Cs-12 proporcionou um aumento de aproximadamente 166% em relação a testemunha (Figura 11).

**Tabela 1.** Efeitos de diferentes isolados de rizobactérias dos gêneros *Enterobacter* spp. (Cs-2) e *Bacillus* spp. (Mc-3 e Cs-12) sobre a massa da parte aérea fresca de soja (MPAF), massa da parte aérea seca (MPAS) e massa da raiz fresca (MRF) em gramas, aos 60 dias após a inoculação dos isolados bacterianos, para o experimento 1. Colunas com a mesma letra não são estatisticamente diferentes pelo teste Duncan ( $p < 0,05$ ). As barras representam o desvio padrão (n = 7).

	MPAF	MPAS	MRF
	g		
Testemunha	3,35 ns	0,98 ns	5,77 ns
Cs-2	4,01 ns	1,03 ns	5,64 ns
Mc-3	4,94 ns	1,35 ns	8,07 ns
Cs-12	5,22 ns	1,43 ns	8,10 ns

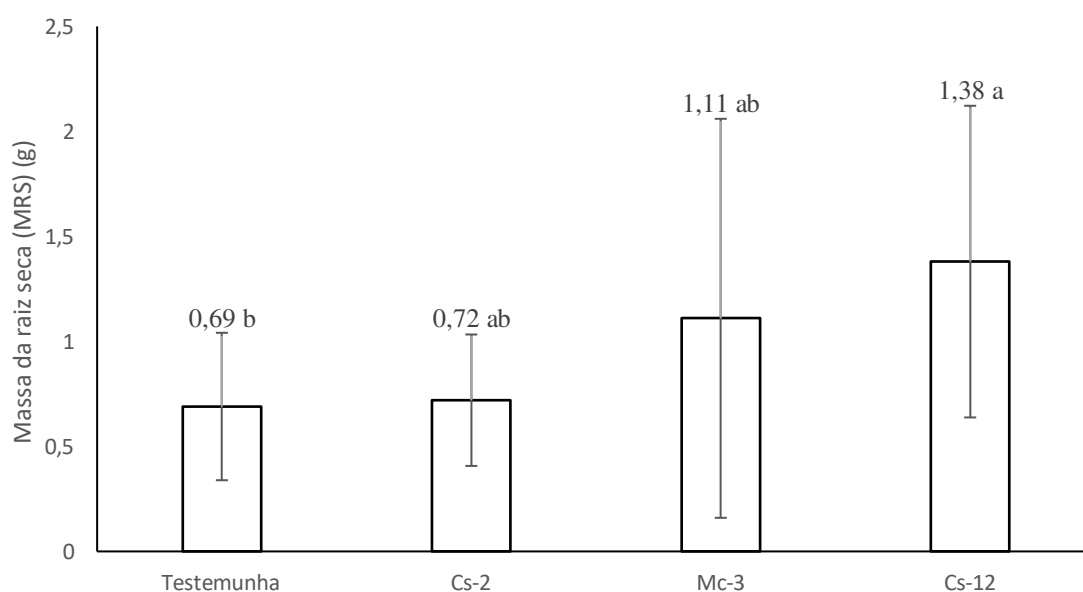


**Figura 11.** Efeitos de diferentes isolados de rizobactérias dos gêneros *Enterobacter* spp. (Cs-2) e *Bacillus* spp. (Mc-3 e Cs-12) sobre a massa da raiz seca de soja (MRS), em gramas, aos 60 dias após a inoculação dos isolados bacterianos, para o experimento 1. Colunas com a mesma letra não são estatisticamente diferentes pelo teste Duncan ( $p < 0,05$ ). As barras representam o desvio padrão ( $n = 7$ ).

Para o experimento 2, foram observados os mesmos padrões nos resultados do experimento 1. As variáveis MPAF, MPAS e MRF não foram significativamente diferentes em relação ao tratamento controle (Tabela 2), segundo o teste Duncan a 5% de probabilidade. A variável MRS apresentou um aumento de aproximadamente 99% em relação a testemunha (Figura 12).

**Tabela 2.** Efeitos de diferentes isolados de rizobactérias dos gêneros *Enterobacter* spp. (Cs-2) e *Bacillus* spp. (Mc-3 e Cs-12) sobre a massa da parte aérea fresca de soja (MPAF), massa da parte aérea seca (MPAS) e massa da raiz fresca (MRF) em gramas, aos 60 dias após a inoculação dos isolados bacterianos. Colunas com a mesma letra não são estatisticamente diferentes pelo teste Duncan ( $p < 0,05$ ). As barras representam o desvio padrão ( $n = 7$ ).

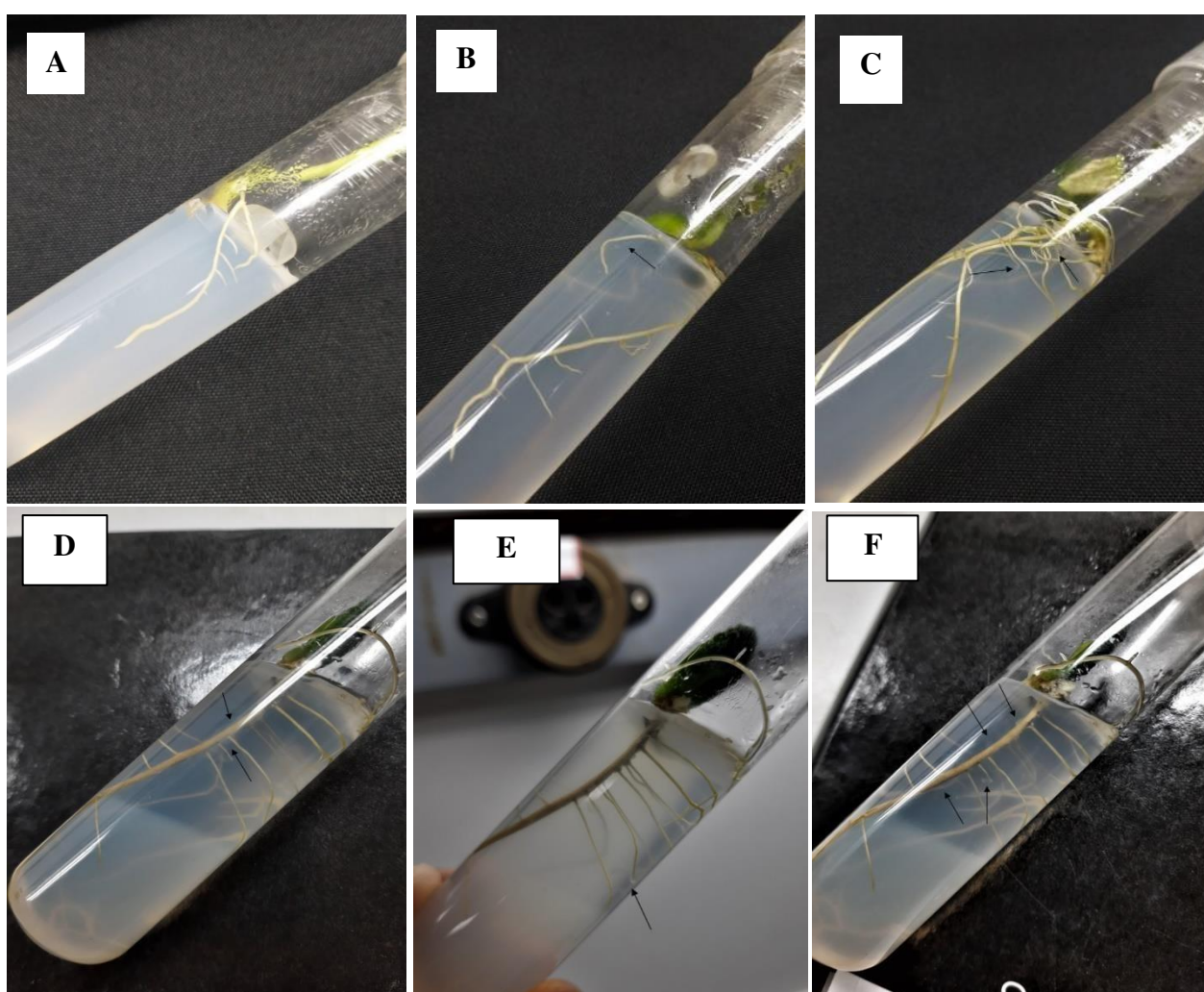
	MPAF	MPAS	MRF
	g		
Testemunha	4,21 ns	1,04 ns	3,80 ns
Cs-2	3,72 ns	1,26 ns	3,57 ns
Mc-3	4,03 ns	1,78 ns	3,73 ns
Cs-12	3,07 ns	1,13 ns	3,67 ns



**Figura 12.** Efeitos de diferentes isolados de rizobactérias dos gêneros *Enterobacter* spp. (Cs-2) e *Bacillus* spp. (Mc-3 e Cs-12) sobre a massa da raiz seca de soja (MRS), em gramas, aos 60 dias após a inoculação dos isolados bacterianos, para o experimento 2. Colunas com a mesma letra não são estatisticamente diferentes pelo teste Duncan ( $p < 0,05$ ). As barras representam o desvio padrão ( $n = 7$ ).

### 3.4. Colonização rizosférica

Nesse teste, nenhuma das três rizobactérias apresentou rizocompetência nas raízes de soja. A avaliação foi realizada segundo ROMEIRO (2007), confrontando-se os tubos de ensaio contra luz natural para verificar a presença ou não de crescimento bacteriano radicular. De acordo com a visualização dos tubos de ensaio, a rizobactéria Cs-12 apresentou uma maior capacidade de colonização do sistema radicular em comparação com Cs-2 e Mc-3 (Figura 15).



**Figura 13.** Colonização rizosférica em raízes de plântulas de soja (A: controle; B: Cs-2; C: Mc-3; D, E e F: Cs-12). As setas indicam a presença da formação de crescimento bacteriano ao redor das raízes.

#### 4. DISCUSSÃO

Como observado, as rizobactérias em estudo não foram capazes de suprimir as populações de *M. incognita* e *M. javanica* em plantas de soja quando aplicadas diretamente via irrigação do solo. PODESTÁ (2015) demonstrou que as cepas Cs-2 e Mc-3 se mostraram promissoras para a utilização via irrigação do solo quando aplicadas na cultura do tomateiro. O isolado Cs-2 proporcionou uma redução de 32% do número de galhas em relação à testemunha, enquanto que o isolado Mc-3 proporcionou 38% de redução do número de galhas em relação à testemunha. No entanto, em relação ao número de ovos, no primeiro experimento realizado no inverno, não foram observadas diferenças entre os tratamentos e no segundo experimento, realizado durante a primavera, o isolado Cs-12 proporcionou um aumento de 58% no número de ovos em relação à testemunha.

Dentre as possíveis causas para o não controle exercido pelas rizobactérias em estudo contra os nematoides das galhas, pode-se considerar a concentração de inóculo utilizada. Neste trabalho, foi utilizada a  $OD_{600} = 0,5$ , que corresponde a  $10^8$  UFC/mL. Embora as plantas não tenham expressados sintomas de fitotoxidez visíveis, esta concentração pode ter causado algum tipo de desordem em menor grau, ocasionando assim efeito deletério às mesmas. A dosagem da suspensão de rizobactérias aplicadas no solo também pode ter contribuído para este baixo desempenho. Foram aplicados 20 mL de inóculo por planta, a mesma dosagem utilizada por PODESTÁ (2015).

Outra hipótese é de que estes isolados de rizobactérias foram inicialmente selecionados em plantas de tomate, sendo que posteriormente, ao serem aplicados em plantas de soja, seus desempenhos sobre os nematoides não foram os mesmos observados anteriormente, muito possivelmente por uma pior interação desses com a soja do que com o tomate. A competência rizosférica diminuída pode ser um fator a ser considerado. Dessa forma, são vários os fatores que determinam o sucesso de um agente de controle biológico de fitonematoídeos. No caso das rizobactérias, RACKE; SIKORA (1992) e MEDEIROS *et al.* (2009) já relataram inconsistências do controle exercidos por estes microrganismos.

Segundo GOWDA *et al.* (2022), os mecanismos exibidos por rizobactérias na supressão de populações de nematoides são: antagonismo direto pela produção de enzimas, toxinas e outros metabólitos, e efeitos indiretos, através da modulação do comportamento do nematoídeo pela produção de compostos repelentes que são capazes de prejudicar o reconhecimento do hospedeiro. No controle do nematoídeo das galhas, ENGELBRECHT *et al.* (2022)

demonstraram que filtrados de *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. subtilis* e *B. thuringiensis* causaram aproximadamente de 85 a 90% a imobilidade de J2 de nematoides do gênero *Meloidogyne* spp. Em estudos com as PGPR's *B. firmus*, *B. aryabhattai*, *Paenibacillus barcinonensis*, *Paenibacillus alvei* e *B. cereus*, VILJOEN *et al.* (2019) relataram níveis de controle de 86.0, 85.2, 84.6, 81.5 e 82.1% do número de galhas em plantas de tomate infectadas por *M. incognita*. O controle de ovos exercido pelas rizobactérias constitui-se de uma grande vantagem para o produtor, haja vista que estes ficam protegidos por uma matriz gelatinosa da massa de ovos, e, portanto, podem sobreviver por longos períodos em solos agrícolas (DIAS *et al.* 2010).

Habita no solo uma grande variedade de microrganismos que é modulada pelas condições edafo-climáticas e pelo tipo de vegetação presente. Os colonizadores dessas raízes vêm dessa microbiota do solo, mas são recrutados pelas raízes. Os gradientes de fontes de carbono, oxigênio, pH e nutrientes gerados pelas raízes começam a fazer a seleção dos colonizadores. O genótipo da planta influencia muito o microbioma nessa fase. Na superfície das raízes, o refinamento da comunidade é mais pronunciado e o genótipo da planta tem uma influência maior. A formação de biofilme ou mecanismos de adesão específicos podem apoiar esta etapa de enriquecimento. No interior das raízes, que pode ser chamada de endorizosfera, é habitada por uma comunidade menos complexa. Aí predominam as proteobactérias, conhecidas como bactérias de crescimento rápido e com potencial para alta atividade metabólica.

Características bacterianas específicas são necessárias para entrada e estabelecimento neste compartimento e o genótipo da planta hospedeira tem maior influência na estrutura microbiana. Devido a essas pressões de seleção ao longo de milhões de anos, é provável que comunidades microbianas altamente especializadas e taxonomicamente distintas com atividades muito altas ocorram nas raízes (REINHOLD-HUREK *et al.* 2015). É possível que a seleção de isolados bacterianos obtidos de raízes de plantas antagonistas, se selecionados utilizando-se mudas de soja, seja uma forma de direcionar o desenvolvimento de um produto de controle biológico com muito mais chance de sucesso no emprego na cultura da soja no campo.

FABRY (2002) observou, ao selecionar massalmente rizobactérias provenientes de raízes de *Mucuna aterrima*, *Crotalaria juncea*, *Tagetes erecta* e *Lycopersicon esculentum*, que dois isolados obtidos de solo que não foram tratados com homogeneizados de raízes de *T. erecta* e *L. esculentum* proporcionaram efeito contrário ao biocontrole, pois promoveram o aumento do número de ovos de *M. javanica* em plantas de tomate. Foram constatados aumentos de 134,3% e 117,78% no número de ovos. Com estes resultados, a autora demonstrou que nem

toda espécie de rizobactéria de planta antagonista é capaz de oferecer uma efetiva proteção contra o nematoide das galhas.

As PGPR's são capazes de colonizar o sistema radicular das plantas hospedeiras sem causar qualquer tipo de malefício. Estas rizobactérias possuem a capacidade de reconhecer sinais químicos (exsudatos) das raízes, produção de biofilme, atividades antioxidantes e a motilidade da célula bacteriana (SANTOYO *et al.* 2021). Al-Ali *et al.* (2018), ao investigar a formação de biofilme bacteriano pelas bactérias *B. velezensis* e *B. amyloliquefaciens* no sistema radicular de plantas de tomate, chegaram à conclusão de que a colonização da rizosfera por estas bactérias depende da produção de surfactina pela mesma, da composição do exsudato radicular da planta hospedeira e, principalmente, um fator determinante para a boa colonização é a capacidade da estirpe em formar biofilme.

Em um estudo comparativo para demonstrar a capacidade de colonização de raízes pelas bactérias *Bacillus subtilis* e *Enterobacter hormaechei*, pertencentes aos mesmos gêneros das rizobactérias do presente trabalho, WANG *et al.* (2022) relataram que *E. hormaechei* possui vantagem no estágio inicial de crescimento, enquanto que *B. subtilis* pode crescer melhor no período posterior. No que diz respeito à composição das substâncias poliméricas extracelulares (EPS), *B. subtilis* continham mais ácido fúlvico, carboidratos e ácido húmico do que *E. hormaechei*.

*Bacillus* spp. solubilizador de fosfato é capaz de estimular o crescimento da planta por meio da nutrição de fósforo (P), aumentando a absorção, além de P, de nitrogênio (N), potássio (K) e ferro (Fe) (SIVASAKTI *et al.* 2014). *Bacillus subtilis* é capaz de fixar nitrogênio atmosférico, além de promover a nodulação por outras bactérias, aperfeiçoando a colonização de rizobactérias no sistema radicular (ELKOCA *et al.* 2007). *B. subtilis* também é capaz de promover o crescimento vegetal através da produção dos compostos orgânicos voláteis 3-hidroxi-2-butanona (acetoína) e 2,3-butanodiol, que altera a homeostase da citocinina e do etileno (BLAKE *et al.* 2020).

Embora não tenham demonstrado um ganho de massa em parte aérea, plantas de soja que foram tratadas apenas com a rizobactéria Cs-12, estirpe do gênero *Bacillus* spp., apresentaram um incremento de massa seca no sistema radicular. Este resultado corrobora com o descrito acima, comprovando a boa capacidade da rizobactéria deste gênero em promover o crescimento de sua planta hospedeira. Estas conclusões também podem corroborar, em partes, para o resultado obtido no teste de colonização rizosférica, onde Cs-12 proporcionou 166% e

99% de incremento em massa de raiz seca (MRS), em uma performance melhor do que as obtidas pelas rizobactérias Mc-3 e Cs-2, esta última pertencente ao gênero *Enterobacter* spp.

No intuito de validar os resultados obtidos neste trabalho, é de essencial importância a repetição de ensaios para atestar a eficácia ou não destas estirpes em realizar o biocontrole das populações de nematoides das galhas e, bem como a promoção de crescimento exercidas por estas rizobactérias em plantas de soja. Testes de colonização rizosférica também são passíveis de execução para atestar a possível vantagem de colonização do sistema radicular pela estirpe Cs-12.

As rizobactérias Mc-3 e Cs-12, por serem pertencentes ao gênero *Bacillus* spp., possuem maior aceitação no mercado para seu uso como agente de controle biológico por não serem patogênicas à seres humanos, diferente daquelas pertencentes ao gênero *Enterobacter* spp. (Cs-2), gênero este conhecido por englobar espécies oportunistas à seres vivos. Concentrar os estudos em Mc-3 e Cs-12 pode ser uma opção mais viável em se pensando no produto final que será levado ao produtor rural. A forma de aplicação das rizobactérias também pode ser um fator diferencial. Neste trabalho, as estirpes foram aplicadas diretamente no solo, em uma forma de verificar o nível de ação quando presentes no solo, diferentemente da maioria dos trabalhos, onde as rizobactérias são inoculadas diretamente nas sementes, comumente chamado de tratamento de sementes.

Desta forma, as rizobactérias promotoras do crescimento (PGPR's) em estudo neste trabalho podem sim apresentar a capacidade de serem bons agentes de controle biológico de nematoides das galhas. O não controle aqui apresentado podem ser advindos dos motivos citados acima, não sendo fator conclusivo para as suas não eficácias. A forma de aplicação via tratamento de sementes deve ser testada, para verificar se esta é a melhor forma de aplicação, tanto para o controle de nematoides das galhas, quanto para verificar a promoção de crescimento das plantas hospedeiras, no caso a cultura da soja. A aplicação conjunta destas rizobactérias, chamado comumente de mix de microrganismos, também pode ser levada em consideração para estudos posteriores.

## 5. CONCLUSÕES

As rizobactérias não foram efetivas no biocontrole do nematoide das galhas (*Meloidogyne* spp.) em plantas de soja, quando aplicadas diretamente no solo via sulco de

plântio. Embora não tenham demonstrado incremento em parte aérea, Cs-12 proporcionou ganho de massa seca de raiz em plantas de soja sadias.

## 6. REFERÊNCIAS

ABHISEK GOWDA, A. P.; PANKAJ; SINGH, D.; SINGH, A. K.; SOWMYA, R. Nematicidal potential of plant growth-promoting rhizobacteria against *Meloidogyne incognita* infesting tomato under protection cultivation. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 32, n. 145, 2022.

AL-ALI, A.; DERAVEL, J.; KRIER, F.; BÉCHET, M.; ONGENA, M.; JACQUES, P. Biofilm formation is determinant in tomato rhizosphere colonization by *Bacillus velezensis* FZB42. **Environ Sci Pollut Res Int**, v. 25, p. 29910-29920, 2018.

ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em Fitopatologia – 2ª edição atualizada e ampliada**. Viçosa: Editora UFV, 2016. 516p.

ALVES, F. R.; FREITAS, L. G. **Controle biológico de fitonematoides**. In: Zambolim, L.; JESUS JÚNIOR, W. C.; RODRIGUES, F. A. (ed) **O essencial da fitopatologia – controle de doenças de plantas**. Viçosa: Editora Suprema, p. 237 – 263, 2014.

ASMUS, G. L.; GALBIERI, R.; SILVA, R. A.; INOMOTO, M. M. **Nematoses de soja, algodoeiro e milho**. In: Zambolim L (ed) **Manejo integrado de doenças agressivas visando a produtividade de grãos**. Viçosa, UFV: Divisão Gráfica Universitária, p. 246-320, 2023.

BENIZRI, E.; BAUDOIN, E.; GUCKERT, A. Root colonization by inoculated plant growth-promoting rhizobacteria. **Biocontrol Science and Technology**, v. 11, p. 557 – 574, 2001.

BEZERRA, A. R. G.; SEDIYAMA, T.; BORÉM, A., SOARES, M. M. **Importância econômica**. In: Sedyama T, Silva F & Borém A (ed) **Soja – do plantio à colheita**. Viçosa: Editora UFV, p. 9-26, 2015.

BLAKE, C.; CHRISTENSEN, M. N.; KOVÁCS, A. T. Molecular Aspects of Plant Growth Promotion and Protection by *Bacillus subtilis*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 34, n. 1, p.15 – 25, 2020.

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

BOWEN, G. D.; ROVIRA, A. D. Microbial colonization of plant roots. **Annual Review of Phytopathology**, v. 14, p. 121 – 44, 1976.

BOWEN, G. D.; FOSTER, R. C. **Dynamics of microbial colonization of plant roots**. In: BROUGHTON, W. J.; JOHN, C.J. (eds) **Symposium of Soil Microbiology and Plant Nutrition**. University of Malaya Press, Kuala Lumpur, p. 14 – 31, 1978.

BRINGEL, J. M. M. Colonização de raízes de plantas cultivadas por *Pseudomonas solanacearum* biovars I, II e III em condições de casa de vegetação e “in vitro”. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – **Universidade Nacional de Brasília (UnB), Brasília – UnB**, 119 p., 1997.

BROEK, A.; LAMBRECHT, M., VANDERLEYDEN, J. Bacterial chemotactic motility is important for the initiation of wheat root colonization by *Azospirillum brasilense*. **Microbiology Reading**, v. 144, p. 2599 – 2606, 1998.

BYRD JR, D. W.; KIRKPATRICK, J.; BARKER, K. R. Na improved technique for Clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. **Journal of Nematology**, v. 15, p. 141 – 143, 1983.

DARRIBA, D.; TABOADA, G. L.; DOALLO, R.; POSADA, D. jModelTest 2: more models, new heuristics and high-performance computing Europe PMC Funders Group. **Nat Methods**, v. 9, n. 772, 2015.

DHINGRA, O. D.; MENDONÇA, H. L.; MACEDO, D. M. **Doenças e seu controle**. In: SEDIYAMA, T. (ed) **Tecnologia de produção e usos da soja**. Mecenas, Londrina – PR, p. 133-155, 2009.

DIAS, W. P.; SILVA, J. F. V.; GARCIA, A.; CARNEIRO, G. E. S. **Nematoides de importância para a soja no Brasil**. In: Fundação MT (ed) **Boletim de Pesquisa de Soja 2007**. Fundação MT, Cuiabá, p. 173-183, 2007.

DIAS, W. P.; ASMUS, G. L.; SILVA, J. F. V.; GARCIA, A.; CARNEIRO, G. E. S. **Nematoide**. In: ALMEIDA, A. M. R.; SEIXAS, C. D. S. (Eds). **Soja. Doenças Radiculares e de Hastes e Inter-relações com o Manejo do solo e da Cultura**. Londrina: Embrapa Soja, p. 173 – 206, 2010.

DICKSON, D. W.; SASSER, J. N.; HUISINGH, D. Comparative disc-electrophoretic protein analyses of selected *Meloidogyne*, *Ditylenchus*, *Heterodera* and *Aphelenchus* spp. **J. Nematol.**, v. 3, p. 1 – 16, 1970.

ELKOCA, E.; KANTAR, F.; SAHIN, F. Influence of nitrogen fixing and phosphorus solubilizing bacteria on the nodulation, plant growth, and yield of chickpea. **J. Plant Nutr.**, v. 31, p. 157 – 171, 2007.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA. **Tecnologias de produção de soja – Região Central do Brasil 2012 e 2013**. Embrapa Soja, Londrina – PR, 264 p., 2011. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/904487/tecnologias-de-producao-de-soja---regiao-central-do-brasil-2012-e-2013>.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA. **Brasil é líder mundial em tecnologias de controle biológico**. Embrapa Cerrados, Brasília – DF, 2019. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/46366490/brasil-e-lider-mundial-em-tecnologias-de-controle-biologico>.

ENGELBRECHT, G.; CLAASSENS, S.; MIENIE, C. M. S.; FOURIE, H. Filtrates of mixed *Bacillus* spp. inhibit second-stage juvenile motility of root-knot nematodes. **Rhizosphere**, v. 22, n. 100528, 2022.

FABRY, C. F. S. **Controle de *Meloidogyne javanica* por rizobactérias de plantas antagonistas a fitonematoides**. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa – UFV, 49 p., 2002.

FERRAZ, S.; SANTOS, M. A. Controle biológico de fitonematoides pelo uso de fungos. **Revisão Anual de Proteção de Plantas**, v. 3, p. 283-314., 1995.

FERRAZ, S.; FREITAS, L. G.; LOPES, E. A.; DIAS-ARIEIRA, C. R. **Manejo sustentável de fitonematoides**. Editora UFV, Viçosa – MG, 306 p., 2010.

FERRAZ, L. C. C. B.; BROWN, D. J. F. **Nematologia de plantas: fundamentos e importância**. Manaus: Norma Editora, 251 p., 2016.

FREITAS, L. G.; OLIVEIRA, R. D. L.; FERRAZ, S. **Introdução à nematologia**. Editora UFV, Viçosa – MG, 84 p. (Cadernos Didáticos, 58), 1999.

FREITAS, L. G. **Rizobactérias versus nematoides**. In: Reunião de Controle Biológico de Fitopatógenos, 7. Anais: Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, p. 25 – 35, 2001.

FREITAS, L. G.; OLIVEIRA, R. D. L.; FERRAZ, S. **Nematoides como patógenos de plantas**. In: ZAMBOLIM, L., JESUS JUNIOR, W. C.; PEREIRA, O. L. (ed) **O essencial da fitopatologia – agentes causais**, v. 2. Editora Suprema, Viçosa, p. 89-128., 2012.

GHINI, R. **Coletor Solar para Desinfestação de Substratos para Produção de Mudas Sadias**. Embrapa, Circular Técnica 4, Jaguariúna – SP., 2004. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/14557/coletor-solar-para-desinfestacao-de-substratos-para-producao-de-mudas-sadias>.

HENNING, A. A.; ALMEIDA, A. M. R.; GODOY, C. V.; SEIXAS, C. D. S.; YORINORI, J. T.; COSTAMILAN, L. M.; FERREIRA, L. P.; MEYER, M. C.; SOARES, R. M.; DIAS, W. P. **Manual de identificação de doenças de soja** (4 ed) Embrapa Soja, Londrina – PR, 74 p., 2009.

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

JATALA, P. Biological control of plant-parasitic nematodes. **Annual Review of Phytopathology**, v. 24, p. 453-89., 1986.

KATOH, K.; STANDLEY, D. M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. **Mol Biol Evol.**, v. 30, p. 772–780, 2013.

KERRY, B. R. **Fungi as biological control agents for plant parasitic nematodes.** In: WHIPPS, J. M.; LUMSDEN, R. D. (eds) **Biotechnology of fungi for improving plant growth.** Cambridge University Press, Cambridge, p. 153-170., 1989.

KLOEPPER, J. W.; ZABLOTOWIXZ, R. M.; TIPPING, E. M.; LIFSHITZ, R. **Plant growth-promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers.** In: KEISTER, D. L.; GREGAN, P. B. (eds) **The rizosphere and plant growth.** Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 315 – 26., 1990.

KLOEPPER, J. W.; RODRÍGUEZ-KÁBANA, R.; MCINROY, J. A.; COLLINS, D. J. Analyses of populations and physiological characterization of microorganisms. **Plant and Soil**, v. 136, p. 95 – 102., 1991.

KLOEPPER, J. W.; RODRÍGUEZ-KÁBANA, R.; MCINROY, J. A.; YOUNG, R. W. Rhizosphere bacteria antagonistic to soybean cyst (*Heterodera glycines*) and root-knot (*Meloidogyne incognita*) nematodes: Identification by fatty acid analysis and frequency of biological control activity. **Plant and Soil**, v. 139, p. 75 – 84., 1992.

MATSUO, E.; LOPES, E. A.; SEDIYAMA, T. **Manejo de doenças.** In: SEDIYAMA, T.; SILVA, F.; BORÉM, A. (ed) **Soja – do plantio à colheita.** Editora UFV, Viçosa, p. 288-309., 2015.

MEERA, M. S.; SHIVANNA, M. B.; KAGEYAMA, K., HYAKUMACHI, M. Persistence of induced systemic resistance in cucumber in relation to root colonization by plant growth promoting fungal isolates. **Crop Protection**, v. 14, p. 123 – 130., 1995.

MEDEIROS, J. E.; SILVEIRA, E. B.; MARIANO, R. L. R.; PEDROSA, E. M. R. Inconsistency of the biological control of *Meloidogyne incognita* race 2 in melon by endophytic and rhizosphere bacteria. **Horticultura Brasileira**, v. 27, p. 319-324, 2009.

MIRANDA, E. F. O. **Colonização de raízes de plantas daninhas por *Ralstonia solanacearum* in vitro e em casa de vegetação.** Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Nacional de Brasília (UnB), Brasília – UnB, 114 p., 1997.

MONNERAT, R.; MONTALVÃO, S. C. L.; CASTRO, M. T. **Legislação de produtos biológicos para controle de nematoides** In: ARAÚJO, E. O., AMARAL, L. S. (ed) **Biocontrole de Fitonematoides – Atualidades e Perspectivas.** Editora Dialética, p. 211-224., 2021.

MUNIF, A.; HALLMANN, J.; SIKORA, R. A. The influence of endophytic bacteria on *Meloidogyne incognita* infection and tomato plant growth. **Journal ISSASS**, v. 2, p. 68 – 74., 2013.

OOSTENDORP, M.; SIKORA, R. A. In-vitro interrelationships between rhizosphere bacteria and *Heterodera schachtii*. **Revue de Nématologie**, v. 13, p. 269 – 74, 1990.

PODESTÁ, G. S. **Interação entre *Pochonia chlamydosporia* e rizobactérias no controle de *Meloidogyne javanica***. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa – UFRV, 73 p., 2015.

RACKE; SIKORA, R. A. Isolation, formulation and antagonistic activity of rhizobacteria toward the potato cyst nematode *Globodera pallida*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 24, p. 521-526, 1992.

RAMBAUT, A. **FigTree v1.4.4, a graphical viewer of phylogenetic trees**, 2018. Disponível em: <https://github.com/rambaut/figtree/releases>

REINHOLD-HUREK, B., BUNGER, W.; BURBANO, C. S.; SABALE, M.; HUREK, T. Roots Shaping Their Microbiome: Global Hotspots for Microbial Activity. **Annual Review of Phytopathology**, v. 53, p. 403–24, 2015.

ROMEIRO, R. S.; DEUNER, C. C.; SILVA, H. S. A.; CARVALHO, M. G. **Roots colonized and growth promoted by rhizobacteria in tomato**. Annals of the 5<sup>th</sup> International PGPR Workshop, Córdoba, Argentina. (Abstract), 2000.

ROMEIRO, R. S. **Controle Biológico de Doenças de Plantas – Procedimentos**. Editora UFRV, Viçosa – MG, 172 p., 2007.

SANTOYO, G.; URTIS-FLORES, C. A.; LOEZA-LARA, P. D.; OROZCO-MOSQUEDA, Md. C.; GLICK, B. R. Rhizosphere Colonization Determinants by Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR). **Biology**, v. 10, n. 475, 2021.

SIDDIQUI, I. A., SHAUKAT, S. S. Combination of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pochonia chlamydosporia* for control of root-knot infecting fungi in tomato. **Journal of Phytopathology**, v. 151, p. 215 – 22, 2003.

SILVA, H. S. A.; ROMEIRO, R. S.; MOUNTEER, A. Development of a root colonization bioassay for rapid screening of rhizobacteria for potential biocontrol agents. **Journal of Phytopathology**, v. 151, p. 42 – 46, 2003.

SIVASAKTHI, S.; USHARANI, G.; SARANJAJ, P. Biocontrol potentiality of plant growth promoting bacteria (PGPR) – *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*: A review. **African Journal of Agricultural Research**, v. 9, n. 16, p. 1265 – 1277, 2014.

STAMATAKIS, A. RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. **Bioinformatics**, v. 30, p. 1312–1313, 2014.

STIRLING, G. R. **Biological control of plant parasitic nematodes: progress, problems and prospects**. CAB International, Wallingford, 282 p., 1991.

VARKEY, S.; ANITH, K. N.; NARAYANA, R.; ASWINI, S. A consortium of rhizobacteria and fungal endophyte suppress the root-knot nematode parasite in tomato. **Rhizosphere**, v. 5, p. 38 – 42, 2018.

WANG, J.; HE, Y.; LI, T.; LI C.; XU, X.; XIANG, H.; WANG, X.; WU, Z. Complex biochemical synergistic interactions between two rhizobacteria grown in consortium, *Bacillus subtilis* SL-44 and *Enterobacter hormaechei* Wu-15. **Rhizosphere**, v. 24, n. 100587, 2022.

XIANG, N.; LAWRENCE, K. S.; DONALD, P. A. Biological control potential of plant growth-promoting rhizobacteria suppression of *Meloidogyne incognita* on cotton and *Heterodera glycines* on soybean: A review. **Journal of Phytopathology**, v. 166, p. 449 – 458, 2018.

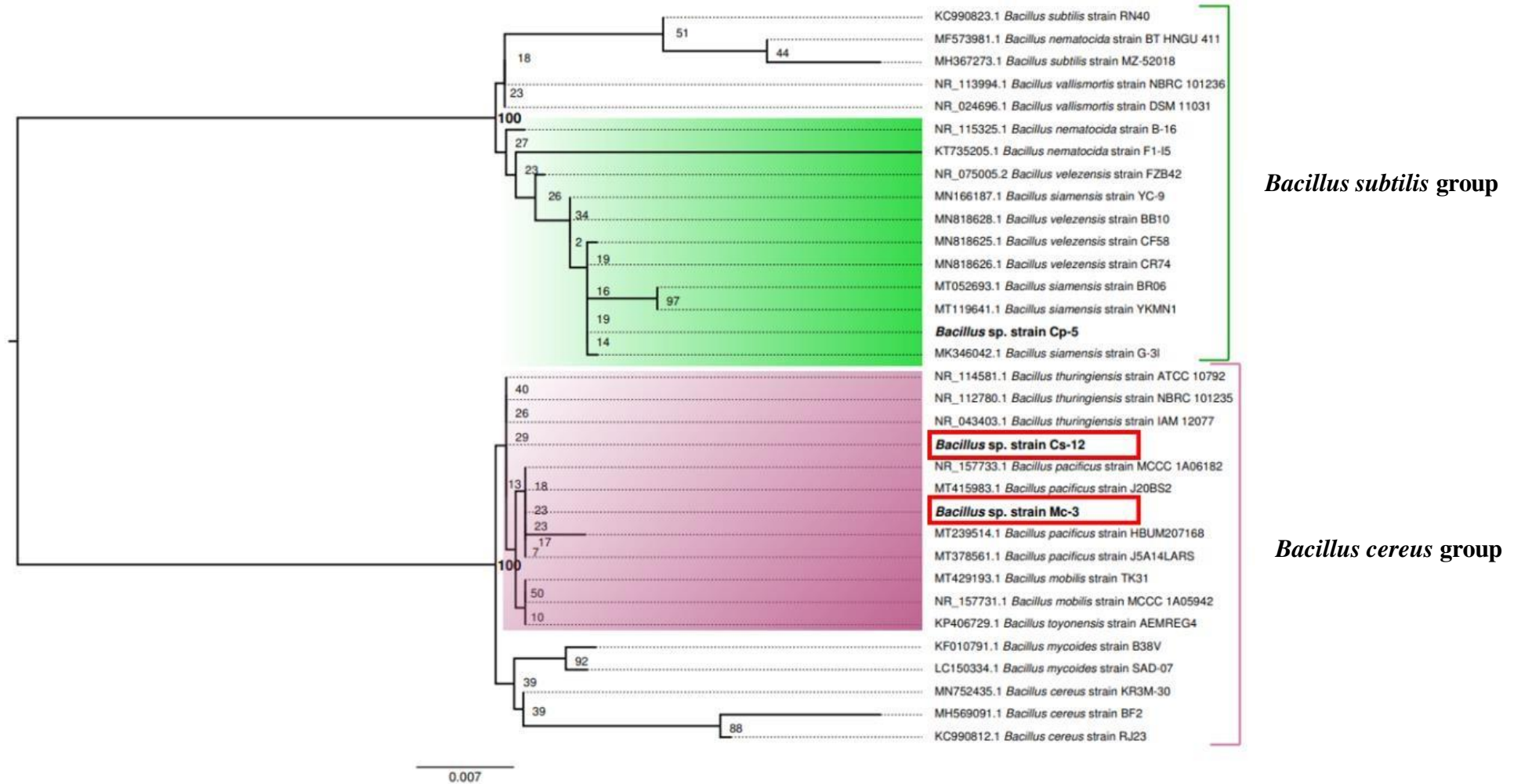
ZHENG, X. Y.; SINCLAIR, J. B. The effects of traits of *Bacillus megaterium* on seed and root colonization and their correlation with the suppression of *Rhizoctonia* root rot of soybean. **BioControl**, v. 45, p. 223 – 243, 2000.

## APÊNDICE A – Notas

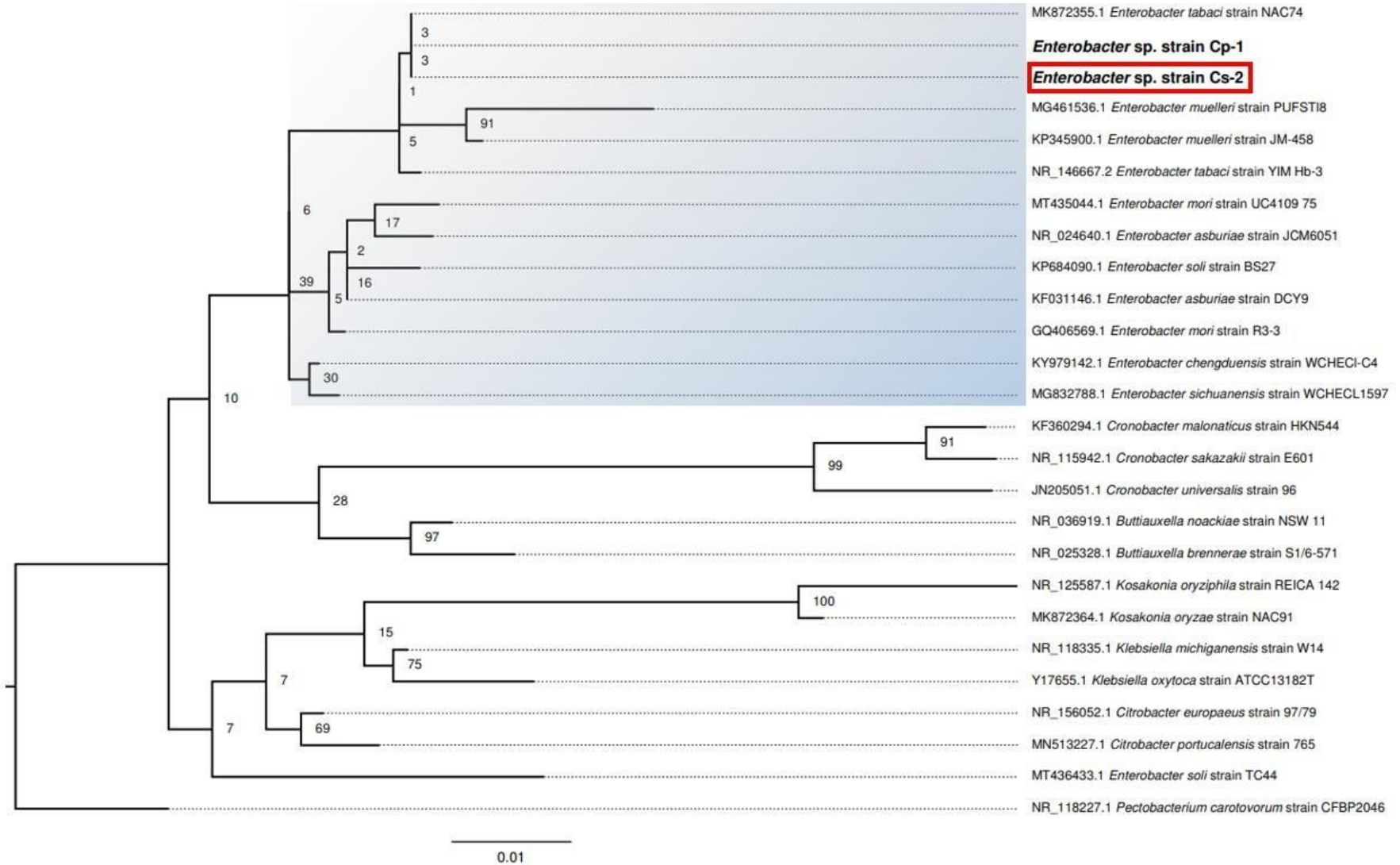
### Identificação dos isolados rizobacterianos

Após o processo de extração de DNA dos isolados, o material extraído foi enviado para obtenção das sequências de nucleotídeos para análise de homologia empregando o algoritmo BLASTn. A homologia de sequências de rRNA 16S geradas foi verificada no banco de dados do NCBI utilizando o algoritmo BLASTn, sendo selecionadas aquelas com maior identidade para reconstrução filogenética.

O conjunto de sequências do gene 16S rRNA foi alinhado empregando-se o programa MAFFT v.7.305 (KATOY; STANDLEY, 2013) usando o método L-INS-i com abertura de gap padrão e penalidades de extensão. O jmodeltest v.2.1.10 (DARRIBA *et al.*, 2015) foi utilizado para inferir o melhor modelo de substituição sob o Critério de Informação Akaike (AIC). A reconstrução filogenética usando o método de máxima verossimilhança foi realizado no programa RaxML v.8.2.12 (STAMATAKIS, 2014) usando o modelo GTR+G. Os valores de bootstrap foram calculadas a partir de 5.000 réplicas. As árvores foram visualizadas no FigTree v.1.4.4 (RAMBAUT, 2018).



**Figura 14.** Árvore filogenética construída com base nos alinhamentos da sequência de RNA ribossômico 16S de *Bacillus* spp. e pelo método da máxima verossimilhança. Os gêneros dos isolados estão destacados em vermelho.



**Figura 15.** Árvore filogenética construída com base nos alinhamentos da sequência do RNA ribossômico 16S de cepas da família *Enterobacteriaceae* e utilizando o método da máxima verossimilhança. O gênero do isolado está destacado em vermelho.