

HUARLEN MARCIO BALBINO

**ALTERAÇÕES NO METABOLISMO DA SOJA CAUSADAS PELA INTERAÇÃO DE
Pochonia chlamydosporia E *Bacillus thuringiensis* COM NEMATOIDES
FITOPARASITAS**

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

Orientador: Leandro Grassi de Freitas

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2022**

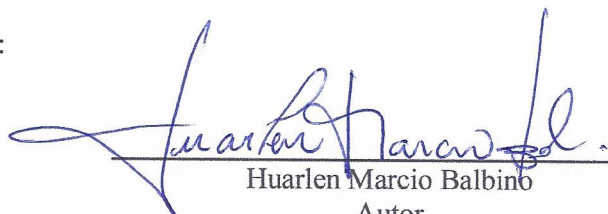
HUARLEN MARCIO BALBINO

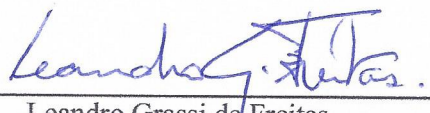
**ALTERAÇÕES NO METABOLISMO DA SOJA CAUSADAS PELA
INTERAÇÃO DE *Pochonia chlamydosporia* E *Bacillus thuringiensis* COM
NEMATOIDES FITOPARASITAS**

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

APROVADA: 30 de novembro de 2022.

Assentimento:


Huarlen Marcio Balbino
Autor


Leandro Grassi de Freitas
Orientador

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

T

B172a
2022 Balbino, Huarlen Marcio, 1992-
Alterações no metabolismo da soja causadas pela interação
de *Pochonia chlamydosporia* e *Bacillus thuringiensis* com
nematóides fitoparasitas / Huarlen Marcio Balbino. – Viçosa,
MG, 2022.

1 tese eletrônica (129 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Leandro Grassi de Freitas.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Fitopatologia, 2022.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.114>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Soja - Doenças e pragas - Controle biológico.
2. Nematoda em plantas. 3. Soja - Resistência a doenças e
pragas. 4. Fungos nematófagos. 5. Nematóide-das-galhas.
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. 633.34996

Aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Lucinea de Freitas Moreira Balbino e Maurílio Balbino, por me ensinarem a ser um ser humano melhor e a nunca desistir dos meus sonhos;

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade de realizar o curso de pós-graduação;

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), pelo apoio financeiro;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos;

Ao meu orientador Leandro Grassi de Freitas, pela orientação, paciência, confiança e dedicação;

Ao professor Fabrício Ávila Rodrigues, pela coorientação, pelos conselhos, aulas e por compartilhar seu conhecimento e seu laboratório para realização de experimentos;

A Dra. Thalita Suelen Avelar Monteiro, pela coorientação, pela amizade, pelo apoio e pelos bons momentos compartilhados;

Ao Alessandro Turíbio de Souza, por ser meu companheiro, por insistir que eu lute pelos meus sonhos e por todo amor, carinho, paciência e incentivo;

Aos meus irmãos, Hudson Moreira Balbino, Hualisson Balbino e Huadila de Freitas Moreira Balbino, por me apoiarem e me encorajarem a lutar pelos meus sonhos;

Aos meus amados sobrinhos Giovana, Mariá, Caleb e Marcel;

À Angélica de Souza Gouveia e ao Paulo Henrique Dionízio Luiz, pela amizade pelo apoio, pelos conselhos e pelos bons momentos compartilhados;

À Dra. Flavia Caroline Rodrigues, pela amizade e por toda a ajuda na execução dos experimentos;

Aos amigos do BIONEMA Cassia, Fernanda, Vitor, Júlio, Gabriela, Lucas, pelo convívio, pela amizade e colaboração;

Aos amigos Adriana Souza, João Augusto, Renata Damaceno, Leydiane Ribeiro, Viviane de Paula e Fabiana Barros, pela amizade, apoio, torcida e pelos momentos de felicidade;

Agradeço ao presidente Luiz Inácio Lula da Silva, que criou políticas públicas que me permitiram entrar na Universidade Federal e investiu em ciência e tecnologia que me permitiram obter mestrado e doutorado.

“Demore o tempo que for para decidir o que você quer da vida, e depois que decidir não recue ante nenhum pretexto, porque o mundo tentará te dissuadir”

(Friedrich Nietzsche)

RESUMO

BALBINO, Huarlen Marcio, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2022. **Alterações no metabolismo da soja causadas pela interação de *Pochonia chlamydosporia* e *Bacillus thuringiensis* com nematoides fitoparasitas.** Orientador: Leandro Grassi de Freitas.

A soja é uma cultura de grande importância mundial, pois é a principal fonte de farelo proteico e óleo vegetal. Atualmente, o Brasil é o maior produtor e exportador dessa *commodity*, porém diversas pragas e patógenos estão associados à cultura, o que pode causar perdas significativas, refletindo na baixa produção ou perda da qualidade dos grãos. Dentre esses organismos antagônicos à produção de soja, destacam-se os nematoides parasitas de plantas, principalmente *Meloidogyne* spp, *Heterodera glycines* e *Pratylenchus brachyurus*, que possuem ampla distribuição nos campos de produção e são altamente agressivos. Como medida de manejo, é indicado o uso de organismos de controle biológico, principalmente bactérias e fungos nematófagos, que apresentam alta eficiência e são princípios ativos de diversos nematicidas microbiológicos. O fungo *Pochonia chlamydosporia* é um ascomiceto parasita de ovos de nematoides e é amplamente investigado no manejo de nematoides endoparasitas sedentários, mas carece de informações sobre os mecanismos de ação em nematoides com hábitos de vida endo-migratórios, em que a oviposição ocorre dentro do sistema radicular. Outro exemplo, a bactéria *Bacillus thuringiensis* é intensamente estudada no controle biológico de insetos, mas o efeito nematotóxico das proteínas de *B. thuringiensis* sobre nematoides de vida livre e parasitas de plantas já é relatado. No entanto, pouco se sabe sobre outros mecanismos de ação, como a indução de resistência, por exemplo. Neste trabalho, investigamos o potencial de um isolado de *P. chlamydosporia* e quatro isolados de *B. thuringiensis* no manejo dos principais nematoides nocivos à soja e a capacidade desses organismos em induzir resistência sistêmica contra esses fitopatógenos. *Pochonia chlamydosporia* foi estudada no manejo de *P. brachyurus*, enquanto *B. thuringiensis* foi confrontada com *M. javanica*, *H. glycines* e *P. brachyurus*. Sementes tratadas com *P. chlamydosporia* ou com *B. thuringiensis* foram semeadas em vasos contendo solo esterilizado e, após 7 dias, foi aplicada uma suspensão aquosa contendo os respectivos nematoides. Após 7, 15, 30 e 60 dias da inoculação (dai) do nematoide, as variáveis nematológicas foram mensuradas e, por meio de técnicas bioquímicas e moleculares, foram quantificadas a concentração de metabólitos secundários e a expressão de genes relacionados à defesa. Variáveis agrônomicas foram analisadas para avaliar o potencial dos isolados em promover o crescimento das plantas. O isolado de *P. chlamydosporia* foi capaz de reduzir a

população de *P. brachyurus* de 25,02 a 41,84%, enquanto os isolados bacterianos promoveram a redução dos três gêneros de 36,6 a 55,9%. Da mesma forma, *P. chlamydosporia* e o isolado M51 de *B. thuringiensis* modificaram significativamente a expressão de genes de defesa, a concentração de compostos fenólicos totais e importantes hormônios relacionados à defesa e alteraram a concentração de derivados de lignina, indicando maior lignificação da parede celular. Assim, pode-se dizer que os isolados aqui investigados são eficientes no controle dos principais nematoides da soja e a indução de resistência é um importante mecanismo para esse efeito.

Palavras-chave: Controle biológico. Bactérias nematófagas. Fungos nematófagos. Nematóide de galhas. Nematóide de cistos. Nematóide das lesões radiculares. Indução à resistência.

ABSTRACT

BALBINO, Huarlen Marcio, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, November, 2022. **Alterations in the metabolism of soybean caused by the interaction of *Pochonia chlamydosporia* and *Bacillus thuringiensis* with plant-parasitic nematodes.** Adviser: Leandro Grassi de Freitas.

Soybean is a crop of great importance worldwide, since it is the main source of protein meal and vegetable oil. Currently, Brazil is the largest producer and exporter of this commodity, but several pests and pathogens are associated with the crop, which can cause significant losses, reflecting low production or loss of grain quality. Among these antagonistic organisms to soybean production, plant parasitic nematodes can be highlighted, mainly *Meloidogyne* sp, *Heterodera glycines* and *Pratylenchus brachyurus*, which have a wide distribution in production fields and are highly aggressive. As a management measure, the use of biological control organisms is indicated, especially nematophagous bacteria and fungi, which have high efficiency and are active principles of several microbiological nematicides. The fungus *Pochonia chlamydosporia* is an ascomycete parasite of nematode eggs and is widely investigated in the management of sedentary endoparasitic nematodes but lacks information on the mechanisms of action on nematodes with endo-migratory life habits, in which oviposition occurs within the root system. Another example, the bacterium *Bacillus thuringiensis* is intensively studied in the biological control of insects, but the nematotoxic effect of *B. thuringiensis* proteins on free-living nematodes and plant parasites is already reported. However, little is known about other mechanisms of action, such as resistance induction, for example. In this work, we investigated the potential of one *P. chlamydosporia* isolate and four *B. thuringiensis* isolates in the management of the main nematodes harmful to soybean and the ability of these organisms to induce systemic resistance against these phytopathogens. *Pochonia chlamydosporia* was studied in the management of *P. brachyurus*, while *B. thuringiensis* was confronted with *M. javanica*, *H. glycines* and *P. brachyurus*. Seeds treated with *P. chlamydosporia* or with *B. thuringiensis* were sown in pots containing sterilized soil and, after 7 days, an aqueous suspension containing nematodes was applied. After 7, 15, 30 and 60 days of nematode inoculation (dai), nematological variables were measured and, using biochemical and molecular techniques, the concentration of secondary metabolites and the expression of defense-related genes were quantified. Agronomic variables were analyzed in order to assess the potential of the isolates to promote plant growth. The *P. chlamydosporia*

isolate was able to reduce the *P. brachyurus* population from 25.02 to 41.84%, while the bacterial isolates reduced the three genera from 36.6 to 55.9%. Likewise, *P. chlamydosporia* and the M51 isolate of *B. thuringiensis* significantly modified the expression of defense genes, the concentration of total phenolic compounds and important hormones related to defense and altered the concentration of lignin derivatives, indicating greater cell wall lignification. Neither isolated was able to improve the development of the culture. Thus, it can be said that the isolates investigated here are efficient in controlling the main soybean nematodes and the induction of resistance is an important mechanism for this effect.

Keywords: Biological control. Nematophagous bacteria. Nematophagous fungus. Root-knot nematode. Cyst nematode. Root lesion nematode. Resistance induction.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1. Os nematoides parasitas de plantas.....	14
2.2. <i>Pochonia chlamydosporia</i>	20
2.3. <i>Bacillus thuringiensis</i>	23
3. HIPÓTESES	26
4. REFERÊNCIAS.....	27
CAPÍTULO 1: <i>Pochonia chlamydosporia</i> modifica a expressão de genes de defesa em soja e promove o biocontrole de <i>Pratylenchus brachyurus</i>	37
1. INTRODUÇÃO	40
2. MATERIAL E MÉTODOS	42
3. RESULTADOS	46
4. DISCUSSÃO	56
5. CONCLUSÃO	62
6. REFERÊNCIA.....	63
CAPÍTULO 2: Mecanismos envolvidos no controle de nematoides em soja por <i>Bacillus thuringiensis</i>	80
1. INTRODUÇÃO	83
2. MATERIAL E MÉTODOS	85
3. RESULTADOS	94
4. DISCUSSÃO	110
5. CONCLUSÃO	116
6. REFERÊNCIAS.....	117
CONCLUSÕES GERAIS.....	129

1. INTRODUÇÃO

Os nematoides parasitas de plantas (NPPs) são vermes microscópicos capazes de infectar as raízes das plantas hospedeiras, causando perdas significativas para agricultura. Estimativas mais recentes indicam que os NPPs ocasionam perdas em torno de 80 bilhões de dólares ao ano (Nicol et al., 2011). Essas perdas são reflexo da capacidade desses parasitas de plantas conseguirem parasitar uma vasta gama de hospedeiros, ou seja, a maioria das plantas cultivadas, por terem uma ampla distribuição geográfica no globo terrestre e por possuírem populações altamente agressivas (Jones et al., 2013).

Os NPPs interagem com plantas hospedeiras com o objetivo de obter nutrientes para o seu desenvolvimento. Assim, esses organismos causam danos e a reorganização *de novo* dos tecidos das plantas, principalmente nos vasos condutores para succionar os nutrientes (Bartlem et al., 2013). Desse modo, a planta passa a produzir fitoassimilados que serão sequestrados pelo nematoides, levando as plantas ao subdesenvolvimento. Ademais, a atividade dos nematoides sob plantas hospedeiras dificulta a absorção de água e nutrientes a partir solo e aumentam a suscetibilidade ou suplantam a resistência a outros organismos fitopatogênicos, como os fungos e bactérias, por gerarem aberturas/ferimentos no sistema radicular, facilitando a entrada de patógenos (Bergeson, 1972).

Os NPPs são organismos biotróficos e são classificados de acordo com o tipo de relacionamento que estabelecem com o seu hospedeiro (Decraemer e Hunt, 2013; Smant et al., 2018). Por exemplo, os NPPs ectoparasitas, que apenas o estilete é inserido no tecido vegetal para sucção de nutriente. Nesse grupo têm-se representantes importantes, como *Xiphinema* e *Longidorus*, que são vetores de vírus (Taylor e Robertson, 1975). Outro grupo, corresponde aos nematoides que tem pelo menos uma fase do ciclo de vida dentro dos tecidos do hospedeiro, estes são chamados de nematoides endoparasitas. Ao penetrarem no tecido vegetal, os nematoides endoparasitas podem seguir todo o resto de sua vida migrando pelos tecidos e alimentando-se das células dos hospedeiros, acarretando galerias necróticas nas raízes. Nematoides com estilo de vida endoparasita migrador, como *Pratylenchus*, *Radopholus*, *Aphelenchoides* e *Bursaphelenchus*, estão associados com graves índices de perdas de produtividade em todas as regiões agrícolas do mundo (Jones et al., 2013). Por fim, os nematoides endoparasitas sedentários, representados pelos gêneros *Meloidogyne*, *Heterodera* e *Globodera*. Nematoides com este estilo de vida, após penetrar no tecido vegetal, migram para o cilindro vascular, onde escolhem as células que irão ser diferenciadas para tornar estruturas

especializadas para retirada de nutrientes. Após causarem essas modificações, tornam-se sedentários e passam o resto do ciclo de vida alimentado das células diferenciadas (Moens et al., 2009). Devido às modificações anatômicas e fisiológica nas células hospedeiras causadas pelo parasitismo de nematoides endoparasitas sedentários, o desenvolvimento das plantas e produção agrícola são fortemente afetados, sendo este grupo de NPPs considerado o mais importante na questão de perda de produtividade (Jones et al., 2013).

Como alternativa para o controle desses organismos maléficos para a produção agrícola, indica-se o uso do manejo integrado de doenças de plantas, que combina diversos mecanismos para redução da população do patógeno, como por exemplo o controle preventivo, controle cultural e controle químico (Ferraz et al., 2013). Dentre os diversos mecanismos para redução de NPPs em áreas agricultáveis, destaca-se o uso de microrganismo antagonista no controle biológico. Esta estratégia já se mostrou eficiente ao utilizar bactérias, fungos, nematoides predadores e tardígrados (Stirling, 1993), porém, até o momento, os fungos e as bactérias são os mais estudados, já que apresentam vantagens como a alta eficiência e facilidade de produção massal (Chen e Dickson, 2004).

Os mecanismos pelo quais os fungos e bactérias atuam no controle de NPPs são variados, podendo ser diretamente sobre o alvo, parasitando ovos e/ou espécimes móveis, produzindo compostos xenofobióticos e/ou, ainda, melhorando a resposta da planta a infecção, por meio da indução à resistência (Medeiros et al., 2015; Escudero and Lopez-Llorca, 2012; Monteiro et al., 2020; Yang et al., 2012). O fungo *Pochonia chlamydosporia*, endofítico e nematófago, foi relatado parasitando ovos de NPPs de diferentes gêneros (Manzanilla-López and Lopez-Llorca, 2017) e, mais recentemente, melhorando a resposta de defesa da planta contra nematoides por meio da ativação de vias bioquímicas específicas (Santos et al., 2017).

Atualmente, as bactérias correspondem a maior proporção de nematicidas biológicos registrados no Brasil e no mundo (MAPA, 2022). Diversos gêneros bacterianos, em especial, às rizobactérias promotoras de crescimento (PGPR), podem atuar como antagonista a inúmeras espécies de nematoides parasitas de plantas (Subedi et al., 2020). Bactérias presentes no rizoplano podem estabelecer uma relação benéfica com as raízes das plantas e reduzir a população de NPPs no solo por meio do parasitismo direto, produção de proteínas e metabólitos com atividade nematicida e por criarem biofilme nas raízes que impedem a localização e a penetração dos nematoides nas raízes (Tian et al., 2007).

Pasteuria, *Pseudomonas* e *Bacillus* são os gêneros de rizobactérias mais investigados no manejo de NPPs, o que justifica a maior proporção de nematicidas microbiológicos no mercado serem destes três grupos. As espécies *Bacillus subtilis*, *B. firmus*, *B. methylotrophicus*, *B. amyloliquefaciens* e *B. licheniformis* são alguns exemplos de bactérias que são o princípio ativo de diversos nematicidas microbiológicos, sendo a primeira, *B. subtilis*, a mais estudada neste quesito (Subedi et al., 2020; Tian et al., 2007). Apesar da grande diversidade de fungos nematófagos relatados na literatura científica, atualmente, no Brasil, os produtos nematicidas microbiológicos são produzidos apenas com fungos dos gêneros *Trichoderma*, *Purpureocillium* (= *Paecilomyces*) e *Pochonia*, sendo esses, na maioria das vezes, recomendados para todas as culturas, para o manejo de *Meloidogyne*, *Heterodera* e *Pratylenchus* (MAPA, 2022).

Os mecanismos de ação de fungos e bactérias nematófagos são variados, podendo ser por meio do parasitismo e predação, produção de compostos tóxicos, competição e indução à resistência. Identificar como os organismos antagonistas interagem com nematoides parasitas vegetais e com as culturas hospedeiras – associações sinérgicas-, auxilia a desvendar esses mecanismos de controle e, no futuro, aprimorar e elaborar novas estratégias que favoreçam o agente de biocontrole contra o alvo, neste caso, os NPPs.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Os nematoides parasitas de plantas

Os NPPs são animais que estão inclusos dentro do filo Nematoda, onde estão presentes também espécies de nematoides parasitas de animais e de vida livre, que se alimentam de bactérias, fungos ou algas (Kikuchi et al., 2017). As diferentes linhagens de NPPs evoluíram independentemente e estes pertencem às ordens Triplonchida, Dorylaimida, e Rhabditida, sendo nessa última, na infraordem Tylenchomorpha, com os nematoides mais devastadores para agricultura (Jones et al., 2013; Hodda, 2022). Apesar dos eventos evolutivos independentes para o parasitismo vegetal, os NPPs possuem o estilete como característica compartilhada (Baldwin et al., 2004). Essa estrutura tem como função no parasitismo de extrair nutrientes da planta e introduzir proteínas e moléculas capazes de ocasionar modificações morfológicas e fisiológicas contínuas na célula vegetal hospedeira (Mitchum et al., 2013).

A subordem Tylenchina, alocada em Rhabditida, agrupa, dentre outros, os gêneros de nematoides endoparasitas sedentários formadores de galhas, *Meloidogyne*, e formadores de cistos, *Heterodera* e *Globodera*, e o nematoide endoparasita migrador, *Pratylenchus*. De acordo com Jones et al. (2013), esses quatro gêneros correspondem aos nematoides de maior importância científica e econômica em todo mundo, ocupado a liderança em uma lista com 10 gêneros parasitas de plantas mais estudados.

2.1.1 *Meloidogyne* – Nematóide de galhas (*'Root-knot nematode'* – RNK)

Meloidogyne está incluso dentro da subordem Tylenchina, na família Meloidogynidae (Hodda, 2022). Os NPPs do gênero *Meloidogyne* são considerados os de maior importância para a agricultura mundial, por apresentarem uma ampla distribuição geográfica, enorme gama de hospedeiros e associados a grandes prejuízos (Agrios, 2005; Castagnone-Sereno et al., 2013). Quando parasitando o seu hospedeiro, esses NPPs geram distúrbios hormonais nas plantas, o que leva ao aparecimento de galhas nas raízes. Esse sintoma primário dificulta a absorção de água e nutrientes do solo, de forma a acarretar plantas de baixo porte, amareladas e pouco produtivas (Bartlem et al., 2013).

Cada fêmea de *Meloidogyne* pode ovipositar até 1000 ovos no solo, porém protegidos por uma massa mucilaginosa, que evita a ação de antagonistas e dessecação (Kerry et al., 2000; Evans e Perry, 2009). Após completar os estágios da embriogênese, os nematoides de primeiro estágio (J1) passam pela primeira troca cuticular dentro dos ovos, tornando-se juvenis de segundo estágio (J2). Os J2 são comumente chamados de juvenis infecciosos, pois nessa etapa eles saem dos ovos e penetram às raízes das plantas hospedeiras pela coifa. Após a penetração, os J2 migram intracelularmente pelo cilindro vascular, onde irão escolher de 6 a 10 células para diferenciar em uma estrutura especializada para retirada de nutrientes. Após isso, os nematoides tornam-se sésseis, passando por mais duas ecdises de J2 para J3, J3 para J4 e tornam-se adultos reprodutivos. Por fim, finalizam o ciclo de vida alimentando-se das células diferenciadas e reproduzindo partenogeneticamente ou, em alguns casos, por anfimixia (Moens et al., 2009).

As células diferenciadas pelos nematoides são conhecidas como células gigantes, por sofrerem hipertrofia, podendo ter até 400 vezes o tamanho de uma célula sadia (Smant et al., 2018). Essas modificações ocorrem por ação de proteínas efetoras liberadas pelos nematoides durante as fases do seu processo infeccioso a fim de conseguirem penetrar e migrar nos tecidos da planta, modificar a expressão dos genes e o acúmulo de hormônios vegetais para indução a formação de suas células de alimentação (a galha) e para estimular o acúmulo de açúcares e

aminoácidos para alimentação dos nematoides (Abad e Williamson, 2010; Favery et al., 2016; Mejias et al., 2019; Quentin et al., 2013; Vieira e Gleason, 2019).

O parasitismo de *Meloidogyne* está intrinsecamente relacionado com o controle das vias de defesa do ácido salicílico, ácido jasmônico e etileno (Vieira e Gleason, 2019). Esses hormônios, durante o parasitismo, são regulados negativamente para aumentar a suscetibilidade do hospedeiro, no entanto, a aplicação exógena ou uso de linha transgênicas que superexpressão esses hormônios, mostraram-se mais resistentes ao nematoides de galhas, dando origem a fêmeas e sítio de alimentação menores e menor taxa de reprodução dos nematoides (Molinari et al., 2014). Assim, organismos benéficos que se associam às plantas ativando essas vias pode ser interessante, pois podem contribuir para a redução dos nematoides em plantas que estão em condições de campo.

O manejo de nematoides do gênero *Meloidogyne* é difícil, visto a capacidade deles de se manterem no solo infectando hospedeiros alternativos. Dentre o manejo integrado de nematoides, o controle preventivo é o mais eficiente, pois que impede a entrada desse NPPs na área. Porém, após a infestação, combina-se o uso de estratégias a fim de reduzir a densidade populacional de espécies de *Meloidogyne* (Macedo et al., 2011). Estudos relatam que o uso de *P. chlamydosporia* é eficiente em reduzir de 40 a 78% a população de *M. incognita*, *M. javanica*, *M. enterolobii* e *M. arenaria* em tomate, soja, banana, cenoura e pepino, indicando a eficiência de biocontrole promovido pelo fungo contra diferentes espécies do gênero *Meloidogyne* e em plantas de diferentes famílias botânicas (Silva et al., 2017; Ghahremani et al., 2019; Dallemole-Giaretta et al., 2012; Viggiano et al., 2014; Bontempo et al., 2014; Nasu et al., 2018; Medina-Canales et al., 2019). Da mesma forma, trabalhos já relataram a eficiência de *B. thuringiensis* em reduzir de forma significativa a população de *Meloidogyne* spp., causando a inibição da eclosão e morte de J2 (Chen e Zuckerman, 2000; Yu et al., 2011; Zhang et al., 2012; Choi et al., 2020).

2.1.2 *Heterodera glycines* – Nematóide de cistos ('Cyst nematode' – CN)

Heterodera está classificado na subordem Tylenchina, na família Heteroderidae. O primeiro relato desse nematóide foi feito em 1899 na China, parasitando soja, cultura a qual o *H. glycines* é especializado (Liu et al., 1997). Assim como *Meloidogyne*, nematoides do gênero *Heterodera* são endoparasitas sedentário – as fêmeas tornam-se sesséis após estabelecerem o local de alimentação – e seu hábito parasito está relacionado a plantas com baixo porte, raquíticas, cloróticas e pouco produtivas. No entanto, quando em altas taxas populacionais, o

parasitismo de *H. glycines* em plantas de soja pode ocasionar a mortalidade prematura das plantas e, em algumas situações, as perdas de produtividade podem chegar a 100% (Costa et al., 2022). No Brasil, a ocorrência da espécie *H. glycines* foi relatada na safra 1991/92 em Minas Gerais e Mato Grosso do Sul e atualmente estima-se que a área afetada pelo nematoide seja superior a 3,0 milhões de hectares (Lima et al., 1992; Lordello et al., 1992; Monteiro e Morais, 1992).

As plantas, ao liberarem exsudatos radiculares no solo, atraem os nematoides, que iniciam o processo infeccioso por meio da penetração pela coifa das raízes. Posteriormente a isso, os nematoides, ainda vermiformes, escolhem uma célula para a partir da qual induzirem a formação de seu sítio de alimentação – os sincícios -, sofrem sucessivas ecdises, tornam-se adultos e passaram pelo resto do ciclo de vida alimentando-se apenas nas células sinciciais. Diferentemente das fêmeas, após a última ecdise, os machos retornam a forma vermiforme, migram para o solo e copulam com as fêmeas presentes no sistema radicular. Assim, as fêmeas de *H. glycines* iniciam a postura dos ovos, porém a maior parte dos ovos permanecem dentro do corpo da fêmea, que morre e torna-se estrutura de resistência para os ovos. Essa estrutura é chamada de cistos e cada cisto pode conter, em média, até 200 ovos. Quando em condições favoráveis, ocorre o desenvolvimento embrionário dos ovos, resultando em nematoides de primeiro estágio (J1), que sofrem uma primeira ecdise, originando os nematoides de segundo estágio (J2). Os J2 rompem a casca dos ovos e ficam livre no solo para recomeçar o ciclo infeccioso. Os J2 também são conhecidos como juvenis infecciosos, por serem eles os responsáveis por iniciarem a relação parasítica e são alvos das medidas de controle, uma vez que são mais sensíveis que a estrutura de resistência, os cistos (Dias et al., 2009, 2010; Jones et al., 2013; Niblack et al., 2006).

Nematoides da espécie *H. glycines* reproduzem de forma anfimítica (= reprodução cruzada) e a fêmea pode copular com vários machos, favorecendo o aumento da variabilidade genética dentro da população do patógeno. Nessa espécie de nematoide ocorre raças e no Brasil são relatados, até o momento, a presença de 11 raças (1, 2, 3, 4, 4+, 5, 6, 9, 10, 14 e 14+) distribuídas pelos estados produtores. Além da rotação de culturas, o manejo genético com o uso de variedade de soja resistente são os mais indicados, porém o uso contínuo de uma mesma cultivar resistente leva a pressão de seleção e ocasionando a suplantação da resistência. Desse modo, o manejo integrado, que combina diferentes técnicas de manejo, é indicado a fim de reduzir o efeito de pressão de seleção (Costa et al., 2022). O controle biológico compreende

umas das técnicas utilizadas no manejo de *H. glycines* e, atualmente, fungos e bactérias são princípios ativos de nematicidas microbiológicos registrados para o manejo desse patógeno.

Apesar dos estudos envolvendo proteínas de *B. thuringiensis* para o controle de *H. glycines*, no Brasil há registro apenas de produtos em que o princípio ativo é composto por *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. firmus*, *B. velezensis*, *B. paralicheniformis*, *Pasteuria nishizawae*, *Trichoderma harzianum* e *P. lilacinum* (MAPA, 2022), o que justifica a realização de mais estudos para compreender como se dá a relação *B. thuringiensis*- *H. glycines* e, a fim de compreender os mecanismos de ação envolvimentos na redução de *H. glycines* e, futuramente, determinar técnicas que favoreçam o agente de controle biológico.

2.1.3 *Pratylenchus* - Nematóide das lesões radiculares ('Root-lesion nematode' - RLN)

Pratylenchus pertence à subordem Tylenchina, na família Pratylenchidae (Hodda, 2022). Os nematoides do gênero *Pratylenchus* possuem grande variedade de plantas hospedeiras e, para algumas culturas de importância econômica, são considerados como principais pragas. As espécies mais importantes e mais comumente encontradas em regiões agrícolas são: *Pratylenchus brachyurus*, *P. thornei*, *P. loosi*, *P. penetrans*, *P. coffeae* e *P. goodeyi* (Castillo e Volvas, 2007; Jones et al., 2013).

No Brasil, a crescente expansão e prejuízos causados por *Pratylenchus* no cultivo da soja vem sendo cada vez mais conhecida, sendo a espécie *P. brachyurus* umas das mais prejudiciais em áreas produtoras de soja (Ferraz, 2006; Inomoto, 2011). O crescente aumento de danos causados por *P. brachyurus* é reflexo da rotação ou plantio sucessivo de culturas suscetíveis ao parasitismo desse patógeno, como a soja e o milho. A situação se agrava em áreas de plantio direto, pois ocorre a lenta decomposição do sistema radicular, fornecendo, assim, abrigo para os nematoides (Inomoto, 2009). Dados nacionais estimam perdas de 20 a 30% da produção de grãos em campos de soja infectados por *P. brachyurus* (Franchini et al., 2014; Vedoveto et al., 2013).

Diferentemente dos nematoides de galhas e de cistos que se tornam sedentários após as ecdises, todos os estádios de vida de *Pratylenchus* são vermiformes e podem ser encontradas migrando nos tecidos radiculares do hospedeiro ou livres no solo (Moens et al., 2009). Espécimes de *Pratylenchus* passam pela primeira ecdise dentro dos ovos e tornando-se J2, estes eclodem dos ovos, movimentam-se no solo por atração quimiossensorial em busca dos

exsudatos radiculares produzidos pelas raízes das plantas hospedeiras, penetram nas raízes na zona meristemática e migram intra e intercelularmente pela zona de alongamento até tecidos mais maduros e alimentam-se das células vegetais. Os nematoides, no solo ou presentes nas raízes, passam por novas ecdises de J2 para J3, de J3 para J4 e, por fim, tornam-se adultos reprodutivos e os ovos podem ser depositados dentro das raízes ou no solo (Jones et al., 2013; Moens et al., 2009).

O hábito de *Pratylenchus* de alimentar-se de células das raízes das plantas, causa o aparecimento de coloração marrom nas raízes (tecidos necrosados), com menos e menores pelos radiculares e, em casos mais graves, destruição das raízes. Essa atividade dos nematoides ocasiona, em campo, o aparecimento de reboleiras com plantas com subcrescimento, amareladas e com murchas nas horas mais quentes do dia (Castillo e Volvas, 2007).

Como característica conservada nos grupos de NPPs, há o estilete e as glândulas esofagianas subventrais e dorsais (Hussey, 1989). Nessas glândulas são produzidos parte dos efetores responsáveis por modificar o hospedeiro e facilitar o parasitismo (Haegeman et al., 2012; Siddique and Grundler, 2018). Nos nematoides endoparasitas sedentários, as glândulas têm funcionalidades diferentes para as etapas do desenvolvimento da doença: as glândulas subventrais são mais ativas nas fases iniciais do parasitismo, liberando proteínas degradadoras de parede celular e de supressão das respostas imunes do hospedeiro, enquanto a dorsal está envolvida nas modificações a longo prazo, como estabelecimento do sítio de alimentação (Davis et al., 2000; Mitchum et al., 2013). No entanto, como *Pratylenchus* não forma sítio de alimentação, esse padrão de produção de efetores em diferentes etapas do desenvolvimento do nematoide e da doença, não conferem (Fosu-Nyarko e Jones, 2016).

Como primeira barreira física contra a penetração de *Pratylenchus*, a parede celular vegetal é composta por polissacarídeos de celulose, hemicelulose, lignina, pectina e proteínas (Fosu-Nyarko e Jones, 2016). Ao iniciarem a infecção, os nematoides utilizam o estilete como força física para separar as lamelas médias das células, porém um coquetel de proteínas efetoras com atividade degradadora sobre a parede celular é liberado (Haegeman et al., 2012). Já são conhecidas as proteínas de *Pratylenchus* com atividades de celulase, pectinase e xilanase (Haegeman et al., 2012). No entanto, as plantas respondem ao estresse causado pela atividade de proteínas do nematoides ativando vias sinalização, que irão culminar na produção de compostos com efeito nematicida (Haegeman et al., 2012). Estudos demonstram que microrganismo endofíticos, como o *P. chlamydosporia*, podem auxiliar as plantas a responderem mais rápido e de forma intensa a colonização do nematoide (Jung et al., 2012; Vos

et al., 2013, 2012). Desse modo, estudar a expressão diferencial de genes de defesa das plantas que hospedam agente de biocontrole pode elucidar novos mecanismos moleculares de atuação desses organismos antagonistas e explicar como fungos e bactérias reduzem a população de RLN.

2.2. *Pochonia chlamydosporia*

O fungo *P. chlamydosporia* é um Ascomycota pertencente a ordem Hypocreales (Batista e Fonsêca, 1965) e, além de saprófito, esse fungo tem a habilidade nematófaga, ou seja, utilizar nematoides como fonte de nutrição (Bordallo et al., 2002). Esse fungo parasita ovos de nematoides por meio da liberação de enzimas como protease, quitinase e lipase (Mi et al., 2010; Segers et al., 1994; Tikhonov et al., 2002) que permitem seu acesso ao interior dos ovos e a absorção de nutrientes presentes nas células embriogênicas (Escudero e Lopez-Llorca, 2012).

O relato da infectividade de *P. chlamydosporia* sobre nematoides ocorreu em 1974, quando foi observado a presença do fungo em solo supressivo ao *Heterodera avenae* (Kerry and Crump, 1977). Posteriormente a isso, estudos demonstraram a não seletividade de *P. chlamydosporia*, parasitando ovos de diversas espécies de NPPs do gênero *Globodera*, *Meloidogyne*, *Nacobbus* e *Rotylenchulus* (Morgan-Jones et al., 1981; Pérez-Rodríguez et al., 2007; Tikhonov et al., 2002; Wang et al., 2005). Também há relatos desse fungo reduzindo a população no solo de *Pratylenchus*, *Radopholus similis* e *Helicotylenchus* (Freitas et al., 2009). De acordo com diversos estudos sobre eficiência de biocontrole de NPPs por *P. chlamydosporia*, a capacidade de redução da população desses patógenos vegetais em culturas de importância econômica varia de 34 a 78% (Medina-Canales et al., 2019; Silva et al., 2017). Ademais, recentemente, foi evidenciado que *P. chlamydosporia* atua de forma indireta no controle de RKN, auxiliando as plantas na expressão de diferença genes de defesa e melhorias das respostas bioquímicas por meio da via do ácido salicílico, ácido jasmônico e etileno (Ghahremani et al., 2019; Medeiros et al., 2015).

2.2.1 Endofitismo

Pochonia chlamydosporia é um fungo habitante natural de solo, sendo encontrado em maior quantidade na rizosfera (Kerry, 2000) e associado epifiticamente às raízes (Monteiro et al., 2018). No entanto, em 2002, Bordallo et al., notificaram a colonização endofítica em raízes de tomateiro e cevada ao utilizarem corante e microscopia de luz em campo claro. Posteriormente a isso, a transformação genética de isolados de *P. chlamydosporia* com o gene

da proteína fluorescente verde (GFP) confirmou o hábito endofítico e possibilitou o uso de técnicas mais sofisticadas, como a microscopia de confocal a laser (Escudero and Lopez-Llorca, 2012; Maciá-Vicente et al., 2009). O hábito endofítico de *P. chlamydosporia* proporciona a esse fungo a vantagem de estar no mesmo local que os NPPs, dentro das raízes, e não está sujeito a competição com outros microrganismos no solo (Stirling, 2011). *Pochonia chlamydosporia*, ao colonizar endofiticamente culturas de importância agrônômica, pode melhorar o desempenho dessas culturas por meio da contribuição na aquisição de nutrientes (Monteiro et al., 2018), promover o crescimento vegetal (Larriba et al., 2015) e atuar como indutor de resistência a patógenos (Ciancio et al., 2017).

2.2.2 Expressão diferencial de gene e atividade de enzimas de defesa do hospedeiro desencadeadas por *Pochonia chlamydosporia*

Como esperado, ao colonizar endofiticamente em raízes de plantas, *P. chlamydosporia* induz diversas alterações no hospedeiro, como já relatado em estudos transcriptômicos e de expressão diferencial de genes (Larriba et al., 2015, 2014; Rosso et al., 2011; Zavala-Gonzalez et al., 2017). Dentre os transcritos da planta hospedeira que são expressos diferencialmente durante a fase endofítica de *P. chlamydosporia*, pode-se citar os genes relacionados a defesa (Ciancio et al., 2017), como as vias de defesa do triptofano, fenilpropanoides, ácido salicílico, ácido jasmônico, etileno e ácido giberélico, por exemplo (Larriba et al., 2015). Com a colonização de *P. chlamydosporia* em raízes de cevada, aumenta a expressão do gene *HSI* (proteína de resistência a nematoides) (Larriba et al., 2014), sendo essa atividade de *P. chlamydosporia* sobre seu hospedeiro vegetal podendo auxiliar na resistência à infecção por NPPs. Desse modo, ao estudar a interação *P. chlamydosporia*-planta-NPPs, foi evidenciado que a colonização endofítica de *P. chlamydosporia* auxilia a planta a responder de forma significativamente mais forte à infecção por nematoides, uma vez que planta que hospeda o fungo, durante a infecção por *Meloidogyne*, tem alta expressão dos genes *PR-1* (gene da proteína de resistência 1) e *LoxD* (lipoxigenase), que são genes relacionados a proteínas com atividade na vias de defesa dependentes do ácido salicílico e ácido jasmônico (Ghahremani et al., 2019).

Medeiros et al. (2015), ao comparar a atividade das enzimas fenilalanina amônia-liase (FAL), peroxidases (POX) e polifenoloxidase (PPO) em plantas de tomateiro tratadas com *P. chlamydosporia* e plantas com ausência do fungo, observou que as plantas inoculadas tinham maior atividade de POX nas primeiras horas após a infestação do solo com *M. javanica* e que

PPO tinha alta atividade durante todo os períodos avaliados (24, 96 e 168h após a infestação). A enzima POX está envolvida na polimerização de compostos fenólicos e, por consequência, maior lignificação dos tecidos (Chittoor et al., 1999). Assim, alta atividade de POX pode dificultar a penetração do nematoide no tecido radicular do hospedeiro. Já a PPO, atua na oxidação de compostos fenólicos a quinona, molécula tóxica aos nematoides, o que pode afetar a penetração e mobilidade dos nematoides nos tecidos (Wuyts et al., 2006). Assim, além de detectar a expressão diferencial de genes de defesa, já é sabido também que há maior atividade de enzimas de defesa, que contribui com a resposta imune de defesa do hospedeiro. Desse modo, avaliar a expressão e atividade de genes e enzimas, respectivamente, para outros patossistemas que envolvem *P. chlamydosporia* e outros nematoides, como *P. brachyurus*, pode explicar as vias alternativas de biocontrole e elaborar métodos que favoreçam a interação planta-fungo nematófago contra o RLN.

2.2.3 Regulação das vias bioquímicas de defesa do hospedeiro desencadeado por *Pochonia chlamydosporia*

Os hormônios vegetais são importantes reguladores do desenvolvimento e das rotas de sinalização, como resposta ao estresse biótico e abiótico, por exemplo (Bari e Jones, 2009). São conhecidos diversos hormônios produzidos pelas plantas, como as auxinas, giberelinas, ácido abscísico, citocininas, brassinosteroides, peptídeos hormonais, ácido salicílico (*'salicylic acid'* - SA), etileno (ET) e ácido jasmônico (*'jasmonic acid'* - JA). No entanto, o SA, ET e JA são os mais estudados na interação planta-patógenos, uma vez que já é conhecida a importância desses hormônios na regulação de vias de resposta de defesa das plantas (Balbi e Devoto, 2008; Broekaert et al., 2006; Loake e Grant, 2007).

O SA é conhecido por atuar na sinalização de resposta de defesa imune a diversos patógenos, principalmente contra patógenos biotróficos, por meio da resistência sistêmica adquirida (*'Systemic acquired resistance'* - SAR) (Vasyukova e Ozeretskoykaya, 2007). A percepção de padrões moleculares associados à patógenos (*'Pathogen associated molecular patterns'* - PAMPs) desencadeia a SAR, podendo essa ser conferida pelo acúmulo de proteínas relacionadas à patogênese (PR-1) e FAL (Ghahremani et al., 2019; Medeiros et al., 2015). Desse modo, a alta expressão do gene *PR1* e expressão/atividade de *FAL* são marcadores moleculares da SAR. No caso JA e ET, estão frequentemente relacionados à resposta à interação com microrganismos benéficos, injúrias e aos patógenos necrotróficos (Heil e Bostock, 2002). A liberação de enzimas de degradação de parede celular por esses organismos desencadeia a

resistência sistêmica induzida (*'Induced systemic resistance'* – ISR), sinalizada pelo acúmulo de JA e ET nos tecidos vegetais (Sato et al., 2019). A ativação de ISR leva a produção de inibidores de proteases que irão atuar sobre a atividade proteolítica das enzimas digestivas dos nematoides, evitando a infecção (Gheysen e Mitchum, 2019). Desse modo, para comprovar se a planta está respondendo à infecção por meio da ISR, pode-se avaliar o acúmulo de JA, ET e expressão de genes e atividade de enzimas ligadas a essa via, como a família das lipoxigenases (*LOX*), óxido de aleno sintase (*AOS*), aleno óxido ciclase (*AOC*) e os inibidores de proteases, visto que esses são produtos da via ISR.

Os NPPs modulam o metabolismo do SA, JA e ET para o sucesso do parasitismo (Gheysen e Mitchum, 2019). Plantas mutantes deficientes para esses hormônios são mais suscetíveis ao parasitismo de nematoides, sendo assim, ocorrendo maior penetração no tecido vegetal, maior tamanho de sítio de alimentação, maior tamanho de fêmeas e maior reprodução (Molinari et al., 2014). No entanto, como relatado anteriormente, o hábito endofítico de *P. chlamydosporia* pode auxiliar as plantas em resposta contra nematoides, aumentando a atividade de intermediários das vias SAR e ISR (Ghahremani et al., 2019; Medeiros et al., 2015).

2.3. *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis é uma bactéria gram-positiva, formato bastonete, formadora de esporos e de inclusões cristalinas e patogênica a insetos (Glare e O'Callaghan, 2000). A primeira descrição dessa bactéria ocorreu no Japão em 1901, causando prejuízos na produção de seda, por estar associada a larvas de bicho-da-seda (*Bombyx mori*), sendo, nessa época, denominada *Bacillus sotto* (Siegel, 2000). Após dez anos, a mesma bactéria foi isolada de mariposas na cidade de Turíngia-Alemanha, porém foi denominada como *B. thuringiensis*, em homenagem a cidade onde foi isolada, e é o nome utilizado até a atualidade (Barjac e Bonnefoi, 1968).

O primeiro relato do uso de *B. thuringiensis* como organismos de biocontrole ocorreu em 1927, com o intuito de reduzir a *Ostrinia nubilalis*, um inseto lepidóptero quarentenário no Brasil (Beegle e Yamamoto, 1992). Posteriormente a isso, formulações foram comercializadas para aplicação direta sobre a superfície de folhas ou em outras partes da planta com o intuito de controlar Culicidae, Coleoptera, Simuliidae, Hymenoptera, Homoptera, Mallophaga e outros (Bravo et al., 2007; Sanchis, 2012). Um marco do uso de *B. thuringiensis* para o controle de pragas, veio por meio da engenharia genética, em que genes da bactéria foram inseridos no

genoma de plantas de importância econômica – algodão, milho e soja - a fim de conferir resistência a insetos. A primeira comercialização de plantas geneticamente modificadas com genes *Cry* e *Vip* de *B. thuringiensis* (plantas Bt) ocorreu em 1996 e, atualmente, estima-se que a área de plantio com plantas Bt abrange mais de 178 milhões de hectares distribuídos em 28 países (James, 2015).

O potencial nematicida de *B. thuringiensis* já é conhecido, sendo o primeiro relato de redução da população de RKN feito em 1972 (Prasad et al., 1972). Atualmente, *B. thuringiensis* está relacionado a redução da população de *M. javanica*, *M. incognita*, *M. hapla*, *Bursaphelenchus xylophilus*, *Pratylenchus penetrans* e a *Heterodera glycines* (Cheng et al., 2018; Kahn et al., 2021; Khyami-Horani e Al-Banna, 2006; Verduzco-Rosas et al., 2021; Zuckerman et al., 1992). Além de metabólitos (turingiensina, quitinase e metaloproteinasas), membros das famílias das proteínas cristais Cry5, Cry6, Cry12, Cry13, Cry14, Cry21 e Cry55 são produzidos por *B. thuringiensis* e tem atividade nematicida já conhecida (Bel et al., 2022; Horak et al., 2019). Mais recentemente, foi relatado a expressão do gene que codifica para a proteína Cry14AB em plantas de soja transgênica, conferindo resistência a *H. glycines* em condições de casa de vegetação e de campo (Kahn et al., 2021). Além de controlar insetos e NPPs, há relatos *B. thuringiensis* associando-se endofiticamente e promovendo o crescimento de plantas (Azizoglu, 2019; Praça et al., 2012; Siddiqui et al., 2016).

2.3.1 Proteínas Cry e modo de ação

As proteínas Cry de *B. thuringiensis* são classificadas em grupos filogeneticamente não relacionados, os grupos são: 3d-Cry, Bin-like Cry, Mtx-like Cry e Outras toxinas Cry (Crickmore et al., 2016). Essas proteínas são produzidas durante a esporulação de *B. thuringiensis* e podem ter propriedades inseticidas e nematicidas (Fiuza et al., 2017). Em meio de cultivo, durante a fase estacionária, ocorre a esporulação, fase em que ocorre grande produção de protoxinas, que são responsáveis pela mortalidade de insetos e nematoides. Após o período de esporulação, as células bacterianas sofrem lise celular, esporos e as inclusões são liberados (Aronson, 2002; Yang e Wang, 1998).

Os insetos ingerem as proteínas Cry, essas são dissolvidas no intestino médio liberando protoxinas. As protoxinas sofrem com a ação de proteases intestinais, levando a clivagem e liberação dos fragmentos tóxicos aos insetos. Esses fragmentos tóxicos de tamanho menor passam pelas membranas peritróficas e ligam-se a receptores específicos no intestino médio e levam a abertura de poros, acarretando o desequilíbrio de transporte de íons e água, ocasionado

a lise celular, septicemia e morte (Glare e O'Callaghan, 2000). Para nematoides, tanto de vida livre quanto NPPs, apesar do mecanismo de ação não está bem estabelecido, quando estimulado a sua alimentação em ambiente com a presença de proteínas Cry, foi observado a proteína no esôfago e no intestino e danos no intestino, semelhante ao que ocorre com insetos (Kahn et al., 2021; Wan et al., 2019; Wei et al., 2003).

Outro mecanismo de ação de *B. thuringiensis*, revelado por análise transcriptômica, é a indução à resistência sistêmica. Plantas tratadas com filtrado bacteriano de *B. thuringiensis*, livre de célula, induziu a expressão de genes responsivos à via de defesa do ácido salicílico e a etileno, suprimindo *Ralstonia solanacearum* em tomateiro (Hyakumachi et al., 2013; Takahashi et al., 2013). Tais resultados instigam estudos relacionados ao controle de NPPs, a fim de desvendar mecanismos alternativos não diretos de controle da população de nematoides em culturas de importância agrícola.

3. HIPÓTESES

- O isolado Pc10 de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* reduz a população de *P. brachyurus* em raízes de soja.
- *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* interfere nas vias bioquímicas de defesa em plantas de soja modulando a expressão de genes relacionados à defesa, produção de hormônios e compostos fenólicos nos tecidos radiculares.
- *P. chlamydosporia* endofítica em raízes de soja infectadas por *P. brachyurus* interfere na expressão de genes relacionados à defesa, produção de hormônios e compostos fenólicos em tecidos radiculares de soja, afetando negativamente a população do nematoide fitopatogênico.
- Os isolados T03, T13, Br58 e M51 de *B. thuringiensis* são capazes de reduzir a população de *M. javanica*, *H. glycines* e *P. brachyurus* em raízes de soja.
- Metabólitos dos isolados T03, Br58 e M51 de *B. thuringiensis* são capazes de inibir a eclosão e causar mortalidade de J2 de *M. javanica* e de reduzir a população *H. glycines* e *P. brachyurus* em raízes de soja.
- Os isolados T03, Br58 e M51 de *B. thuringiensis* associam-se a plantas de soja, crescendo epifiticamente em suas raízes.
- O isolado M51 de *B. thuringiensis*, combinado com *M. javanica*, *H. glycines* ou *P. brachyurus*, interfere na expressão de genes relacionados à defesa e na concentração de compostos fenólicos nos tecidos radiculares da soja, afetando negativamente a população desses nematoides.

4. REFERÊNCIAS

- Abad, P., Williamson, V. M. (2010). Plant Nematode Interaction: A Sophisticated Dialogue. *Advances in Botanical Research*, 53(C), 147–192. [https://doi.org/10.1016/S0065-2296\(10\)53005-2](https://doi.org/10.1016/S0065-2296(10)53005-2).
- Aronson, A. (2002). Sporulation and delta-endotoxin synthesis by *Bacillus thuringiensis*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59(3), 417–425. <https://doi.org/10.1007/S00018-002-8434-6>.
- Azizoglu, U. (2019). *Bacillus thuringiensis* as a Biofertilizer and Biostimulator: a Mini-Review of the Little-Known Plant Growth-Promoting Properties of Bt. *Current Microbiology*, 76(11), 1379–1385. <https://doi.org/10.1007/S00284-019-01705-9>.
- Balbi, V., Devoto, A., (2008). Jasmonate signalling network in *Arabidopsis thaliana*: Crucial regulatory nodes and new physiological scenarios. *New Phytol.* 177, 301–318. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02292.x>.
- Baldwin, J.G., Nadler, S.A., Adams, B.J., (2004). Evolution of Plant Parasitism Among Nematodes. *Annual Review of Phytopathology.* 42, 83–105. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.42.012204.130804>.
- Bari, R., Jones, J.D.G., (2009). Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Molecular Biology.* 69, 473–488. <https://doi.org/10.1007/s11103-008-9435-0>.
- Barjac, H., Bonnefoi, A. (1968). A classification of strains of *Bacillus thuringiensis* Berliner with a key to their differentiation. *Journal of Invertebrate Pathology*, 11(3), 335–347. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(68\)90182-1](https://doi.org/10.1016/0022-2011(68)90182-1).
- Bartlem, D.G., Jones, M.G.K., Hammes, U.Z., (2013). Vascularization and nutrient delivery at root-knot nematode feeding sites in host roots. *Journal of Experimental Botany* . 65, 1789–1798. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert415>.
- Beegle, C. C., Yamamoto, T. (1992). History of *Bacillus thuringiensis* Berliner research and development. *The Canadian Entomologist*, 124(4), 587–616. <https://doi.org/10.4039/ENT124587-4>.
- Bel, Y., Galeano, M., Baños-Salmeron, M., Escriche, B. (2022). The use of *Bacillus thuringiensis* to control plant-parasitic nematodes More Information. *Journal of Plant Science and Phytopathology*, 062, 1–3. <https://doi.org/10.29328/journal.jpssp.1001076>.
- Bergeson, G.B., (1972). Concepts of nematode-Fungus associations in plant disease complexes: A review. *Experimental Parasitology.* 32, 301–314. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(72\)90037-9](https://doi.org/10.1016/0014-4894(72)90037-9).
- Bravo, A., Gill, S. S., Soberón, M. (2007). Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, 49(4), 423–435. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.11.022>.
- Broekaert, W.F., Delauré, S.L., De Bolle, M.F.C., Cammue, B.P.A. (2006). The Role of

Ethylene in Host-Pathogen Interactions. *Annual Review of Phytopathology*. 44, 393–416. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.070505.143440>.

Castillo, P., Volvas, N. (2007). *Pratylenchus* (Nematoda: Pratylenchidae); Diagnosis, Biology, Pathogenicity and Management. Nematology Monographs and Perspectives 6., Plant Pathology. Brill. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02097.x>.

Chen, S.Y., Dickson, D.W., 2004. Biological control of nematodes by fungal antagonists., in: Chen, Z.X., Chen, S.Y., Dickson, D.W. (Eds.), Nematology: Advances and Perspectives. Volume 2: Nematode Management and Utilization. CABI, pp. 979–1039. <https://doi.org/10.1079/9780851996462.0979>.

Cheng, C., Qin, J., Wu, C., Lei, M., Wang, Y., Zhang, L. (2018). Suppressing a plant-parasitic nematode with fungivorous behavior by fungal transformation of a Bt cry gene. *Microbial Cell Factories*, 17(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0960-5/figures/5>.

Chittoor, J.M., Leach, J.E., White, F.F. (1999). Induction of peroxidase during defense against pathogens, in: Datta, S.K., Muthukrishnan, S. (Eds.), Pathogenesis-Related Proteins in Plants. CRC Press LLC, pp. 173–195.

Ciancio, A., Pentimone, I., Colagiero, M., Rosso, L. (2017). Regulatory Factors in *Pochonia chlamydosporia*-Induced Gene Expression, in: Manzanilla-López, R.H., Lopez-Llorca, L. V. (Eds.), Perspectives in Sustainable Nematode Management Through *Pochonia Chlamydosporia* Applications for Root and Rhizosphere Health. Springer International Publishing, pp. 99–109. https://doi.org/10.1007/978-3-319-59224-4_5.

Costa, G. N. M., Souza, H. O. A., Maia, L. P., Martins, M. M., Bastos, L. M., Goulart, L. R., Ueira-Vieira, C. (2022). Differentiation of *Heterodera glycines* races by metabolomics. *Research Square*, 1–11. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2061880/v1>.

Davis, E.L., Hussey, R.S., Baum, T.J., Bakker, J., Schots, A., Rosso, M.-N., Abad, P. (2000). Nematode Parasitism Genes. *Annual Review of Phytopathology*. 38, 365–396. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.38.1.365>.

Decraemer, W., Hunt, D.J. (2013). Structure and classification., in: Plant Nematology. CABI, Wallingford, pp. 3–39. <https://doi.org/10.1079/9781780641515.0003>.

Dias, W. P., Garcia, A., Silva, J. F. v, Carneiro, G. E. S. (2010). Nematóides em Soja: Identificação e Controle. In *Circular Técnico - Embrapa* (Issue 76).

Dias, W. P., Silva, J. F. v, Carneiro, G. E. S., Garcia, A., Arias, C. A. A. (2009). Nematóide de Cisto da Soja: Biologia e Manejo Pelo Uso da Resistência Genética. *Nematologia Brasileira*, 1–16. https://nematologia.com.br/files/revnb/33_1.pdf.

Escudero, N., Lopez-Llorca, L. V. (2012). Effects on plant growth and root-knot nematode infection of an endophytic GFP transformant of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia*. *Symbiosis* 57, 33–42. <https://doi.org/10.1007/s13199-012-0173-3>.

Favery, B., Quentin, M., Jaubert-Possamai, S., Abad, P. (2016). Gall-forming root-knot nematodes hijack key plant cellular functions to induce multinucleate and hypertrophied

feeding cells. *Journal of Insect Physiology*, 84, 60–69. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2015.07.013>.

Ferraz, L.C.C.B., 2006. O nematóide *Pratylenchus brachyurus* e a soja sob plantio direto. *Rev. Plantio Direto* 23–27.

Ferraz, S., Freitas, L.G., Lopes, E., Dias-Arieira, C., 2013. Manejo Sustentável de Fitonematoides. Editora UFV, Viçosa, MG.

Fiuza, L. M., Polanczyk, R. A., Crickmore, N. (2017). *Bacillus thuringiensis* and *Lysinibacillus sphaericus*: Characterization and use in the field of biocontrol. In L. M. Fiuza, R. A. Polanczyk, N. Crickmore (Eds.), *Bacillus Thuringiensis and Lysinibacillus Sphaericus: Characterization and use in the Field of Biocontrol*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-56678-8/COVER>.

Fosu-Nyarko, J., Jones, M.G.K., (2016). Advances in Understanding the Molecular Mechanisms of Root Lesion Nematode Host Interactions. *Annual Review of Phytopathology*. 54, 253–278. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080615-100257>.

Franchini, J.C., Debiasi, H., Dias, W.P., Ramos Jr, E.U., Silva, J.F.V. (2014). Perda de produtividade da soja em área infestada por nematoide das lesões radiculares na região médio norte do Mato Grosso, in: BERNARDI, A.C.C., NAIME, J.M., RESENDE, A.V., BASSOI, L.H., INAMASU, R.Y. (Eds.), *Gricultura de Precisão: Resultados de Um Novo Olhar*. Embrapa, Brasília, pp. 274–278.

Freitas, L.G., Dallemole-Giaretta, R., Ferraz, S., Zooca, R.J.F., Podestá, G. (2009). Controle biológico de nematoides: Estudo de casos, in: Zambolim, L., Picanço M. (Eds.), *Controle Biológico de Pragas e Doenças – Exemplos Práticos*. Suprema Gráfica e Editora Ltda, São Carlos, pp. 41–82.

Ghahremani, Z., Escudero, N., Saus, E., Gabaldón, T., Sorribas, F.J. (2019). *Pochonia chlamydosporia* Induces Plant-Dependent Systemic Resistance to *Meloidogyne incognita*. *Frontiers in Plant Science*. 10, 945. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00945>.

Glare, T. R., O’Callaghan, Maureen. (2000). *Bacillus thuringiensis: biology, ecology, and safety*. John Wiley and Sons. Inc., New York, NY.

Haegeman, A., Mantelin, S., Jones, J.T., Gheysen, G. (2012). Functional roles of effectors of plant-parasitic nematodes. *Gene* 492, 19–31. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2011.10.040>.

Heil, M., Bostock, R.M. (2002). Induced Systemic Resistance (ISR) Against Pathogens in the Context of Induced Plant Defences. *Annals of Botany*. 89, 503–512. <https://doi.org/10.1093/aob>.

Hodda, M. (2022). Phylum Nematoda: a classification, catalogue and index of valid genera, with a census of valid species. *Zootaxa*, 5114 (1), 1–289. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.5114.1.1>.

Horak, I., Engelbrecht, G., van Rensburg, P. J. J., Claassens, S. (2019). Microbial metabolomics: essential definitions and the importance of cultivation conditions for utilizing

Bacillus species as bionematicides. *Journal of Applied Microbiology*, 127(2), 326–343. <https://doi.org/10.1111/JAM.14218>.

Hussey, R.S., (1989). Disease-Inducing Secretions of Plant-Parasitic Nematodes. *Annual Review of Phytopathology* 27, 123–164.

Hyakumachi, M., Nishimura, M., Arakawa, T., Asano, S., Yoshida, S., Tsushima, S., Takahashi, H. (2013). *Bacillus thuringiensis* Suppresses Bacterial wilt Disease Caused by *Ralstonia solanacearum* with Systemic Induction of Defense-Related Gene Expression in Tomato. *Microbes and Environments*, 28(1), 128–134. <https://doi.org/10.1264/JSME2.ME12162>.

Ikhonov, V.E., Lopez-Llorca, L. V., Salinas, J., Jansson, H.B. (2002). Purification and characterization of chitinases from the nematophagous fungi *Verticillium chlamyosporium* and *V. suchlasporium*. *Fungal Genetics and Biology*. 35, 67–78. <https://doi.org/10.1006/fgbi.2001.1312>.

Inomoto, M.M., 2009. Importância do manejo de *Pratylenchus brachyurus*, como manejar nematóides em soja. *Revista Plantio Direto* 108, 4–9.

Inomoto, M.M., 2011. Resistance evaluation of 12 maize hybrids to *Pratylenchus brachyurus*. *Trop. Plant Pathol.* 36, 308–312. <https://doi.org/10.1590/S1982-56762011000500006>.

James, C. (2015). *Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2011* (ISAAA brief N° 51, Vol. 43). <https://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/43/download/isaaa-brief-43-2011.pdf>.

Jones, J.T., Haegeman, A., Danchin, E.G.J., Gaur, H.S., Helder, J., Jones, M.G.K., Kikuchi, T., Manzanilla-López, R., Palomares-Rius, J.E., Wesemael, W.M.L., Perry, R.N. (2013). Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathology*. 14, 946–961. <https://doi.org/10.1111/mpp.12057>.

Jung, S.C., Martinez-Medina, A., Lopez-Raez, J.A., Pozo, M.J. (2012). Mycorrhiza-Induced Resistance and Priming of Plant Defenses. *Journal of Chemical Ecology*. 38, 651–664. <https://doi.org/10.1007/s10886-012-0134-6>.

Kahn, T. W., Duck, N. B., McCarville, M. T., Schouten, L. C., Schweri, K., Zaitseva, J., Daum, J. (2021). A *Bacillus thuringiensis* Cry protein controls soybean cyst nematode in transgenic soybean plants. *Nature Communications*, 12(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23743-3>.

Kerry, B.R. (2000). Rhizosphere Interactions and the Exploitation of Microbial Agents for the Biological Control of Plant-Parasitic Nematodes. *Annual Review of Phytopathology*. 38, 423–441. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.38.1.423>.

Kerry, B.R., Crump, D.H. (1977). Observations on fungal parasites of females and eggs of the cereal cyst-nematode, *Heterodera avenae*, and other cyst nematodes. *Nematologica* 23, 193–201. <https://doi.org/10.1163/187529277X00543>.

Khyami-Horani, H., Al-Banna, L. (2006). Efficacy of *Bacillus thuringiensis* jordanica against *Meloidogyne javanica* infecting tomato. *Phytopathologia Mediterranea*, 45(2), 153–157. <https://www.jstor.org/stable/26463251>.

Kikuchi, T., Eves-van den Akker, S., Jones, J.T. (2017). Genome Evolution of Plant-Parasitic Nematodes. *Annual Review of Phytopathology*. 55, 333–354. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080516-035434>.

Larriba, E., Jaime, M.D.L.A., Carbonell-Caballero, J., Conesa, A., Dopazo, J., Nislow, C., Martín-Nieto, J., Lopez-Llorca, L.V. (2014). Sequencing and functional analysis of the genome of a nematode egg-parasitic fungus, *Pochonia chlamydosporia*. *Fungal Genetics and Biology*. 65, 69–80. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.02.002>.

Larriba, E., Jaime, M.D.L.A., Nislow, C., Martín-Nieto, J., Lopez-Llorca, L.V. (2015). Endophytic colonization of barley (*Hordeum vulgare*) roots by the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* reveals plant growth promotion and a general defense and stress transcriptomic response. *J. Plant Res.* 128, 665–678. <https://doi.org/10.1007/s10265-015-0731-x>.

Lima, R. D., Ferraz, S., Santos, J. M. (1992). Ocorrência de *Heterodera* sp., em soja no Triângulo Mineiro. *Nematologia Brasileira*, 16, 101–102.

Liu, X. H., Li, J. Q., Zhang, D. S. (1997). History and status of soybean cyst nematode in China. *International Journal of Nematology*, 7(1), 18–25.

Loake, G., Grant, M., 2007. Salicylic acid in plant defence-the players and protagonists. *Current Opinion in Plant Biology* . 10, 466–472. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2007.08.008>.

Lordello, A. I. L., Lordello, R. R. A., Quaggio, J. A. (1992). Ocorrência do nematóide de cisto da soja (*Heterodera glycines*) no Brasil. *Brazilian Journal of Agriculture - Revista de Agricultura*, 67(3), 223–225.

Maciá-Vicente, J.G., Jansson, H.-B., Talbot, N.J., Lopez-Llorca, L. V. (2009). Real-time PCR quantification and live-cell imaging of endophytic colonization of barley (*Hordeum vulgare*) roots by *Fusarium equiseti* and *Pochonia chlamydosporia*. *New Phytologist*. 182, 213–228. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02743.x>.

Manzanilla-López, R.H., Lopez-Llorca, L. V. (Eds.). (2017). Perspectives in Sustainable Nematode Management Through *Pochonia chlamydosporia* Applications for Root and Rhizosphere Health, Perspectives in Sustainable Nematode Management Through *Pochonia chlamydosporia* Applications for Root and Rhizosphere Health. Springer International Publishing, Cham. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-59224-4>.

MAPA. (2022). Produtos Fitossanitários com uso Aprovado para a Agricultura Orgânica Registrados. Outubro de 2022. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons> Acesso em: 10 outubro 2022.

Medeiros, H.A. de, Resende, R.S., Ferreira, F.C., Freitas, L.G., Rodrigues, F.A. (2015). Induction of resistance in tomato against *Meloidogyne javanica* by *Pochonia chlamydosporia*.

Nematoda 2, e10015. <https://doi.org/10.4322/nematoda.10015>.

Medeiros, H.A., De Araújo Filho, J.V., De Freitas, L.G., 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, 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep40216>.

Medina-Canales, M.G., Terroba-Escalante, P., Manzanilla-López, R.H., Tovar-Soto, A. (2019). Assessment of three strategies for the management of *Meloidogyne arenaria* on carrot in Mexico using *Pochonia chlamydosporia* var. *mexicana* under greenhouse conditions. *Biocontrol Science and Technology*. 29, 671–685. <https://doi.org/10.1080/09583157.2019.1582267>.

Mejias, J., Truong, N. M., Abad, P., Favery, B., Quentin, M. (2019). Plant Proteins and Processes Targeted by Parasitic Nematode Effectors. *Frontiers in Plant Science*, 10, 970. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2019.00970/BIBTEX>.

Mi, Q., Yang, J., Ye, F., Gan, Z., Wu, C., Niu, X., Zou, C., Zhang, K.Q. (2010). Cloning and overexpression of *Pochonia chlamydosporia* chitinase gene pcchi44, a potential virulence factor in infection against nematodes. *Process Biochemistry*. 45, 810–814. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.01.022>.

Mitchum, M.G., Hussey, R.S., Baum, T.J., Wang, X., Elling, A.A., Wubben, M., Davis, E.L. (2013). Nematode effector proteins: An emerging paradigm of parasitism. *New Phytologist*. 199, 879–894. <https://doi.org/10.1111/nph.12323>.

Moens, Maurice, Perry, Roland N., Starr, James L. (2009). *Meloidogyne* species - a diverse group of novel and important plant parasites, in: Perry, R. N., Moens, M., Starr, J. L. (Eds.), *Root-Knot Nematodes*. *CABI Publishing*, pp. 1–17. <https://doi.org/10.1079/9781845934927.0001>.

Molinari, S., Fanelli, E., Leonetti, P. (2014). Expression of tomato salicylic acid (SA)-responsive pathogenesis-related genes in Mi -1- mediated and SA-induced resistance to root-knot nematodes. *Molecular Plant Pathology*. 15, 255–264. <https://doi.org/10.1111/mpp.12085>.

Monteiro, A. R., Morais, S. R. A. C. (1992). Ocorrência do nematoide de cisto da soja , *Heterodera glycines* ichinohe, 1952, prejudicando a cultura em mato grosso do sul. *Nematologia Brasileira*, 16(1–2), 101. <https://doi.org/10.2/JQUERY.MIN.JS>.

Monteiro, T.S.A., Balbino, H.M., de Mello, I.N.K., Coutinho, R.R., de Araújo, J. V., Freitas, L.G., (2020). *Duddingtonia flagrans* preying a plant parasitic nematode. *Brazilian J. Biol.* 80, 197–198. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.209748>.

Monteiro, T.S.A., Valadares, S.V., de Mello, I.N.K., Moreira, B.C., Kasuya, M.C.M., Araújo, J.V., de Freitas, L.G. (2018). Nematophagus fungi increasing phosphorus uptake and promoting plant growth. *Biological Control* 123, 71–75. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.05.003>.

Morgan-Jones, G., Godoy, G., Rodriguez-Kabana, R. (1981). *Verticillium chlamydosporium*, Fungal Parasite of *Meloidogyne arenaria* Females. *Nematropica* 11, 115–120.

- Niblack, T. L., Lambert, K. N., Tylka, G. L. (2006). A Model Plant Pathogen from the Kingdom Animalia: *Heterodera glycines*, the Soybean Cyst Nematode. *Annual Review of Phytopathology*, 44, 283–303. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.040204.140218>.
- Nicol, J.M., Turner, S.J., Coyne, D.L., Nijs, L. den, Hockland, S., Maafi, Z.T. (2011). Current Nematode Threats to World Agriculture, in: Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions. *Springer Netherlands*, pp. 21–43. https://doi.org/10.1007/978-94-007-0434-3_2.
- Pérez-Rodríguez, I., Doroteo-Mendoza, A., Franco-Navarro, F., Santiago-Santiago, V., Montero-Pineda, A. (2007). Isolates of *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* from Mexico, as potential biological control agents of *Nacobbus aberrans*. *Nematopica* 37, 127–140.
- Praça, L. B., Gomes, A. C. M. M., Cabral, G., Martins, É. S., Sujii, E. R., Monnerat, R. G. (2012). Endophytic Colonization by Brazilian Strains of *Bacillus thuringiensis* on Cabbage Seedlings Grown in Vitro. *Bt Research*, 3(3), 11–19. <https://doi.org/10.5376/bt.2012.03.0003>.
- Prasad, S. S. S. V., Tilak, K. V. B. R., Gollakota, K. G. (1972). Role of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* on the larval survivability and egg hatching of *Meloidogyne* spp., the causative agent of root knot disease. *Journal of Invertebrate Pathology*, 377–378. <https://doi.org/10.3/jquery-ui.js>.
- Quentin, M., Abad, P., Favery, B. (2013). Plant parasitic nematode effectors target host defense and nuclear functions to establish feeding cells. *Frontiers in Plant Science*, 4(MAR), 53. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2013.00053/BIBTEX>.
- Rosso, L.C., Finetti-Sialer, M.M., Hirsch, P.R., Ciancio, A., Kerry, B.R., Clark, I.M. (2011). Transcriptome analysis shows differential gene expression in the saprotrophic to parasitic transition of *Pochonia chlamydosporia*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 90, 1981–1994. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3282-7>.
- Sanchis, V. (2012). Genetic improvement of bt strains and development of novel biopesticides. *Bacillus Thuringiensis Biotechnology*, 9789400730212, 215–228. https://doi.org/10.1007/978-94-007-3021-2_12/cover.
- Santos, M.C. V., Abrantes, I., Curtis, R.H.C., 2017. Priming Plant Defence Responses Can Enhance the Biological Control of *Pochonia chlamydosporia* Against Root-Knot Nematodes, in: Manzanilla-LópezLuis, R.H., Lopez-Llorca, V. (Eds.), Perspectives in Sustainable Nematode Management Through *Pochonia chlamydosporia* Applications for Root and Rhizosphere Health. *Springer International Publishing*, pp. 295–309. https://doi.org/10.1007/978-3-319-59224-4_14.
- Segers, R., Butt, T.M., Kerry, B.R., Peberdy, J.F. (1994). The nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* produces a chymoelastase-like protease which hydrolyses host nematode proteins in situ. *Microbiology* 140, 2715–2723. <https://doi.org/10.1099/00221287-140-10-2715>.
- Siddique, S., Grundler, F.M.W. (2018). Parasitic nematodes manipulate plant development to establish feeding sites. *Curr. Opin. Microbiology*. 46, 102–108.

<https://doi.org/10.1016/j.mib.2018.09.004>.

Siddiqui, Z. A., Sayeed, M., Qi, J., Aiuchi, D., Tani, M., Asano, S.-I., Koike, M. (2016). Potential of Entomopathogenic *Bacillus thuringiensis* as Plant Growth Promoting Rhizobacteria and Biological Control Agents for Tomato *Fusarium Wilt*. *International Journal of Environmental & Agriculture Research*, 2(6), 55–63.

Siegel, J. P. (2000). Bacteria. In L. L. Lacey H. K. Kaya (Eds.), *Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*. Kluwer Academic Publishers, pp. 209–230. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-017-1547-8_8.

Silva, S.D., Carneiro, R.M.D.G., Faria, M., Souza, D.A., Monnerat R.G., Lopes, R. (2017). Evaluation of *Pochonia chlamydosporia* and *Purpureocillium lilacinum* for Suppression of *Meloidogyne enterolobii* on Tomato and Banana. *Journal of Nematology*. 49, 77–85. <https://doi.org/10.21307/jofnem-2017-047>.

Smant, G., Helder, J., Goverse, A. (2018). Parallel adaptations and common host cell responses enabling feeding of obligate and facultative plant parasitic nematodes. *The Plant Journal*. 93, 686–702. <https://doi.org/10.1111/tpj.13811>.

Stirling, G.R. (1993). Biological Control of Plant Parasitic Nematodes: Progress, Problems and Prospects, in: Meyer, S.L.F. (Ed.), *Environmental Entomology*. Oxford Academic, pp. 881–882. <https://doi.org/10.1093/EE/22.4.881>.

Stirling, G.R., 2011. Biological Control of Plant-Parasitic Nematodes: An Ecological Perspective, a Review of Progress and Opportunities for Further Research, in: Davies, K., Spiegel, Y. (Eds.), *Biological Control of Plant-Parasitic Nematodes*: Springer Netherlands, London, pp. 1–38. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9648-8_1.

Subedi, P., Gattoni, K., Liu, W., Lawrence, K.S., Park, S.W. (2020). Current utility of plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents towards plant-parasitic nematodes. *Plants* 9, 1–19. <https://doi.org/10.3390/plants9091167>.

Takahashi, H., Nakaho, K., Ishihara, T., Ando, S., Wada, T., Kanayama, Y., Asano, S., Yoshida, S., Tsushima, S., Hyakumachi, M. (2014). Transcriptional profile of tomato roots exhibiting *Bacillus thuringiensis*-induced resistance to *Ralstonia solanacearum*. *Plant Cell Reports* 33:1, 33(1), 99–110. <https://doi.org/10.1007/S00299-013-1515-1>.

Taylor, C.E., Robertson, W.M. (1975). Acquisition, Retention and Transmission of Viruses by Nematodes, in: Lamberti, F., Taylor, C.E., Seinhorst, J.W. (Eds.), *Nematode Vectors of Plant Viruses*. Springer US, pp. 253–276. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-0841-6_17.

Tian, B., Yang, J., Zhang, K.-Q. (2007). Bacteria used in the biological control of plant-parasitic nematodes: populations, mechanisms of action, and future prospects. *Federation of European Microbiological Societies* 61, 197–213. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00349.x>.

Vasyukova, N.I., Ozeretskoykaya, O.L. (2007). Induced plant resistance and salicylic acid: A review. *Appl. Biochem. Microbiol.* 43, 367–373. <https://doi.org/10.1134/S0003683807040011>.

Vedoveto, M.V. V., Dias-Arieira, C.R., Rodrigues, D.B., Arieira, J.O., Roldi, M., Severino, J.J.

(2013). Green manure in the management of *Pratylenchus brachyurus* in soybean. *Nematropica* 43, 226–232.

Verduzco-Rosas, L. A., García-Suárez, R., López-Tlacomulco, J. J., Ibarra, J. E. (2021). Selection and characterization of two *Bacillus thuringiensis* strains showing nematicidal activity against *Caenorhabditis elegans* and *Meloidogyne incognita*. *FEMS Microbiology Letters*, 368(5). <https://doi.org/10.1093/femsle/fnaa186>.

Vieira, P., Gleason, C. (2019). Plant-parasitic nematode effectors — insights into their diversity and new tools for their identification. *Current Opinion in Plant Biology*, 50, 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2019.02.007>.

Vos, C., Schouteden, N., van Tuinen, D., Chatagnier, O., Elsen, A., De Waele, D., Panis, B., Gianinazzi-Pearson, V. (2013). Mycorrhiza-induced resistance against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* involves priming of defense gene responses in tomato. *Soil Biology and Biochemistry*. 60, 45–54. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.01.013>.

Vos, C., Van Den Broucke, D., Lombi, F.M., De Waele, D., Elsen, A. (2012). Mycorrhiza-induced resistance in banana acts on nematode host location and penetration. *Soil Biology and Biochemistry*. 47, 60–66. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.12.027>.

Wan, L., Lin, J., Du, H., Zhang, Y., Bravo, A., Soberón, M., Sun, M., Peng, D. (2019). *Bacillus thuringiensis* targets the host intestinal epithelial junctions for successful infection of *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Microbiology*, 21(3), 1086–1098. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14528>.

Wang, K., Riggs, R.D., Crippen, D. (2005). Isolation, selection, and efficacy of *Pochonia chlamydosporia* for control of *Rotylenchulus reniformis* on cotton. *Phytopathology* 95, 890–893. <https://doi.org/10.1094/PHTO-95-0890>.

Wei, J. Z., Hale, K., Carta, L., Platzer, E., Wong, C., Fang, S. C., Aroian, R. V. (2003). *Bacillus thuringiensis* crystal proteins that target nematodes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(5), 2760–2765. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0538072100>.

Wuyts, N., Swennen, R., De Waele, D. (2006). Effects of plant phenylpropanoid pathway products and selected terpenoids and alkaloids on the behaviour of the plant-parasitic nematodes *Radopholus similis*, *Pratylenchus penetrans* and *Meloidogyne incognita*. *Nematology* 8, 89–101. <https://doi.org/10.1163/156854106776179953>.

Yang, X.-M., Wang, S. S. (1998). Development of *Bacillus thuringiensis* fermentation and process control from a practical perspective. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 28(2), 95–98. <https://doi.org/10.1111/J.1470-8744.1998.TB00517.X>.

Yang, Z., Yu, Z., Lei, L., Xia, Z., Shao, L., Zhang, K., Li, G. (2012). Nematicidal effect of volatiles produced by *Trichoderma* sp. *Journal of Asia-Pacific Entomology*. 15, 647–650. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2012.08.002>.

Zavala-Gonzalez, E. A., Rodríguez-Cazorla, E., Escudero, N., Aranda-Martinez, A., Martínez-Laborda, A., Ramírez-Lepe, M., ... & Lopez-Llorca, L. V. (2017). *Arabidopsis thaliana* root

colonization by the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* is modulated by jasmonate signaling and leads to accelerated flowering and improved yield. *New Phytologist*, 213(1), 351-364.

Zuckerman, B. M., Dicklow, M. B., Acosta, N. (1992). A Strain of *Bacillus thuringiensis* for the Control of Plant-parasitic Nematodes. *Biocontrol Science and Technology*, 3(1), 41–46. <https://doi.org/10.1080/09583159309355257.3>

CAPÍTULO 1

Pochonia chlamydosporia* modifica a expressão de genes de defesa em soja e promove o biocontrole de *Pratylenchus brachyurus

RESUMO

A soja é uma cultura de grande importância econômica no mundo e o Brasil é o maior produtor na atualidade. A produção de grãos de soja é afetada por diversos patógenos e pragas, entre os quais se destacam os nematoides parasitas de plantas. O manejo de nematoides se faz pelo uso de cultivares resistentes, de nematicidas químicos e de rotação de culturas. Não existem no mercado cultivares resistentes ao nematoide das lesões radiculares, *Pratylenchus brachyurus*, assim como há poucas alternativas para a rotação de culturas. Sendo assim, o uso de antagonistas no controle biológico surge como uma alternativa para reduzir a população desse patógeno de forma mais sustentável. Neste estudo, o objetivo foi investigar a habilidade de *Pochonia chlamydosporia* em reduzir a população de *P. brachyurus* em soja e determinar as modificações no metabolismo secundário – por expressão diferencial de genes e produção de compostos secundários – de plantas infectadas por *P. chlamydosporia*, por *P. brachyurus* e pela combinação dos dois organismos, a fim de determinar se ocorre indução à resistência. Para isso, foram avaliadas a penetração e a reprodução dos nematoides em plantas de soja ao longo do tempo com e sem *P. chlamydosporia*. Posteriormente, foi quantificada a expressão diferencial de genes relacionados às vias de defesa dependentes de ácido salicílico (SA) e de ácido jasmônico (JA), os hormônios SA, JA, etileno, ácido indol acético e ácido abscísico e a concentração de compostos fenólicos totais (CFT) e derivados de lignina-ácido tioglicólico (LATG). O fungo *P. chlamydosporia* não foi capaz de conter a penetração dos nematoides, porém, foi apto a controlar de forma significativa a população dos nematoides. A expressão de genes das vias de defesa revelou que a inoculação individual dos dois microrganismos ocasiona diversas modificações no metabolismo secundário e que ocorre a ativação das vias de defesas quando fungo e nematoide estão juntos na planta, o que pode explicar a redução da população de *P. brachyurus*. Assim, *P. chlamydosporia* reduz a população de *P. brachyurus* em plantas de soja e ativa nelas o mecanismo de defesa.

Palavras-chaves: Indução de resistência. Nematoide das lesões radiculares. Fungo nematófago. Ácido salicílico. Ácido jasmônico.

ABSTRACT

Soybean is a crop of great economic importance in the world and Brazil is currently the largest producer. The production of soybeans is affected by several pathogens and pests, among which plant parasitic nematodes stand out. Nematode management is done by using resistant cultivars, chemical nematicides and crop rotation. There are no cultivars on the market that are resistant to the root-lesion nematode, *Pratylenchus brachyurus*, and there are very few alternatives for crop rotation. Therefore, the use of antagonists in biological control appears an alternative to reduce the population of this pathogen in a more sustainable way. In this study, the objective was to investigate the ability of *Pochonia chlamydosporia* to reduce the population of *P. Brachyurus* in soybean and to determine the modifications in the secondary metabolism – by differential expression of genes and production of secondary compounds – of plants infected by *P. chlamydosporia*, by *P. brachyurus* and by the combination of both organisms, in order to determine whether induction of resistance occurs. For this, the penetration and reproduction of nematodes in soybean plants over time with and without *P. chlamydosporia* were evaluated. Subsequently, the differential expression of genes related to defense pathways dependent on salicylic acid (SA) and of jasmonic acid (JA), the hormones SA, JA, ethylene, indole acetic acid and abscisic acid and the concentration of total phenolic compounds (TPC) and lignin-thioglycolic acid derivatives (LTGA). *Pochonia chlamydosporia* was not able to contain penetration the nematodes, but was able to control the nematode population. The expression of defense pathway genes revealed that the individual inoculation of the two microorganisms causes several changes in secondary metabolism and that the activation of defense pathways occurs when fungus and nematode are together in the plant, which may explain the reduction in the population of *P. brachyurus*. Thus, *P. chlamydosporia* reduces the population of *P. brachyurus* in soybean plants and activates their defense mechanism.

Keywords: Induction of resistance. Root lesion nematode. Nematophagous fungus. Salicylic acid. Jasmonic acid.

1. INTRODUÇÃO

A soja é uma cultura de grande importância mundial, devido a sua utilização na alimentação humana, na produção de óleos e como fonte de farelo proteico para alimentação animal (Fearnside, 2001; Jia et al., 2020). Atualmente, o Brasil é o maior produtor e exportador de grãos de soja, produzindo 137,23 milhões de toneladas em 38,9 milhões de hectares (CONAB, 2021). Apesar disso, essa cultura sofre com a atividade antagonista de diversos organismos que oneram a produção (Rupe e Luttrell, 2008), entre os quais estão os nematoides parasitas de plantas (NPPs), responsáveis por perdas que podem chegar a 10,6% na produção mundial de soja (Silva et al., 2006). Esse prejuízo é reflexo da alta quantidade de espécies de nematoides que essa cultura pode hospedar – 100 espécies contabilizadas em 50 gêneros –, sendo os nematoides do gênero *Meloidogyne* e as espécies *Heterodera glycines*, *Pratylenchulus brachyurus* e *Rotylenchulus reniformis* as mais deletérias ao cultivo da soja, por causarem modificações morfológicas e fisiológicas severas em plantas infectadas, afetando negativamente a produção de grãos (Dias et al., 2010).

As espécies de *Pratylenchus* têm estilo de vida migrador, ou seja, após penetrarem no tecido radicular movimenta-se pelos tecidos, alimentando-se das células vegetais e ovipositando dentro e fora das raízes. Em todos os estádios de vida, do juvenil de primeiro estádio ao adulto, *Pratylenchus* é vermiforme e pode ser detectado tanto no solo como nas raízes (Castillo e Volvas, 2007). Além da ampla distribuição em campos de produção de soja no Brasil, a espécie *P. brachyurus* é agressiva à cultura da soja e tem causado crescentes prejuízos ao agronegócio brasileiro (Ferraz, 2006; Inomoto, 2011). As dificuldades de manejo somadas à ausência de cultivares resistentes faz aumentar a busca por agentes de controle biológico a fim de promover o manejo eficiente e sustentável desse fitopatógeno.

O controle biológico consiste na introdução artificial de antagonistas no ambiente ou no estímulo do desenvolvimento de microrganismos nativos, para reduzir a população de organismos indesejáveis (Baker e Cook, 1974). Esse método tem sido muito utilizado nos últimos anos devido ao aumento da disponibilidade de produtos comerciais no mercado (MAPA, 2022). Produtos à base de *Pochonia chlamydosporia* são utilizados em diferentes países (Hidalgo-Díaz et al., 2017) devido à eficiência desse agente de controle biológico. Esse fungo nematófago é relatado como parasita de ovos de diversos gêneros de nematoides endoparasitas sedentários e semi-endoparasitas (Manzanilla-López e López-Llorca, 2017), além de ter habilidade de associar-se endofiticamente aos tecidos radiculares (Bordallo et al.,

2002), ativar vias bioquímicas de defesa (Medeiros et al., 2015), melhorar a aquisição de nutrientes pelas plantas (Monteiro et al., 2018) e atuar no crescimento vegetal (Larriba et al., 2015).

Apesar do amplo conhecimento da interação de *P. chlamydosporia* com nematoides endoparasitas sedentários – nematoides que se tornam sésseis após o estabelecimento da infecção – pouco se sabe da ação desse fungo sobre nematoides endoparasitas migradores, como exemplo, o *P. brachyurus*. É documentada na literatura a redução da população de *P. brachyurus* quando na presença de *P. chlamydosporia* (Pacheco et al., 2020). Porém, vale lembrar, que a oviposição de *P. brachyurus* ocorre, comumente, dentro dos tecidos das raízes, o que poderia impedir a ação parasítica de *P. chlamydosporia* diretamente sobre ovos no solo, como ocorre para outros gêneros de nematoides. No entanto, foi proposto que o endofitismo de *P. chlamydosporia* pode contribuir para o manejo desses nematoides, por meio do parasitismo direto de ovos dentro do sistema radicular, pela produção de metabólitos tóxicos e/ou da indução de resistência (Manzanilla-López e López-Llorca, 2017).

A planta, ao perceber a presença de NPPs por meio do reconhecimento de PAMPs (*'Pathogen-associated molecular pattern'*) ou dos DAMPs (*'Damage-associated molecular patterns'*) por eles causados nos tecidos vegetais, desencadeia uma cascata de resposta de defesa a fim de impedir a infecção por esses patógenos (Henry et al., 2012). Entre essas repostas de defesa ocorre a ativação da resistência sistêmica adquirida (*'Systemic acquired resistance'* – SAR), resultando na síntese de fenilpropanoides, flavonoides, terpenoides, tirosina, hormônios e glicosinolatos (Dixon, 2001). O acúmulo da proteína Fenilalanina Amônia-liase (FAL), intermediário da rota dos fenil fenilpropanoides, como o ácido salicílico (*'Salicylic acid'* – SA), e/ou o acúmulo do produto final da via, a Proteína Relacionada à Patogênese (PR1), é indicativo de que está ocorrendo maior produção de compostos tóxicos aos nematoides, como espécies reativas de oxigênio (*'Reactive oxygen species'* – ROS), compostos fenólicos e, possivelmente, maior lignificação da parede celular, o que pode impedir ou dificultar a penetração desses NPPs (Wuyts et al., 2006). Essas repostas relacionadas à SAR são observadas em interações de micorrizas, fungos e bactérias com plantas, que estimulam respostas mais efetivas à infecção dos patógenos (Song et al., 2015; Medeiros et al., 2017).

A resistência sistêmica induzida (*'Induced systemic resistance'* – ISR) também é conhecida por atuar na defesa contra patógenos e está relacionada ao acúmulo de ácido

jasmônico (*'jasmonic acid'* – JA) e do etileno (ET) (Shoresh *et al.*, 2010). Fungos e bactérias podem contribuir para produção desses hormônios, intensificando as respostas de defesa vegetal para o controle de patógenos e insetos herbívoros (Shoresh *et al.*, 2010; Pieterse *et al.*, 2014). Esses mecanismos de indução à resistência são amplamente estudados em plantas infectadas por nematoides endoparasitas sedentários. No entanto, para o gênero *Pratylenchus* existem poucas informações sobre como esses nematoides modificam o metabolismo de seus hospedeiros. Por fim, torna-se interessante avaliar os intermediários da via do JA em plantas infectadas por nematoides na presença e na ausência de *P. chlamydosporia*, visto que o produto dessa rota há a produção de inibidores de proteases, que afetam a nutrição, o desenvolvimento e a reprodução dos nematoides (Ali *et al.*, 2017).

Deste modo, neste trabalho, investigamos a capacidade de um isolado de *P. chlamydosporia* em conter a penetração e a reprodução de *P. brachyurus* em raízes de soja. Posteriormente, avaliamos a expressão de genes relacionados à defesa pela via do SAR e ISR, a produção de metabólitos associados a defesa e quantificação de ácido salicílico, ácido jasmônico, ácido abscísico (ABA), ácido indolacético (IAA), etileno, compostos fenólicos totais (CFT) e derivados de lignina-ácido tioglicólico (LATG), na presença e na ausência do fungo e do nematoide. A partir disso, buscamos entender como as plantas respondem à presença endofítica de *P. chlamydosporia* e à infecção por *P. brachyurus* e, além disso, se a indução de resistência mediada por SA e JA estão relacionadas à redução da população de *P. brachyurus* em plantas de soja tratadas com *P. chlamydosporia*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção e preparo do inóculo de *Pratylenchus brachyurus*

A população pura de *P. brachyurus* (origem Goiás – Brasil) foi mantida em casa de vegetação em plantas de sorgo e soja. Para a obtenção dos espécimes dos nematoides para os ensaios experimentais, foi utilizada a técnica descrita por Hussey e Barker (1973), modificada por Boneti e Ferraz (1981). Posteriormente, com auxílio da câmara de Peters, foi calibrada a suspensão aquosa contendo nematoides.

2.2. Obtenção dos clamidósporos de *Pochonia chlamydosporia*

Para este experimento, foi utilizado o isolado Pc10 de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* do laboratório de Controle Biológico de Fitonematoides do Departamento de

Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa. O isolado fúngico foi cultivado em meio e de cultivo composto por arroz e água (3:1 m/v) por 21 dias, a 28 °C, no escuro, e os clamidósporos foram extraídos conforme descrito por Balbino et al., (2021) e calibrados em câmara de Neubauer.

2.3. Execução do experimento de controle biológico e indução de resistência

2.3.1 – Experimento de casa de vegetação

Uma mistura de latossolo vermelho-amarelo (solo arenoso – horizonte C) e areia lavada em uma proporção de 3:1 (V:V) (Franco-Arenosa) (Suplementar S1) foi esterilizada seguindo o protocolo descrito por Zauza et al. (2007). Posteriormente, vasos plásticos de 1000 cm³ (1L), preenchidos com substrato descrita anteriormente, receberam uma semente de soja cv. Conquista, que constituiu uma unidade experimental. . No momento da semeadura, 5000 clamidósporos de *P. chlamydosporia*.g⁻¹ de solo foram aplicados às unidades experimentais. Já a infestação do solo foi realizada 7 dias após a semeadura, com a aplicação de uma suspensão aquosa contendo 800 espécimes de *P. brachyurus*.. Os tratamentos foram: 1) Soja + *P. chlamydosporia* (Pc); 2) Soja + *P. brachyurus* (Pb) e 3) Soja + *P. chlamydosporia* + *P. brachyurus* (Pc + Pb). Como testemunha, foram utilizadas plantas de soja isentas de fungo e de nematoides. O experimento foi conduzido em casa vegetação com temperatura de 30°C ±2, por 60 dias e em delineamento inteiramente casualizado. Para as análises nematológicas, os tratamentos foram repetidos seis vezes. Para os demais testes bioquímicos e moleculares, os tratamentos foram repetidos três vezes, sendo cada repetição composta por três unidades experimentais.

2.3.2 – Quantificação das variáveis nematológicas

Para avaliar o efeito do isolado Pc10 de *P. chlamydosporia* sobre a população de *P. brachyurus*, foram mensuradas a penetração e a reprodução dos nematoides. Desse modo, para determinar a taxa penetração de *P. brachyurus*, foram coletadas raízes de soja dos tratamentos Pb e Pc + Pb, aos 7 e 15 dias após a infestação do solo (dai) com nematoides, e os nematoides presentes dentro do sistema radicular foram corados como descrito por Bybd (1983). Por fim, o número de *P. brachyurus* corados no sistema radicular foi determinado com o auxílio de um microscópio de luz.

A fim de determinar o sucesso da infecção por meio da reprodução, aos 30 e 60 dai, raízes de soja dos tratamentos Pb e Pc + Pb passaram pelo processo de extração de nematoides de Hussey e Barker (1973), modificada por Boneti e Ferraz (1981). A suspensão resultante foi usada para a contagem do número de nematoides totais no sistema radicular e este para o cálculo do fator de reprodução, conforme a fórmula 1.

$$\text{Fator de reprodução (FR)} = \frac{\text{Polulação final de } P. brachyurs}{\text{Polulação inicial de } P. brachyurs}$$

Em 7, 15, 30 e 60 dai, raízes das plantas testemunhas e dos tratamentos Pc, Pb e Pc + Pb foram coletadas, lavadas e secas rápida e cuidadosamente, congeladas em nitrogênio líquido e, por fim, armazenadas a -80 °C até o momento das análises bioquímicas e moleculares.

2.3.3 – Avaliação da regulação das vias hormonais

A extração dos fitohormônios foi conduzida com 200 mg de material vegetal macerado (raízes de soja mantidas a -80 °C) ao qual adicionou-se 400 µL de solução de metanol, isopropanol e ácido acético (20:79:1 v/v/v) e o método de extração ocorreu como descrito por Vital et al. (2019). Os metabólitos foram separados por cromatografia de ultraperformance do tipo UHPLC (Agilent) utilizando-se a coluna C18 (50 mm x 1,0 mm ID, partícula de 1,7 µm e 300 Å), acoplada on-line ao espectrômetro de massa triplo quádrupolo QqQ. O espectrômetro de massas foi operado no modo MRM (*Multiple reaction monitoring*) e a massa do íon precursor e seu respectivo fragmento foram monitorados para cada molécula: precursor do ácido abscísico (ABA) (263/153), ácido indol-3-acético (AIA) (176/130), ácido salicílico (SA) (137/93) e ácido jasmônico (JA) (209/59). Os dados foram analisados no Skyline e, com a obtenção do valor de área de cada pico, foi possível a quantificação absoluta utilizando-se a curva padrão de cada hormônio.

2.3.4 – Extração e quantificação de compostos fenólicos solúveis totais (CFT) e de derivados da lignina-ácido tioglicólico (LATG)

Para esse teste, foram pesados 100 mg de raízes e macerados em nitrogênio líquido por meio de moinho de bolas vibratórias e homogeneizado em 1 mL de solução aquosa de metanol a 80% (v/v), em microtubos de 1,5 mL. Posteriormente, os microtubos foram depositados em termomix e o extrato bruto foi agitado a 300 rpm a 25 °C por 12h e, em seguida, a mistura foi centrifugada a 13.000 × g por 30 min. A concentração de fenólicos solúveis totais (CFT) foi determinada no extrato metanólico e o pelete foi mantido a 20 °C para determinar a

concentração de LATG (Barber e Ride, 1988; Zieslin e bem-Zaken, 1993; Rodrigues et al., 2005; Fortunato et al., 2015).

2.3.5 – RT-qPCR de genes da soja relacionados a vias de defesa dependentes do ácido salicílico e do ácido jasmônico

Um total de 100 mg de tecido radicular da testemunha e dos tratamentos Pb, Pc e Pc + Pb, triturado a pó fino por meio de um moinho de bolas de vibração com nitrogênio líquido, foram utilizados para a extração de RNA. O RNA foi extraído com TRIzol (Invitrogen) e a contaminação de DNA foi removida com RQ1 Rnase-free Dnase (Promega). A qualidade e integridade do RNA foram verificadas por eletroforese em gel de agarose 1,2% e a quantidade de RNA foi medida em um fluorômetro Qubit usando Qubit RNA HS Assay Kit (Invitrogen, São Paulo, Brasil). Os cDNAs de fita simples foram sintetizados por transcrição reversa usando 5 µg de RNA total com primers oligo(dT) em um volume final de 20 µL usando o SuperScript First Strand Synthesis System para RT-PCR (Invitrogen®). O qRT-PCR foi realizado em um Bio-Rad CFX Real Time Thermal Cycler usando SYBR Green PCR Master Mix de acordo com as recomendações do fabricante. Todas as reações foram realizadas em duplicata e os valores de expressão relativos para cada gene estudado foram calculados usando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak e Schmittgen, 2001). Análise de expressão de genes que codificam para os genes Isochorismato sintase (*ICSI*), Chalcona isomerase (*CHAL*), Fenilalanina amônia-liase (*FAL*), Proteína relacionada à patogênese (*PRI*), Ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano oxidase (*ACO*), Ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano sintase (*ACS*), 12-Oxofitodienoato redutase-3 (*OPR3*), Inibidor da tripsina de Kunitz (*KTI*), Inibidores de serino de Bowman-Birk (*BBI*) e Lipoxigenase (*LOX*) foi realizado usando sequências de iniciadores específicos (Suplementar S2). O gene Ubiquitina (*UBIQ*) foi usado como referência para normalização conforme utilizado por Einhardt et al., (2020).

2.6 – Análise estatística

Todos os dados coletados foram submetidos ao teste de variância, ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk ($\alpha = 0,05$) (Shapiro e Wilk, 1965) e, posteriormente, à ANOVA. Para o teste penetração e reprodução, as médias foram comparadas pelo teste T de Student ($p < 0,05$), enquanto os dados dos demais teste bioquímicos e moleculares, após serem submetidos à ANOVA, foram comparados pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) e, para os dados não-paramétrico, foi aplicado o teste de Dunnett ($\alpha = 0,05$). As análises foram realizadas no programa estatístico

R 3.6.0. Com o auxílio do software MetaboAnalyst 5.0 (<http://www.metaboanalyst.ca>), os valores de expressão gênica foram analisados e foram criados os mapas de calor.

3. RESULTADOS

3.1 – Controle de *Pratylenchus brachyurus* por *Pochonia chlamydosporia*

O isolado Pc10 de *P. chlamydosporia* não foi capaz de conter a penetração de *P. brachyurus* no sistema radicular da soja aos 7 e 15 dai ($p \geq 0,05$) (Figura 1. A e B). Na avaliação da taxa de penetração de *P. brachyurus* em raízes de soja, aos 7 dai já havia nematoides nas raízes e a quantidade aumentou gradativamente ao longo dos tempos avaliados, porém não houve diferença entre o tratamento Pb e o tratamento Pc + Pb (Figura 1. A-D). Ademais, aos 15 dai, foi possível notar a presença de ovos dentro do sistema radicular da soja (Figura 1. E e F).

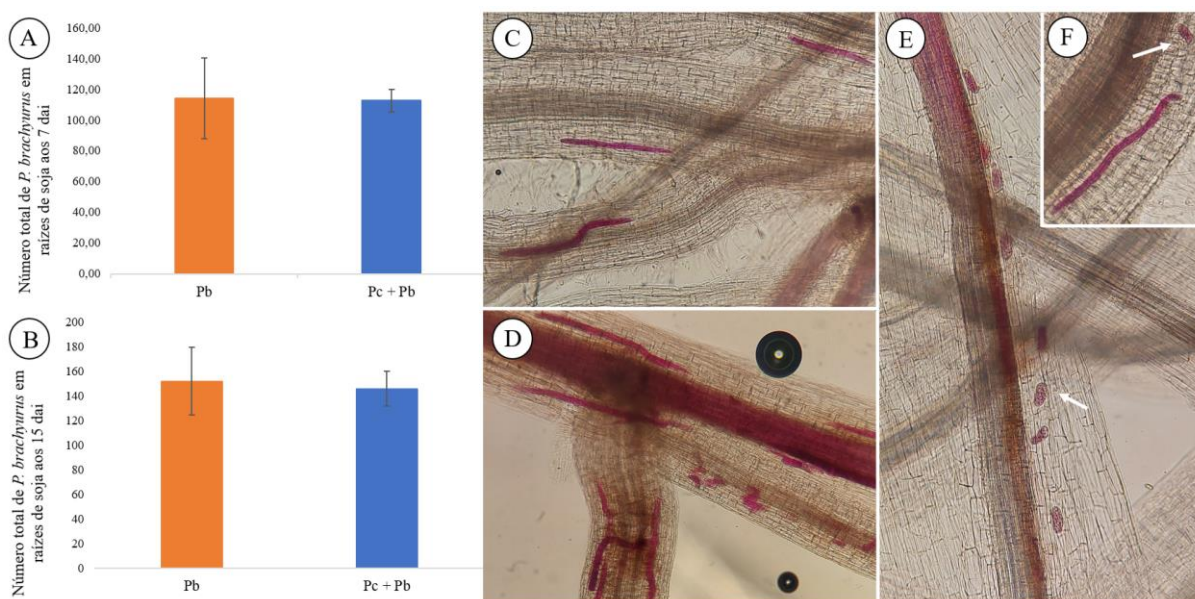


Figura 1 – Número de *P. brachyurus* em raízes de soja tratadas ou não com *P. chlamydosporia* aos 7 e 15 dias após a inoculação (dai) dos nematoides. Em A e C) número de *P. brachyurus* aos 7 dai; B e D) número de *P. brachyurus* aos 15 dai; E e F) ovos *P. brachyurus* aos 15 dai. Setas evidenciam ovos aos 15 dai. De acordo com o teste t, em A e B, asterisco indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$). As barras representam o desvio padrão ($n = 6$).

Quando avaliada a população *P. brachyurus* em raízes de soja, na presença ou ausência do fungo, aos 30 e 60 dai, foi observada a redução do número de espécimes em 25,02% e 41,84%, respectivamente ($p < 0,01$) (Figura 2). A presença de *P. chlamydosporia* reduziu significativamente o fator de reprodução (FR) de *P. brachyurus*, atrasando o crescimento populacional (Figura 3).

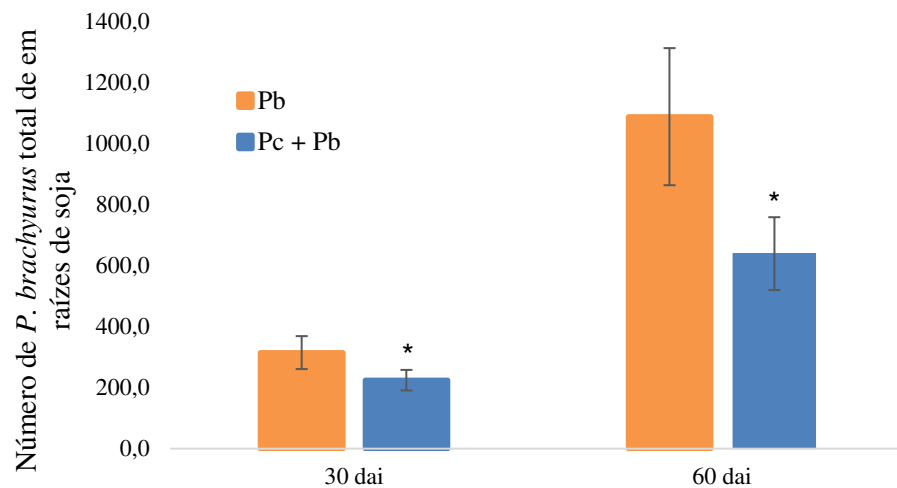


Figura 2 – Efeito de *Pochonia chlamydosporia* sobre a população de *P. brachyurus* em raízes de soja. As avaliações foram feitas aos 30 e 60 dias após a infestação (dai) do solo com nematoides em solo sem (Pb) ou com clamidósporos de *P. chlamydosporia* (Pc + Pb). De acordo com o teste t, asterisco indica diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,01$). As barras representam o desvio padrão ($n = 6$).

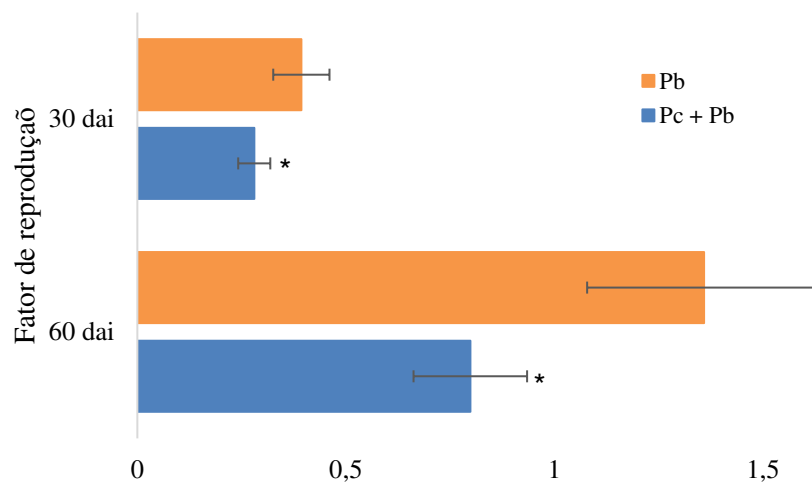


Figura 3 – Efeito de *Pochonia chlamydosporia* sobre o fator de reprodução de *P. brachyurus* em raízes de soja aos 30 e 60 dias após a inoculação (dai) dos nematoides. Pb correspondem a plantas que receberam apenas espécimes de *P. brachyurus* e Pc + Pb, a plantas tratadas com *P. chlamydosporia* e *P. brachyurus*. De acordo com o teste t, asterisco indica diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,01$). As barras representam o desvio padrão ($n = 6$).

3.2 – Concentrações de compostos fenólicos totais (CFT) e derivados de lignina-ácido tioglicólico (LATG)

A concentração de CFT não diferiu estatisticamente entre os tratamentos em 7, 15 e 60 dai. Porém, aos 30 dai, o tratamento que recebeu apenas nematoides (Pb) e o tratamento

nematoides e fungo (Pc + Pb) diferenciam-se do tratamento com apenas o fungo (Pc) e da testemunha ($p < 0,01$), sendo esses dois últimos diferentes um do outro (Figura 4). Em Pb, quando comparado à testemunha e a Pc, observou-se um aumento de 127,30 e 73,75% da produção de CFT, respectivamente. Já em Pc + Pb, as plantas produziram 131,07% a mais de CFT quando comprado à testemunha e 76,63% em relação ao Pc. Já as plantas do tratamento Pc produziram 34,08% a mais de CFT, quando comprado a plantas testemunhas.

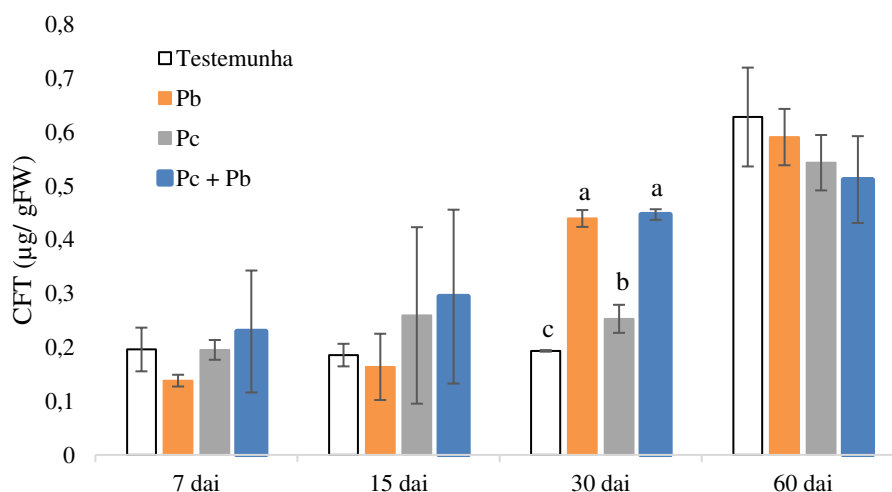


Figura 4 – Concentração de compostos fenólicos total (CFT) ao longo do tempo para a testemunha e para os tratamentos *Pratylenchus brachyurus* (Pb), *Pochonia chlamydosporia* (Pb) e combinação dos microrganismos (Pc + Pb). Colunas com a mesma letra não são estatisticamente diferentes pelo teste Tukey ($p < 0,05$). As barras representam o desvio padrão ($n = 3$).

Para a concentração de derivados LATG, houve diferença entre os tratamentos em 7, 15 e 30 dai ($p < 0,01$) (Figura 5). Aos 7 dai, Pc + Pb diferiu-se da testemunha, produzindo 56,40% a mais de LATG. Já aos 15 dai, Pc + Pb diferiu dos demais tratamentos, produzindo 48,72; 118,28 e 68,36% a mais de derivados LATG quando comparado à testemunha e aos tratamentos Pb e Pc, respectivamente ($p < 0,05$). Aos 30 dai, a concentração de derivados LATG em Pc + Pb foi maior quando comparado à testemunha e a Pc, em 117,71 e 149,21%, respectivamente ($p < 0,05$). Por fim, Pb, aos 30 dai foi diferente apenas de Pc, produzindo 132,32% a mais de derivados LATG.

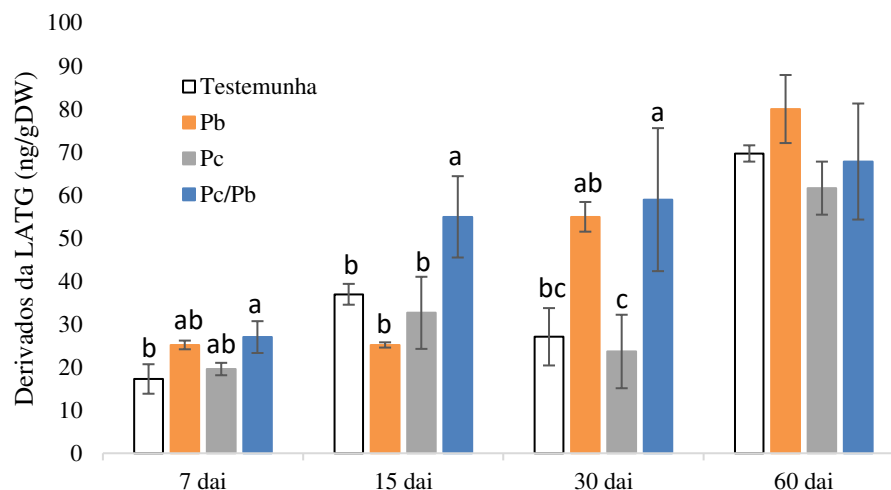


Figura 5 – Concentração de derivados de lignina-ácido tioglicólico (LATG) ao longo do tempo para a testemunha e para os tratamentos *Pratylenchus brachyurus* (Pb), *Pochonia chlamydosporia* (Pc) e combinação dos microrganismos (Pc + Pb). Colunas com a mesma letra não são estatisticamente diferentes pelo teste Tukey ($p < 0,05$). As barras representam o desvio padrão ($n = 3$).

3.3 – Quantificação de hormônios vegetais em raízes de soja

A produção de JA foi significativamente alterada aos 7, 15, 30 e 60 dai (Figura 6^a) ($p < 0,05$). Assim, aos 7 dai, a presença desse hormônio foi fortemente regulada em plantas que combinavam os dois microrganismos, o tratamento Pc + Pb. Aos 15 dai, o Pc + Pb obteve maior quantidade desse hormônio, ao contrário da testemunha. Aos 30 dias, Pc + Pb diferenciou apenas da testemunha, produzindo 101,97% a mais desse hormônio. Por fim, aos 60 dai, a presença do nematoide induziu maior produção de JA quando comparada aos demais tratamentos, porém a testemunha e Pc + Pb superaram Pc em 63,80% e 54,70%, respectivamente.

Conforme observado na Figura 6B, somente aos 7 dai os tratamentos não influenciaram na produção de SA ($p < 0,05$). Por sua vez, aos 15 dai, as plantas do tratamento de Pb e Pc produziram, respectivamente, 5,62 e 4,17 vezes mais SA do que as plantas testemunhas, diferenciando-os estatisticamente. Aos 30 dai, Pc + Pb e a testemunha foram equivalentes e superiores aos tratamentos em que os microrganismos foram inoculados isoladamente (Pb e Pc). Também, aos 30 dai, Pb foi diferente estatisticamente de Pc. Aos 60 dias, Pc + Pb foi superior a todos os outros tratamentos, produzindo de 84,9; 583,87 e 328,9% a mais que a testemunha, Pb e Pc, respectivamente.

Em relação ao ABA, aos 7 dai, as plantas dos tratamentos Pb e Pc produziram maiores quantidades desse hormônio quando comparados à testemunha e ao Pc + Pb. Nesse caso, Pb e

Pc produziram 141,67 e 153,33% a mais que a testemunhas, respectivamente. Quando avaliados em 30 dias, Pb, Pc e Pc + Pb produziram de 146,35 a 193,3% a mais de ABA quando comparados à testemunha, sendo estatisticamente iguais entre si e diferentes da testemunha. Aos 60 dai, Pc + Pb foi semelhante a testemunha e houve redução de 31,60 e 88,40% da síntese ácido abscísico nas plantas dos tratamentos Pb e Pc em comparação às plantas testemunhas, respectivamente. Não houve efeito dos tratamentos aos 15 dai ($p > 0,05$) (Figura 6B).

Por fim, todos os tratamentos influenciaram na produção de IAA (Figura 6D) ($p < 0,05$). Aos 7 dias, houve maior produção desse hormônio, quando comparado aos 15, 30 e 60 dai, exceto o tratamento Pb aos 30 dai. Nessa avaliação, plantas infectadas apenas por nematoides (Pb) produziram maior quantidade de IAA, diferenciando-a da testemunha e de Pc + Pb. Quando comparado a plantas testemunhas, o tratamento Pb promoveu o aumento de 28,45% de IAA. Vale ressaltar que aos 7 dai, o tratamento Pc + Pb produziu 28,90% menos IAA que a testemunha, diferenciando-se um do outro. Aos 15 dai, houve redução na síntese de IAA, pois, as plantas tratadas com nematoides e/ou fungo (Pc e Pb + Pc) produziram até 19,10% menos que a testemunha. Em 30 dai, as plantas do tratamento Pc produziram 13% a mais do que as plantas do tratamento de Pc + Pb. Aos 60 dai, Pb, Pc e Pc + Pb continham menor concentração de IAA em relação à testemunha em 33,65%, 36,9% e 25,7%, respectivamente.

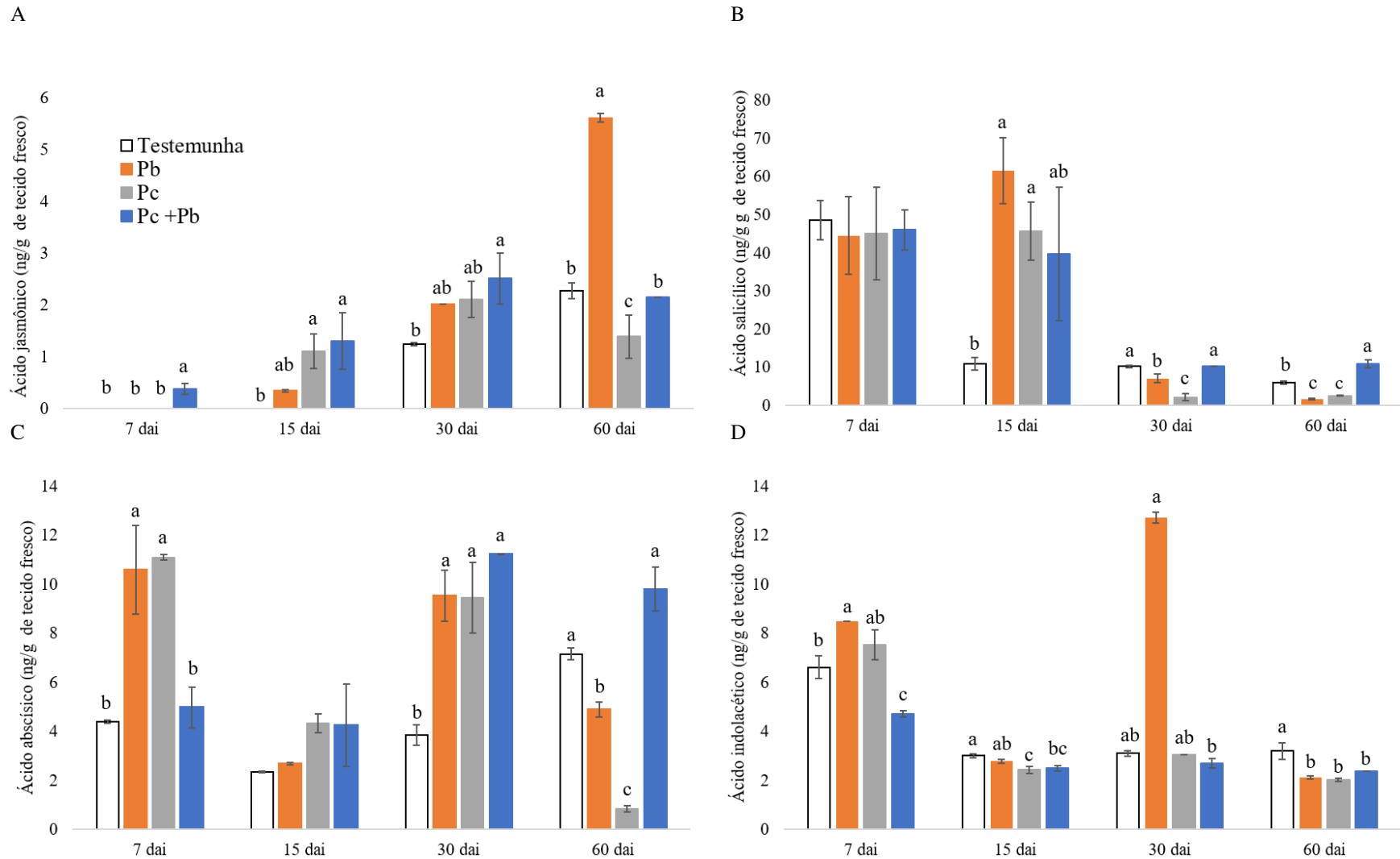


Figura 6 – Quantificação de ácido jasmônico (A), ácido salicílico (B), ácido abscísico (C) e ácido indolacético (D) em raízes de soja tratadas ou não com *P. chlamydosporia* e/ou *P. brachyurus*. As avaliações foram realizadas aos 7, 15, 30 e 60 dias após a inoculação (dai) dos nematoides em raízes de plantas dos tratamentos testemunha, *P. brachyurus* (Pb), *P. chlamydosporia* (Pc) e combinação dos microrganismos (Pc + Pb). Colunas com a mesma letra não são estatisticamente diferentes pelo teste Tukey ($p < 0,05$). As barras representam o desvio padrão ($n=3$).

3.4 – Expressão de genes relacionados à defesa

Os tratamentos influenciaram a expressão dos genes relacionados à resistência ($p < 0,05$) (Figura 7) (Suplementar S3, S4, S5 e S6). Aos 7 dai, plantas de soja inoculadas com *P. brachyurus* (Pb) responderam de forma mais intensa quando comparadas à testemunha e aos demais tratamentos ($p < 0,05$) (Figura 7^a) (S3). Esse padrão só não se repetiu para a expressão do gene *PRI*, em que ocorreu a regulação negativa desse gene nos tratamentos Pb e Pc + Pb (Figura 7^a). Pelo teste Dunnett, *PRI* do tratamento Pb se diferenciou estatisticamente da testemunha ($p < 0,05$). A expressão dos genes *ICS1*, *CHAL*, *FAL ACS*, *OPR3*, *BBI* em plantas do tratamento Pb foram superiores e diferentes dos demais tratamentos ($p < 0,05$). A expressão dos genes *ACO* e *KTI* foram menores nos tratamentos que receberam fungo (Pc e Pc + Pb), quando comparados a Pb, sendo diferentes estatisticamente. O gene *LOX* foi expresso 7 vezes mais no tratamento Pb em comparação ao Pc ($p < 0,05$).

A avaliação da expressão dos genes relacionados à defesa aos 15 dai indicou que houve diferença estatística apenas para os genes *ICS*, *CHAL*, *PRI*, *OPR3* e *KTI* ($p < 0,05$) (Figura 7B, S4). Em plantas do tratamento Pb ocorreu três vezes mais expressão do gene *ISC*, quando comparado ao tratamento que recebeu unicamente o fungo ($p < 0,05$). Para a expressão do gene *CHAL*, ocorreu regulação negativa deste nos tratamentos Pb e Pc, quando comparados aos Pc + Pb e a testemunha, sendo os dois últimos considerados iguais pela análise estatística ($p < 0,05$). A expressão do gene *PRI* foi regulada negativamente em todos os tratamentos que receberam microrganismos e no tratamento Pb houve regulação positiva para os genes *OPR3* e *KTI*, quando comparados à testemunha ($p < 0,05$). Os demais genes não foram influenciados pelos tratamentos.

Aos 30 dai, a expressão dos genes *CHAL*, *FAL* e *KTI* foi influenciada pelos tratamentos (Figura 7C, S5) ($p < 0,05$). Quando plantas foram mantidas em solo com a presença de *P. chlamydosporia* e com *P. brachyurus*, houve maior expressão do gene *CHAL*, em comparação aos tratamentos em que os microrganismos foram aplicados isoladamente ou sem microrganismos, a testemunha. Desse modo, a expressão do gene *CHAL* em plantas do tratamento Pc + Pb foi 3,6; 5 e 32 vezes maior que na testemunha e nos tratamentos Pb e Pc, respectivamente. Para a expressão do gene *KTI*, houve diferença apenas entre Pc + Pb e Pc, sendo que Pc + Pb expressou 3,8 vezes mais. Já para a expressão do gene *FAL* foi superior em

Pb e diferenciou-se dos demais tratamentos. Esse gene foi expresso 3,4; 1,15; 5,3 vezes mais no tratamento Pb, quando comparado à testemunha e aos tratamentos Pc e Pc + Pb, respectivamente.

Aos 60 dias, os tratamentos Pb, Pc e Pc + Pb influenciaram a expressão *ISC*, *PRI*, *ACO*, *ACS*, *OPR3*, *BBI* e *LOX* (Figura 7D, S6) ($p < 0,05$). Os tratamentos que receberam nematoides induziram a expressão do gene *ICS* em até 9 vezes mais e 11 vezes mais a do *ACS*, quando comparados ao tratamento Pc. O gene *PRI* foi regulado negativamente nos tratamentos Pb e Pc, quando comparados à testemunha, porém não se diferenciou estatisticamente do tratamento em que os organismos foram aplicados concomitante (Pc + Pb). A expressão do gene *ACO* foi igual para os tratamentos que receberam o fungo e diferenciaram estatisticamente do tratamento Pb e da testemunha. Nesse caso, Pb e a testemunha foram equivalentes. Para *OPR3*, a expressão em Pb foi 4, 2 e 2 vezes mais que a da testemunha, Pc e Pc + Pb, respectivamente, fazendo com que esse se diferenciasse dos demais tratamentos. Também, Pc + Pb induziu expressão de *OPR3* duas vezes mais em comparação à testemunha. Em relação ao gene *BBI*, a aplicação isolada de *P. chlamydosporia* ocasionou a regulação negativa desse gene quando comparado à testemunha e ao tratamento Pc + Pb. No entanto, Pc + Pb foi dado como equivalente à testemunha. Ao contrário da expressão do gene *BBI*, *P. chlamydosporia* induziu maior expressão do gene *LOX* quando comparado à testemunha e aos tratamentos Pb e Pc. Surpreendentemente, Pc induziu em até 170, 7 e 27 vezes mais a expressão de *LOX* quando comparado à testemunha, Pb e Pc, respectivamente. Para uma interpretação completa dos dados coletados e das análises e melhor compreensão das alterações nas plantas dos tratamentos Pb, Pc e Pc + Pb, consultar a Figura 7, 8 e os materiais suplementares.

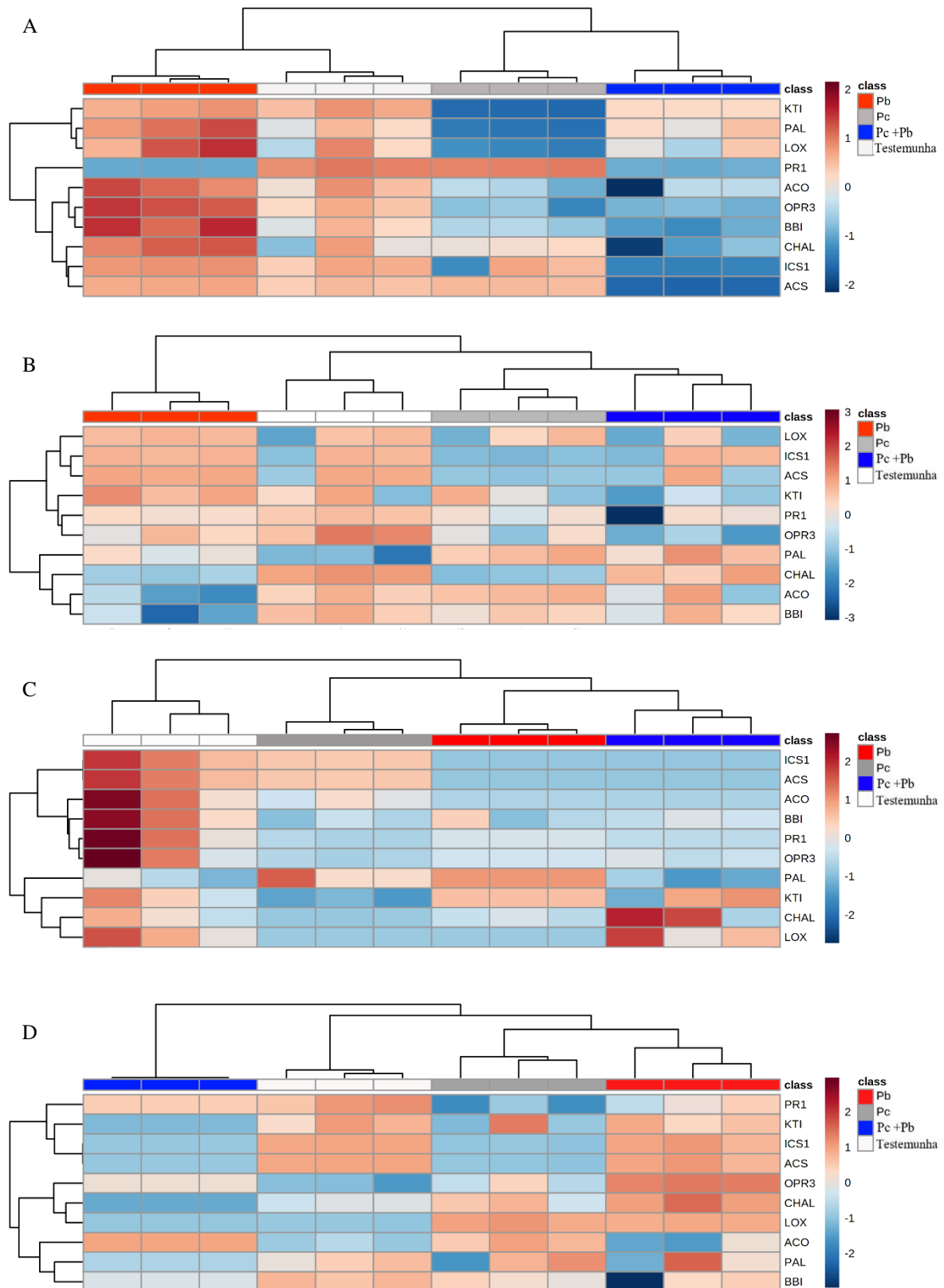


Figura 7. Perfil de expressão de genes de defesa determinado em raízes de plantas de soja para a testemunha e para os seguintes tratamentos: (Pb) *Pratylenchus brachyurus*, (Pc) *Pochonia chlamydosporia*, (Pc + Pb) *P. chlamydosporia* coinoculado com *P. brachyurus*. (A) avaliação aos 7 dai; (B) aos 15 dai; (C) aos 30 dai e (D) aos 60 dai. A amplificação do gene Ubiquitina (UBIQ) da soja foi utilizada como controle interno para normalização dos dados. Para cada amostra de raiz, foram utilizadas três repetições biológicas com suas respectivas três repetições técnicas.

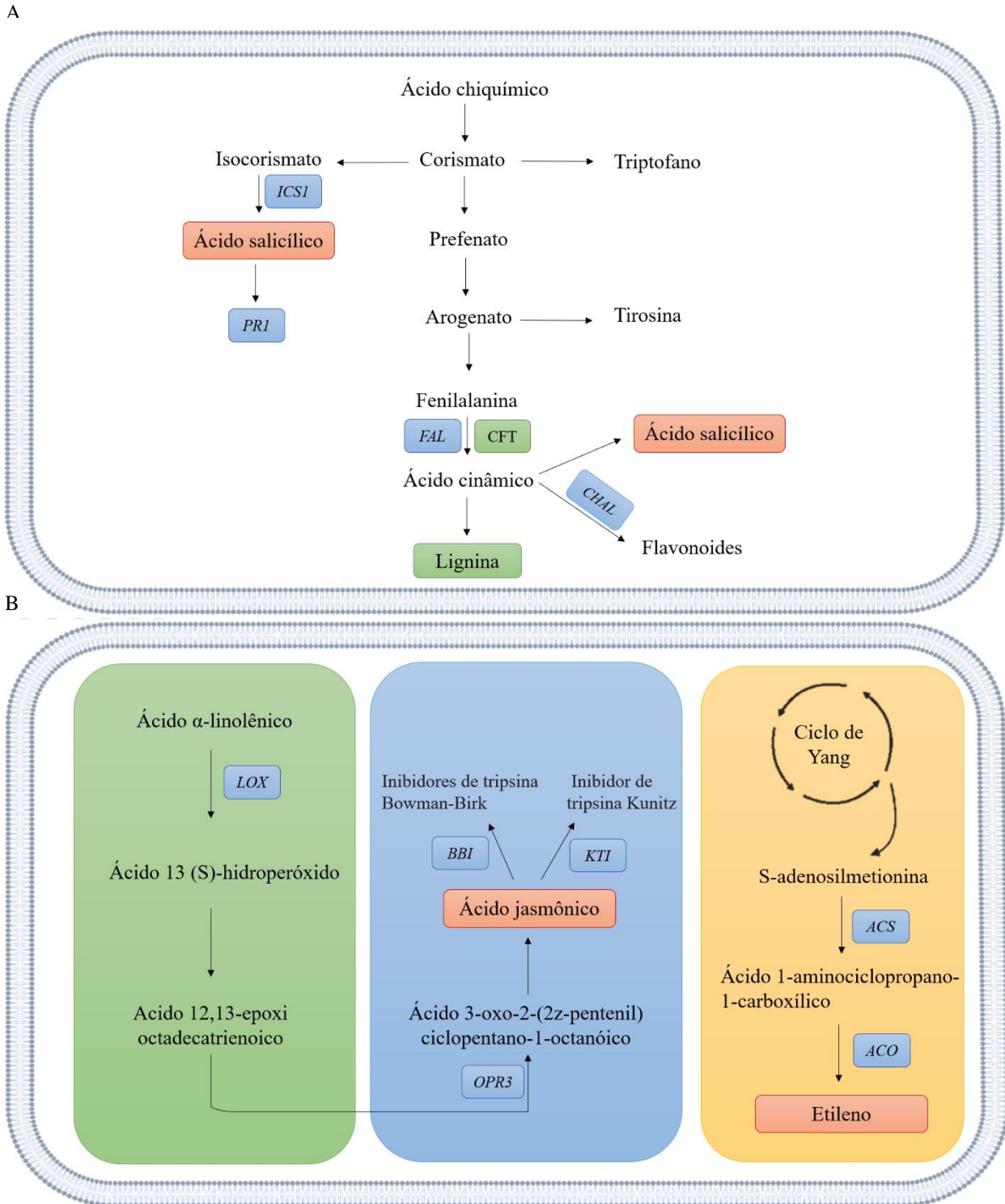


Figura 8. Análises bioquímicas e moleculares para investigar o efeito de *P. chlamydosporia*, *P. brachyurus* e a combinação dos dois microrganismos em plantas de soja. (A) resposta de defesa depende do ácido salicílico (SAR), (B) resposta de defesa depende do ácido jasmônico (ISR). Em verde a extração e quantificação de derivados da lignina-ácido tioglicólico (LATG) e de compostos fenólicos totais (CFT); em vermelho consta a quantificação de hormônios por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa e, por fim, de azul qRT-PCR para a quantificação da expressão de genes relacionados à defesa.

4. DISCUSSÃO

A interação simbiótica planta-organismos (comensalismo, mutualismo ou parasitismo) ocasiona modificações bioquímicas nas plantas (Van Loon et al. 1998; Piasecka et al., 2015; Pieterse et al., 2014). Isso ocorre para que a interação tem sucesso tanto no estabelecimento de uma relação simbiótica benéfica ou parasítica ou, até mesmo, como mecanismo de defesa da planta para evitar a entrada de organismos indesejáveis em seus tecidos (Durrant e Dong, 2004). Ao reconhecer a presença ou atividade de microrganismos, a resposta ocorre por meio da expressão de genes de defesa, levando à alteração da atividade enzimática e síntese de metabólitos que pode atuar na fortificação de barreiras pré-existentes e/ou barreiras em pós-interação (Pascholati e Dalio, 2018). No entanto, ainda, os organismos, benéficos ou não-benéficos, usam o seu metabolismo secundário para escapar das respostas de defesa das plantas para penetrarem e se estabelecerem nos tecidos. Esse processo é conhecido como corrida armamentista ou modelo zig-zag e é a garantia da (co)evolução dos organismos (Jones e Dangl, 2006).

Organismos simbiontes benéficos – bactérias e fungos – podem ser detectados pelas plantas e desencadear uma resposta de defesa, visto que esses compartilham diversas moléculas similares a patógenos vegetais. No entanto, eles precisam esquivar dos mecanismos de reconhecimento das plantas (PRRs – *Transmembrane Pattern Recognition Receptors*) para estabelecerem uma interação benéfica (Buscaill e Hoorn., 2021). A indução de uma resposta de defesa mais atenuada ou supressão da resposta de defesa é um mecanismo já detectado para bactérias e fungos benéficos, como *Burkholderia phytofirmans*, *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma harzianum* e em *Pochonia chlamydosporia* (Trdá et al., 2014).

4.1– Alterações nas vias de defesa dependentes do ácido salicílico e do ácido jasmônico em plantas de soja tratadas com *P. chlamydosporia*

Pochonia chlamydosporia tem a capacidade de modificar a expressão de genes de defesa em plantas, uma vez que esse tem hábito endofítico e parte do processo de penetração e colonização das células das raízes, precisa driblar os mecanismos de defesa das plantas (Ciancio et al., 2017). Observou-se que aos 7 dai, nas plantas inoculadas apenas com clamidósporos do isolado Pc10 de *P. chlamydosporia*, houve aumento de ABA. Da mesma forma, Larriba et al. (2015), ao avaliarem a expressão diferencial de genes em raízes de cevada colonizadas endofiticamente por *P. chlamydosporia*, relataram a regulação positiva de genes relacionados à via de sinalização do ABA, porém esses dados não foram discutidos. O ABA está relacionado

à resposta ao estresse biótico e abiótico e é um importante hormônio para a interação planta-microrganismo, podendo levar à suscetibilidade ou resistência à infecção (Bostock et al., 2014). Apesar da ambiguidade do papel do ABA na interação planta-microrganismo, em estudos com patógenos fúngicos, foi observado que o pré-tratamento em plantas com ABA anulou a resistência ao patógeno, suprimiu o acúmulo de fitoalexinas e as respostas de defesa (Cahill e Ward, 1989; McDonald e Cahill, 1999; Mohr e Cahill, 2001). O acúmulo de ABA em plantas de 7 dai tratadas com *P. chlamydosporia* pode ser reflexo da atividade do fungo no estabelecimento do crescimento endofítico, limitando as respostas de defesa das plantas ao seu progresso nos tecidos.

A aplicação simultânea de *P. chlamydosporia* em sulco de plantio com a semeadura da soja aumentou a concentração do JA e SA no segundo ponto de coleta (denominado 15 dai) e reprimiu a produção do IAA, e regulou negativa da expressão dos genes *CHAL*, *PR1*, *OPR3* e *KIT*, quando comparada às raízes de plantas testemunhas. O IAA também foi regulado negativamente aos 7 e 60 dai nas raízes. Esse hormônio está relacionado ao desenvolvimento vegetal (Duca et al., 2014) e pode estar correlacionado à promoção de crescimento em plantas tratadas com *P. chlamydosporia*, devido à capacidade do fungo sintetizar IAA *in vitro* (Zavala-Gonzalez et al., 2015; Mingot-Ureta et al., 2020; Monteiro et al., 2020). Zavala-Gonzalez et al., (2015) observaram que diferentes isolados promoveram o crescimento vegetal em tomateiro e que a produção de IAA por *P. chlamydosporia* variou de acordo com o isolado avaliado. Porém, em nossos experimentos, além da regulação negativa, não observamos promoção de crescimento vegetal em plantas de soja tratadas com *P. chlamydosporia* (dados não mostrados).

Aos 15 dai, *P. chlamydosporia* modifica a homeostase do JA e SA em plantas de soja. Em trabalhos anteriores, já foi relatada a influência de *P. chlamydosporia* sobre esses hormônios em monocotiledônea e dicotiledônea (Tolba et al., 2021). Além da participação desses hormônios nas vias de defesa, JA e SA estão relacionados ao desenvolvimento vegetal e ao controle do crescimento de endofíticos em tecidos das raízes. O JA é conhecido como importante hormônio que mantém as plantas em estado de *priming* – pré-condicionamento das plantas para responder de forma mais rápida e efetiva a estresses bióticos e abióticos (Balmer et al., 2015) – e por conter a colonização endofítica de microrganismos (Zavala-Gonzalez et al., 2017).

Zavala-Gonzalez et al., (2017), ao avaliarem o efeito de *P. chlamydosporia* sobre a homeostase do JA em plantas, observaram que, além da induzir a redução do tempo floração e melhoria do rendimento, houve uma correlação positiva do aumento de JA e retenção do crescimento de *P. chlamydosporia* em raiz de *Arabidopsis thaliana* e que, quando ocorria a

supercolonização em plantas mutantes, estas apresentaram menor desenvolvimento quando comparadas à plantas selvagens, possivelmente devido à competição por nutrientes entre o fungo endofítico e a planta. Após a percepção do fungo mutualista e a ativação do sistema de defesa da planta, pode ocorrer a redução da JA nos tecidos, o que também foi observado em outros trabalhos e em nossos experimentos em plantas ao 60 dai inoculadas com *P. chlamydosporia* (Zavala-Gonzalez et al., 2017; Gouveia et al., 2022^{a,b}). Possivelmente, aos 15 dai, as plantas estão produzindo maior quantidade de JA como objetivo de regular o crescimento endofítico *P. chlamydosporia* para que não haja competição de nutrientes, enquanto as vias de defesa das plantas são silenciadas para que o fungo não sofra com arsenal enzimático e metabólico e, assim, consiga crescer nos tecidos.

Observamos que a presença endofítica de *P. chlamydosporia* nas raízes de soja regulou positivamente a via de defesa SAR dos 30 aos 60 dai e que, possivelmente, houve aumento de flavonoides nas raízes. O aumento de SA aos 30 dai é indício de que a SAR está regulada positivamente, sendo essa confirmada pelo acúmulo de CFT aos 60 dai. Os CFT podem ser direcionados pelo sistema de defesa da planta para a produção de lignina, fortificando a parede celular e/ou ativando a via de produção de flavonoides, que são compostos metabólicos secundários com atividade antimicrobiana (Dixon, 2001; Chin et al., 2018). Nesse caso, não observamos o aumento de LATG, que indicaria mais lignina, mas, sim, a regulação positiva de *CHAL*, um precursor dos flavonoides. Os flavonoides são metabólitos secundários envolvidos na resposta a estresses bióticos e abióticos e que podem desempenhar papel importante na nutrição das plantas (Cesco et al., 2010). Gouveia et al., (2022^a), ao estudarem perfil hormonal de tomateiro com *P. chlamydosporia* endofítica, relataram o aumento de CFT e flavonoides aos 24 e 44 dias após a inoculação do fungo. Ademais, observaram maior produção de rutina, um flavonoide relacionado ao crescimento vegetal e à mortalidade de J2 de *Meloidogyne incognita*.

Finalmente, aos 60 dai, *P. chlamydosporia*, isoladamente, reduziu a produção dos hormônios vegetais avaliados – SA, JA, IAA e ABA –, porém ativou a ISR, uma vez que foi notada a regulação positiva de *LOX*, *ACO* e *BBI*. As enzimas da família das lipoxigenases são importantes para o crescimento vegetal e para a regulação do sistema de defesa das plantas, por estarem envolvidas na rota de defesa dependente de JA, que tem efeito contra patógenos. A enzima lipoxigenase utiliza o ácido linolênico como substrato para desencadear resposta de defesa e culminar no acúmulo de JA em plantas (Porta et al., 2002). Posteriormente, assim como o acúmulo de JA, pode ocorrer a indução a inibidores de proteases, como o inibidor de serino de Bowman-Birk (*BBI*). De fato, observamos a regulação positiva do gene *BBI* aos 60 dai. Os inibidores de proteases regulam a proteases endógenas quando a plantas são expostas ao ataque

de insetos e nematoides (Ryan, 1980; Bozbuga, 2021). Os inibidores de proteases podem afetar a digestão, o desenvolvimento e a reprodução de organismos antagonistas às plantas, melhorando a resistência destas (Urwin et al., 1995, 1998; Lopes et al., 2004; Rashed et al., 2008). Vale salientar que, como resposta de defesa, ocorre a interação entre etileno e ácido jasmônico. Plantas deficientes na produção de etileno afetam negativamente a resposta mediada por JA e de inibidores de proteases (Dong et al., 1998). Dong et al. (1998) observaram também plantas de tomate mutantes deficientes em *ACO* não induzem a produção de inibidores de proteases, reafirmando a importância do etileno em combinação com JA para tornar as plantas mais resistentes. Aqui, observamos que *P. chlamydosporia* induz a ISR por meio da regulação positiva de *LOX* e *ACO*, culminado na regulação positiva de *BBI*.

4.2 – Alterações nas vias de defesa dependentes do ácido salicílico e do ácido jasmônico em plantas de soja infectadas por *P. brachyurus*

Pelo teste de coloração, havia uma população de *P. brachyurus* dentro do sistema radicular da soja. Essa população cresceu ao longo do tempo avaliado, chegando a ter até 36% mais nematoides nas plantas testemunhas em relação ao número inoculado. Ao entrar nos tecidos e se alimentar, o nematoide causa danos severos – rompimento de membrana plasmática – nos tecidos e estressa a planta, como expresso nas respostas de defesa quando analisamos hormônios e genes da soja que são relacionados à via do SAR ou ISR. Pela SAR, aos 7 dai, ocorreu a regulação positiva de *ICS*, *FAL*, *CHAL*, enquanto ISR ocorreu a regulação positiva de *OPR3*, *ACS* e *BBI*.

A ativação SAR pode ser verificada pelo metabolismo secundário das plantas. Quando essa via está ativada, pode, por exemplo, ocorrer o acúmulo de SA com subsequente regulação positiva do gene *PRI*, que é um marcador molecular para SAR (Linthorst e Van Loon, 1991). Outra alternativa é a quantificação de CFT e subsequente aumento de LATG ou ativação da via dos flavonoides, já discutida anteriormente. Possivelmente, as plantas responderam ao ataque de *P. brachyurus* pela regulação positiva da via dos flavonoides, como exposto pela regulação positiva do gene *CHAL*, visto que os flavonoides podem atuar sobre nematoide por meio da redução da motilidade, da repelência das raízes ou, até mesmo, os matando (Chin et al., 2018). Para *Pratylenchus*, já foi observado que em plantas em que o nematoide tem baixo fator de reprodução havia maiores quantidades de flavonoides que em plantas mais susceptíveis, afetando a mobilidade e a reprodução dos nematoides (Baldrige et al., 1998; Rahaman et al., 2021). Outros resultados demonstraram que, apesar da presença de flavonoides, esses não foram

capazes de conter *Pratylenchus* (Wutts et al., 2006), o que se assemelham aos nossos dados em plantas com apenas nematoides, visto que os nematoides penetraram e reproduziram nas plantas de soja avaliadas.

Houve resposta por meio da ISR em plantas com *P. brachyurus* aos 7 dai, como notado pela regulação positiva do gene inibidores de proteinase do tipo Bowman-Birk (*BBI*). Proteinases dessa família já são conhecidas por atuarem na defesa contra insetos, sendo suas principais funções conhecidas: regular proteases endógenas, reservar sulfurados e causar efeito antinutricional em insetos por meio da inibição da atividade proteolítica das enzimas digestivas, interferindo no desenvolvimento e reprodução (Bowman, 1946; Birk, et al., 1963; Pompermayer et al., 2003). Há relato de que ocorre maior expressão de genes de inibidores proteases e maior secreção de *BBI* em exsudatos de raízes confrontadas com nematoides. A redução da taxa de eclosão e a expressão de inibidores de proteinases em plantas transgênicas é vital como mecanismo de controle de nematoides (Rashed et al., 2008; Rocha et al., 2015; Lacerda et al., 2017).

Aos 30 dai, ocorreu o acúmulo de CFT e o antagonismo de JA e AS, como já conhecido na literatura. O antagonismo de JA e SA permaneceu aos 60 dai e ficou evidente a supressão da SAR, enquanto a ISR permaneceu ativa contra a infecção do nematoide. Possivelmente, a regulação positiva de *FAL* ocasionou o aumento de CFT nos tecidos radiculares colonizados por *P. brachyurus*. Esses compostos secundários têm efeito conhecido sobre nematoides de hábito sedentário e migratório, reduzindo a eclosão e a penetração nos tecidos e causando mortalidade (Ohri e Pannu, 2010).

A resposta à infecção de *P. brachyurus* foi observada aos 7 dai pela expressão de genes relacionados às duas vias de defesa, sendo a ISR regulada positivamente até os 60 dai (última avaliação). Apesar da planta responder de forma ativa ao ataque dos nematoides, isso não foi suficiente para impedir a penetração, a migração e a reprodução deles. Desse modo, percebe-se que alternativas que auxiliem a planta a responder com maior robustez, como a presença de fungos nematófagos endofíticos, a fim de manejar esses organismos prejudiciais é muito importante.

4.3 – Alterações nas vias de defesa dependentes do ácido salicílico e do ácido jasmônico em plantas de soja tratadas com *P. chlamydosporia* e infectadas por *P. brachyurus*

Quando os dois microrganismos foram combinados, notamos que *P. chlamydosporia* não foi eficiente em conter a penetração de *P. brachyurus* no sistema radicular da soja (7 e 15 dai), porém houve redução da população aos 30 e 60 dai, em comparação à testemunha. Ao analisar as vias de defesa, aos 30 dai ocorreu maior produção de CFT no tratamento em que os dois organismos estavam combinados, mas não se diferenciou do tratamento apenas com nematoides. Possivelmente, tal indução ao acúmulo de CFT foi independente da presença do fungo de controle biológico, uma vez que *P. brachyurus* induz ao aumento de CFT. Outro aspecto importante é que, aos 15 dai, quando comparado ao tratamento em que o fungo e nematoides estão no interior do sistema radicular, ocorreu maior quantidade de LATG em relação à testemunha e aos tratamentos em que os organismos estavam isolados. Desse modo, é possível inferir que a infestação prévia do solo com *P. chlamydosporia* a pode induzir as plantas a maior lignificação dos tecidos das raízes antes da infecção pelos NPPs. Parede celular com maior teor de lignina pode dificultar a penetração, a movimentação e a alimentação das células pelo nematoides, o que pode ter afetado o número de *P. brachyurus* no sistema radicular aos 30 dai.

Aos 30 dai, é notável a alta expressão do gene *CHAL* em Pc + Pb em relação à testemunha e aos outros tratamentos, chegando expressar até cinco vezes mais do que em plantas apenas com nematoides. Ademais, aos 30 dai houve a redução significativa da população de *P. brachyurus* em plantas que receberam previamente clamidósporos de *P. chlamydosporia*.

Anteriormente, foi discutido os efeitos de flavonoides sobre a população de nematoides e foi relatado que a alta regulação dessa via aos 7 dai não foi capaz de conter a penetração de *P. brachyurus*. No entanto, o aumento da concentração de flavonoides combinado com outros metabólitos, como a regulação positiva de SA, JA, ABA, CFT, LATG, pode ter sido crucial para afetar a nutrição e reprodução dos nematoides. Vale salientar que os flavonoides são inibidores do transporte de auxina nos tecidos vegetais (Jones et al., 2007), o que pode estar correlacionado com a baixa quantidade de IAA observado ao longo de todo o experimento.

No geral, plantas de soja que são confrontadas com *P. chlamydosporia* e *P. brachyurus* têm diversas modificações em suas vias de defesa. As plantas podem provocar essas modificações com o objetivo de impedir o estabelecimento da relação simbiótica – benéfica ou

não-benéfica – ou até mesmo o fungo e nematoide podem causar essas modificações com a finalidade de silenciar ou atenuação das respostas de defesa das plantas, com o intuito de estabelecerem uma relação endofítica (mutualista ou parasita) com as plantas. Desse modo, pode-se afirmar que *P. chlamydosporia* e *P. brachyurus* alteram as vias de defesa dependes de SA e JA. O mesmo ocorre quando os dois organismos estão simultaneamente presentes nas plantas, alterando diversos genes relacionados a SAR e a ISR. Diferentemente do que ocorre em plantas inoculadas somente com nematoide, a presença de *P. chlamydosporia* reduz o número de indivíduos de *P. brachyurus* em raízes de soja, altera de forma expressiva a quantidade de lignina e ativa a via dos flavonoides. Tanto a lignina quanto os metabólitos presentes na via dos flavonoides podem impedir a mobilidade e causar morte de *P. brachyurus*. Assim, esse é um dos mecanismos indiretos que possibilita *P. chlamydosporia* conter o aumento populacional de *P. brachyurus* em raízes de soja.

5. CONCLUSÃO

Pochonia chlamydosporia é um agente de biocontrole capaz de conter o aumento da população de *Pratylenchus brachyurus* infectantes em soja. Tanto *P. chlamydosporia* como *P. brachyurus* ocasionam diversas modificações a nível de metabolismo secundário nas vias de defesa dependentes de ácido salicílico e ácido jasmônico. Além disso, a combinação desses dois microrganismos nas plantas ocasiona maior lignificação e ativação de gene relacionado a via dos flavonoides, podendo ser esse um possível mecanismo indireto de *P. chlamydosporia* para controlar nematoides do gênero *P. brachyurus* em soja.

6. REFERÊNCIA

- Ali, M. A., Azeem, F., Abbas, A., Joyia, F.A., Li, H., Dababat, A.A. 2017. Transgenic strategies for enhancement of nematode resistance in plants. *Frontiers in Plant Science*. 8: 750. doi.org/10.3389/fpls.2017.00750.
- Baker, K. F., Cook, R. J. 1974. *Biological control of plant pathogens*. WH Freeman and Company.
- Balbino, H. M., Monteiro, T. S. A., Coutinho, R. R., Pacheco, P. V. M., Freitas, L. G. 2021. Association of *Duddingtonia flagrans* with microorganisms for management of *Meloidogyne javanica* and acquisition of nutrients in soybean. *Biological Control*. 159: 104626. Doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104626.
- Baldridge, G. D., O’neill, N. R., Samac, D. A. 1998. Alfalfa (*Medicago sativa* L.) resistance to the root-lesion nematode, *Pratylenchus penetrans*: defense-response gene mRNA and isoflavonoid phytoalexin levels in roots. *Plant molecular biology*. 8(6):999-1010. Doi.org/10.1023/a:1006182908528.
- Balmer, A., Pastor, V., Gamir, J., Flors, V., Mauch-Mani, B. 2015. The ‘prime-ome’: towards a holistic approach to priming. *Trends in plant science*, 20(7), 443-452. Doi.org/10.1016/j.tplants.2015.04.002.
- Barber, M. S., Ride, J. P. 1988. A quantitative assay for induced lignification in wounded wheat leaves and its use to survey potential elicitors of the response. *Physiol Mol Plant Pathol* 32:185–197. Doi.org/10.1016/S0885-5765(88)80015-8.
- Birk, Y., Gertler, A., Khalef, S. 1963. A pure trypsin inhibitor from soya beans. *Biochemical Journal*, 87(2), 281. Doi.org/10.1016/j.tplants.2015.04.002.
- Boneti, J. I. S., and Ferraz, S. 1981. Modificação do método de Hussey and Barker para extração de ovos de *Meloidogyne 63xigua* de raízes de cafeeiro. *Congresso da Sociedade Brasileira de Fitopatologia*. 14.
- Bordallo, J. J., Lopez-Llorca, L. V., Jansson, H.-B., Salinas, J., Persmark, L., Asensio, L. 2002. Colonization of plant roots by egg-parasitic and nematode-trapping fungi. *New Phytol*. 154, 491–499. doi.org/10.1046/j.1469-8137.2002.00399.x.
- Bostock, R. M., Pye, M. F., and Roubtsova, T. V. 2014. Predisposition in Plant Disease: Exploiting the Nexus in Abiotic and Biotic Stress Perception and Response. *Annual Review of Phytopathology*. 52(1), 517–549. Doi:10.1146/annurev-phyto-081211-172902.
- Bowman, D. E. 1946. Differentiation of soybean antitryptic factors. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 63(3):547-50. Doi.org/10.3181/00379727-63-15668.
- Bozbuga, R. 2021. Molecular investigation of proteinase inhibitor (PI) gene in tomato plants induced by *Meloidogyne* species. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 19(1), 1-8. Doi.org/10.1186/s43141-021-00230-2.

Buscaill, P., van der Hoorn, R. A. L. 2021. Defeated by the nines: nine extracellular strategies to avoid microbe-associated molecular patterns recognition in plants. *The Plant Cell*. 33(7), 2116–2130. Doi.org/10.1093/plcell/koab109.

Bybd Jr, D. W., Kirkpatrick, T., and Barker, K. 1983. An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. *Journal of nematology*, 15(1), 142.

Cahill, D. M., and Ward, E. W. B. 1989. Rapid localized changes in abscisic acid concentrations in soybean in interactions with *Phytophthora megasperma* f. sp. *Glycinea* or after treatment with elicitors. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 35:483–94. doi.org/10.1016/0885-5765(89)90090-8.

Castillo, P., and Volvas, N. 2007. *Pratylenchus* (Nematoda: Pratylenchidae); Diagnosis, Biology, Pathogenicity and Management. *Nematology Monographs and Perspectives* 6. Plant Pathology. Brill. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02097.x>.

Cesco, S., Neumann, G., Tomasi, N., Pinton, R., Weisskopf, L. 2010. Release of plant-borne flavonoids into the rhizosphere and their role in plant nutrition. *Plant Soil*. 329, 1–25. Doi.org/10.1007/s11104-009-0266-9.

Chin, S., Behm, C. A., Mathesius, U. 2018. Functions of flavonoids in plant–nematode interactions. *Plants*, 7(4), 85. Doi.org/ 10.3390/plants7040085.

Ciancio, A., Pentimone, I., Colagiero, M., Rosso, L. 2017. Regulatory factors in *Pochonia chlamydosporia*-induced gene expression. In *Perspectives in Sustainable Nematode Management Through Pochonia chlamydosporia Applications for Root and Rhizosphere Health* (pp. 99-109). Springer, Cham.

CONAB. 2020. Companhia Nacional de Abastecimento—Acompanhamento da safra brasileira grãos, v. 07 Safra 2019/20—Décimo levantamento, Brasília, p. 1–74, julho Accessed February 09, 2021. https://www.conab.gov.br/info-agro/safra/safra-graos/boletim-da-safra-de-graos/item/download/32478_92eba4272b36b69bebc2063e5b766bf7 (In Portuguese.).

Dias, W. P., Garcia, A., Silva, J. F. V., Carneiro, G. D. S. 2010. Nematodes in soybeans: identification and control. *Circular Técnica-Embrapa Soja*, (76).

Dixon, R.A. 2001. Natural products and plant disease resistance. *Nature*. doi.org/10.1038/35081178.

Dong, X. (1998). SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. *Current opinion in plant biology*, 1(4), 316-323. Doi.org/ 10.1016/1369-5266(88)80053-0.

Duca, D., Lorv, J., Patten, C. L., Rose, D., Glick, B. R. (2014). Indole-3-acetic acid in plant–microbe interactions. *Antonie van Leeuwenhoek*, 106(1), 85–125. Doi:10.1007/s10482-013-0095-y.

Durrant, W. E., and Dong, X. 2004. Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology*. 42(1), 185–209. Doi:10.1146/annurev.phyto.42.040803.140421.

- Einhardt, A. M., Ferreira, S., Hawerth, C., Valadares, S. V., Rodrigues, F. A. 2020. Nickel potentiates soybean resistance against infection by *Phakopsora pachyrhizi*. *Plant Pathology*, 69(5), 849-859.
- Fearnside, P. M. 2001. Soybean cultivation as a threat to the environment in Brazil. *Environmental Conservation*, 28(1), 23-38.
- Ferraz, L.C.C.B. 2006. O nematóide *Pratylenchus brachyurus* e a soja sob plantio direto. *Rev. Plantio Direto* 23–27.
- Fortunato, A.A., Debona, D., Bernardeli, A.M.A. Rodrigues, F.A. 2015. Defence-related enzymes in soybean resistance to target spot. *Journal of Phytopathology*, 163, 731–742.
- Gouveia, A. S., Monteiro, T. S. A., Balbino, H. M., Magalhães, F. C., Ramos, M. E. S., de Moura, V. A. S., Luiz, P. H. D., Oliveira, M. G.A A., Freitas, L. G., Ramos, H. J. O. 2022^a. Inoculation of *Pochonia chlamydosporia* triggers a defense response in tomato roots, affecting parasitism by *Meloidogyne javanica*. *Microbiological Research*, 127242.
- Gouveia, A. S., Monteiro, T. S. A., Luiz, P. H. D., Balbino, H. M., Magalhães, F. C., Moura, Ramos, M. E. S., Morgan, T., Freitas, L; G., Oliveira, M. G. A., Ramos, H. J. O. 2022^b. The nematophagous root endophyte *Pochonia chlamydosporia* alters tomato metabolome. *Rhizosphere*, 22, 100531. Doi.org/ 10.1016/j.rhisph.2022.100531.
- Henry, G., Thonart, P., Ongena, M. 2012. PAMPs, MAMPs, DAMPs and others; an update on the diversity of plant immune elicitors. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*. 16:257–268.
- Hidalgo-Díaz, L., Franco-Navarro, F., Freitas, L. G. 2017. *Pochonia chlamydosporia* microbial products to manage plant-parasitic Nematodes: Case Studies from Cuba, Mexico and Brazil. In *Perspectives in sustainable nematode management through Pochonia chlamydosporia applications for root and rhizosphere health* (pp. 311-342). Springer, Cham.
- Hussey R. S. Barker K. R. 1973. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. *Plant Disease Reporter*, 57: 1025–1028.
- Inomoto, M. M. 2011. Resistance evaluation of 12 maize hybrids to *Pratylenchus brachyurus*. *Trop. Plant Pathol.* 36, 308–312. doi.org/10.1590/S1982-56762011000500006.
- Jia, F., Peng, S., Green, J., Koh, L., Chen, X. 2020. Soybean supply chain management and sustainability: A systematic literature review. *Journal of Cleaner Production*, 255, 120254.
- Jones, J. D., Dandl, J. L. 2006. The immune plant system. *Nature*, London, 444 (7117). 323-329, 2006. Doi.org/10.1038/nature05286323.
- Jones, J. T., Furlanetto, C., Phillips, M. S. 2007. The role of flavonoids produced in response to cyst nematode infection of *Arabidopsis thaliana*. *Nematology*, 9(5), 671-677. Doi.org/10.1163/156854107782024875.
- Lacerda, J. T. J. G., Lacerda, R. R., Assunção, N. A., Tashima, A. K., Juliano, M. A., dos Santos Jr, G. A., Souza, M. S., Batista, J. L., Rossi, C. E., Gadelha, C. A. A., Santi-Gadelha, T. 2017.

New insights into lectin from *Abelmoschus esculentus* seeds as a Kunitz-type inhibitor and its toxic effects on *Ceratitis capitata* and root-knot nematodes *Meloidogyne* spp. *Process Biochemistry*, 63, 96-104.

Larriba, E., Jaime, M. D. L. A., Nislow, C., Martín-Nieto, J., Lopez-Llorca, L.V. 2015. Endophytic colonization of barley (*Hordeum vulgare*) roots by the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* reveals plant growth promotion and a general defense and stress transcriptomic response. *J. Plant Res.* 128, 665–678. doi.org/10.1007/s10265-015-0731-x.

Linthorst, H. J. M., Van Loon, L. C. 1991. Pathogenesis-related proteins of plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 10(2), 123–150. Doi.org/10.1080/07352689109382309.

Livak, K. J., Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25, 402–408. doi.org/10.1006/meth.2001.1262.

Lopes, A. R., Juliano, M. A., Juliano, L., Terra, W. R. 2004. Coevolution of insect trypsins and inhibitors. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America*, 55(3), 140-152.

Manzanilla-López, R.H., Lopez-Llorca, L. V. (Eds.), 2017. Perspectives in Sustainable Nematode Management Through *Pochonia chlamydosporia* Applications for Root and Rhizosphere Health, Perspectives in Sustainable Nematode Management Through *Pochonia chlamydosporia* Applications for Root and Rhizosphere Health. Springer International Publishing, Cham. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-59224-4>.

MAPA. (2022). Produtos Fitossanitários com uso Aprovado para a Agricultura Orgânica Registrados. Outubro de 2022. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons> Acesso em: 10 outubro 2022.

McDonald, K. L., Cahill, D. M. 1999. Influence of abscisic acid and the abscisic acid biosynthesis inhibitor, norflurazon, on interactions between *Phytophthora sojae* and soybean (*Glycine max*). *Eur. J. Plant Pathol.* 105:651–58. Doi.org/10.1023/A:1008705321113.

Medeiros, H. A., Resende, R. S., Ferreira, F. C., Freitas, L. G., Rodrigues, F.A. 2015. Induction of resistance in tomato against *Meloidogyne javanica* by *Pochonia chlamydosporia*. *Nematoda* 2, e10015. doi.org/10.4322/nematoda.10015.

Medeiros, H.A., Araújo Filho, J.V., Freitas, L.G., 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*. *Sci. Rep.* 7, 1–13. doi.org/10.1038/srep40216.

Mingot-Ureta, C., Lopez-Moya, F., Lopez-Llorca, L. V. 2020. Isolates of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* are endophytic in banana roots and promote plant growth. *Agronomy*, 10(9), 1299.

Mohr, P. G., Cahill, D, M. 2001. Relative roles of glyceollin, lignin and the hypersensitive response and the influence of ABA in compatible and incompatible interactions of soybeans

with *Phytophthora sojae*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 58:31–41. Doi.org/10.1006/pmpp.2000.0306.

Monteiro, T. S. A., Pacheco, P. V. M., Gouveia, A. S., Balbino, H. M., Freitas, L. G. 2020. *Pochonia*. In *Beneficial Microbes in Agro-Ecology* (pp. 669-682). Academic Press.

Monteiro, T. S. A., Valadares, S. V., Mello, I. N. K., Moreira, B. C., Kasuya, M. C. M., Araújo, J. V., Freitas, L. G. 2018. Nematophagus fungi increasing phosphorus uptake and promoting plant growth. *Biol. Control* 123, 71–75. doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.05.003.

Ohri, P., and Pannu, S. K. 2010. Effect of phenolic compounds on nematodes-A review. *Journal of Applied and Natural Science.* 2(2), 344-350. Doi.org/10.31018/jans.v2i2.144.

Pacheco, P. V., Monteiro, T. S., Coutinho, R. R., Balbino, H. M., Freitas, L. G. 2020. Fungal biocontrol reduces the populations of the lesion nematode, *Pratylenchus brachyurus*, in soybean and corn. *Nematology*, 23(6), 619-626. Doi.org/10.1163/15685411-bja10064.

Pascholati, S. F., Dalio, R. J. D. 2018. Fisiologia do parasitismo: como as plantas se defendem dos patógenos. *Manual de Fitopatologia: Princípios e conceitos*, 1.

Piasecka, A., Jedrzejczak-Rey, N., Bednarek, P. 2015. Secondary metabolites in plant innate immunity: conserved function of divergent chemicals. *New Phytologist*, 206(3), 948-964. Doi.org/10.1111/nph.13325.

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. *Annu. Rev. Phytopathol.* 52, 347–375. doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102340.

Pompermayer, P., Falco, M. C., Parra, J. R., Silva-Filho, M. C. 2003. Coupling diet quality and Bowman-Birk and Kunitz-type soybean proteinase inhibitor effectiveness to *Diatraea saccharalis* development and mortality. *Entomologia Experimentalis et Applicata.* 109(3):217-24. doi.org/10.1046/j.0013-8703.2003.00107.x.

Porta, H., Rocha-Sosa, M. 2002. Plant lipoxygenases. Physiological and molecular features. *Plant physiology*, 130(1), 15-21. doi.org/10.1104/pp.010787.

Rahaman, M. M., Zwart, R. S., Rupasinghe, T. W., Hayden, H. L., Thompson, J. P. 2021. Metabolomic profiling of wheat genotypes resistant and susceptible to root-lesion nematode *Pratylenchus thornei*. *Plant Molecular Biology.* 106(4):381-406. 10.1007/s11103-021-01156-6.

Rashed, N. A., MacDonald, M. H., Matthews, B. F. 2008. Protease inhibitor expression in soybean roots exhibiting susceptible and resistant interactions with soybean cyst nematode. *Journal of nematology*, 40(2), 138.

Rocha, R. O., Morais, J. K., Oliveira, J. T., Oliveira, H. D., Sousa, D. O., Souza, C. E. A., Moreno, F. B., Monteiro-Moreira, A. C. O., Souza Jr, J. D. A., Sá, M. F. G., Vasconcelos, I. M. 2015. Proteome of soybean seed exudates contains plant defense-related proteins active against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(22), 5335-5343.

- Rodrigues, F. A., Jurick, W. M. II., Datnoff, L. E., Jones, J. B., Rollins, J. A. 2005. Silicon influences cytological and molecular events in compatible and incompatible rice-*Magnaporthe grisea* interactions. *Physiol Mol Plant P.* 66:144–159. Doi.org/ 10.1016/j.pmpp.2005.06.002.
- Rupe, J., Luttrell, R. G. 2008. Effect of Pests and Diseases on Soybean Quality. *Soybeans.* 93–116. Doi:10.1016/b978-1-893997-64-6.50007-x.
- Ryan, C. A. 1980. Wound-regulated synthesis and vacuolar compartmentation of proteinase inhibitors in plant leaves. *Current Topics in Cellular Regulation.* 17, 1-23. Doi.org/10.1016/b978-0-12-152817-1.50005-5.
- Shapiro, S. S., Wilk, M. B. 1965. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika,* 52(3/4), 591-611.
- Shoresh, M., Harman, G.E.,and Mastouri, F. 2010. Induced Systemic Resistance and Plant Responses to Fungal Biocontrol Agents. *Annu. Rev. Phytopathol.* 48, 21–43. doi.org/10.1146/annurev-phyto-073009-114450.
- Silva, J. F. V., Dias, W. P., Garcia, A., Carneiro, G. D. S. 2006. Perdas por nematoides chegam a 10, 6% da soja mundial. *Visão Agrícola,* 5, 103-107.
- Song, Y., Chen, D., Lu, K., Sun, Z., Zeng, R. 2015. Enhanced tomato disease resistance primed by arbuscular mycorrhizal fungus. *Front. Plant Sci.* 6, 786. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00786>.
- Tolbas, R. T. S., Rosso, C. L., Pentimone, I., Colagiero, M., Moustafa, M. A. M., Elshawaf, I. S. I., Bubici, G., Prigigallo, M. I., Aurelio Ciancio. 2021. Root endophytism by *Pochonia chlamydosporia* affects defense-gene expression in leaves of Monocot and Dicot hosts under multiple biotic interactions. *Plants,* 10(4), 718. Doi.org/ 10.3390/plants10040718.
- Trdá, L., Fernandez, O., Boutrot, F., Héloir, M.-C., Kelloniemi, J., Daire, X., Adrian, M., Clément, C., Zipfel, C., Dorey, S., Poinssot, B. 2013. The grapevine flagellin receptor VvFLS2 differentially recognizes flagellin-derived epitopes from the endophytic growth-promoting bacterium *Burkholderia phytofirmans* and plant pathogenic bacteria. *New Phytologist.* 201(4), 1371–1384. Doi.org/10.1111/nph.12592.
- Urwin, P. E., Atkinson, H. J., Waller, D. A., McPherson, M. J. 1995. Engineered oryzacystatin-I expressed in transgenic hairy roots confers resistance to *Globodera pallida*. *The Plant Journal.* 8(1), 121-131. Doi.org/10.1046/j.1365-313x.1995.08010121.x.
- Urwin, P. E., McPherson, M. J., Atkinson, H. J. 1998. Enhanced transgenic plant resistance to nematodes by dual proteinase inhibitor constructs. *Planta.* 204(4), 472-479. Doi.org/ 10.1007/s004250050281.
- Van Loon, L. C., Bakker, P. A. H. M., Pieterse, C. M. J. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual review of phytopathology.* 36, 453-483. Doi.org/ 10.1146/annurev.phyto.36.1.453.

Vital, C. E., Gomez, J. D., Vidigal, M. P., Barros, E., Silva, C. P. S., Vieira, N. M., Ramos, H. J. O. 2019. Phytohormone Profiling By Liquid Chromatography Coupled To Mass Spectrometry (Lc/Ms) (Protocolo On Line).

Wuyts, N., Swennen, R., De Waele, D. 2006. Effects of plant phenylpropanoid pathway products and selected terpenoids and alkaloids on the behaviour of the plant-parasitic nematodes *Radopholus similis*, *Pratylenchus penetrans* and *Meloidogyne incognita*. *Nematology* 8, 89–101. doi.org/10.1163/156854106776179953.

Zauza, E.A. V., Alfenas, A. celino C., Mafia, R. 2007. Esterilização, preparo de meios de cultura e fatores associados ao cultivo de fitopatógenos | Request PDF, in: Alfenas, A.C., Mafia, R.G. (Eds.), Métodos Em Fitopatologia. Editora UFV, Viçosa, pp. 23–52.

Zavala-Gonzalez, E. A., Escudero, N., Lopez-Moya, F., Aranda-Martinez, A., Exposito, A., Ricaño-Rodríguez, J., Naranjo-Ortiz1, M. A. Ramírez-Lepe, M., Lopez-Llorca, L. V. 2015. Some isolates of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* promote root growth and reduce flowering time of tomato. *Annals of Applied Biology*, 166(3), 472-483. doi.org/doi.org/10.1111/aab.12199.

Zavala-Gonzalez, E.A., Rodríguez-Cazorla, E., Escudero, N., Aranda-Martinez, A., Martínez-Laborda, A., Ramírez-Lepe, M., Vera, A., Lopez-Llorca, L. V. 2017. *Arabidopsis thaliana* root colonization by the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* is modulated by jasmonate signaling and leads to accelerated flowering and improved yield. *New Phytologist*. 213, 351–364. https://doi.org/10.1111/nph.14106.

Zieslin, N., Ben-Zaken R. 1993. Peroxidase activity in presence of phenolic substances in peduncles of rose flowers. *Plant Physiol Biochem*. 31:333–339. Doi.org/10.1007/BF02921193.

MATERIAL SUPLEMENTAR 1 (S1)

Tabela 1 – Caracterização química do solo usado no experimento em casa de vegetação.

pH H₂O	pH KCl	P mg/dm ³	K mg/dm ³	Ca²⁺ cmolc/dm ³	Mg²⁺ cmolc/dm ³	Al³⁺ cmolc/dm ³
6,74	6,02	37,8	35	1,46	0,56	0
H + Al	SB	t	T	V	MO	P-Rem
cmolc/dm ³	cmolc/dm ³	cmolc/dm ³	cmolc/dm ³	%	dag/kg	mg/L
0,8	2,11	2,11	2,91	72,5	0,41	26,1

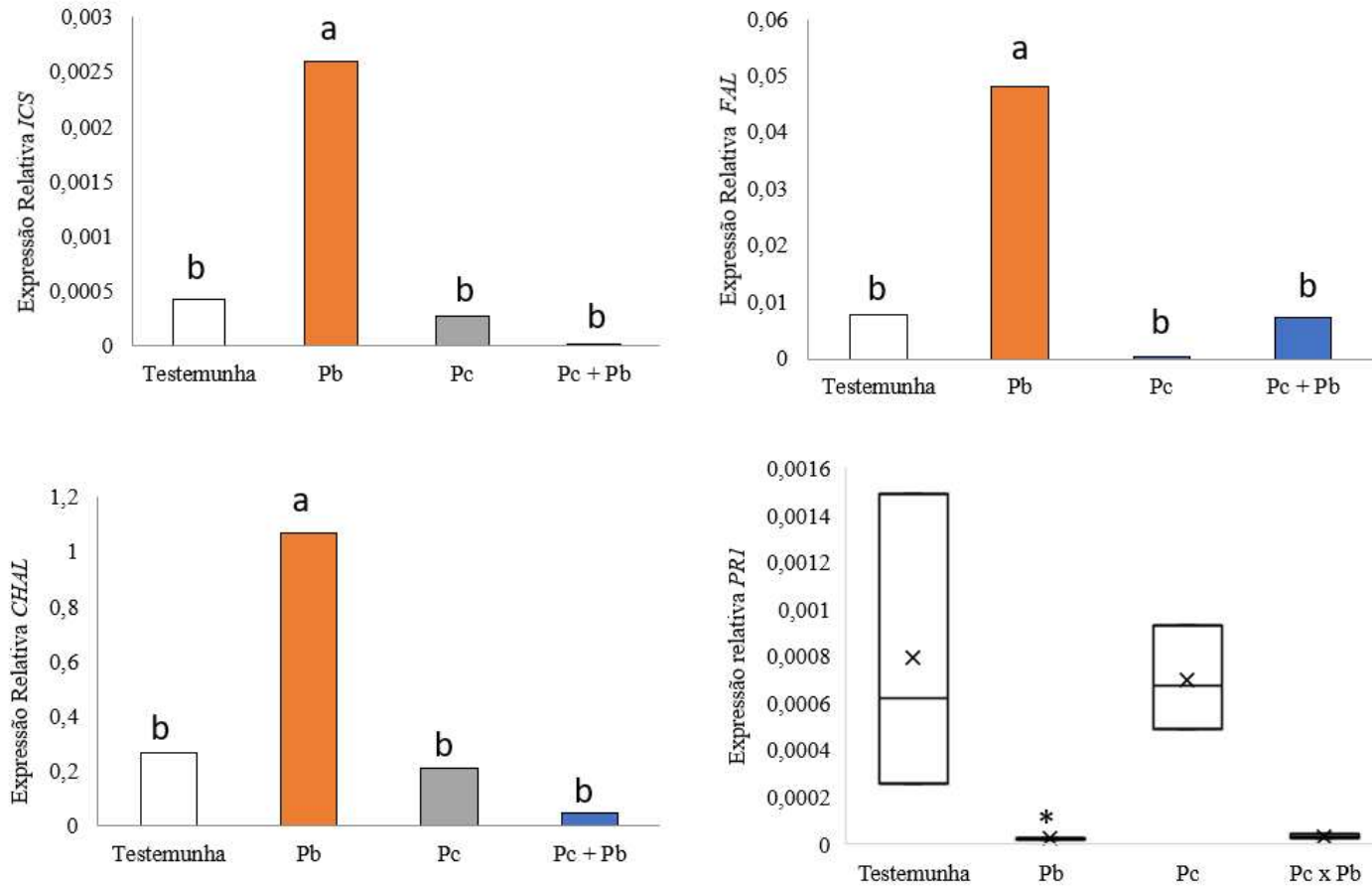
pH da água na relação solo/solução de 1:2,5; P e K – Extrator Mehlich⁻¹; extrator de Ca²⁺, Mg²⁺, Al³⁺ - KCl (1,0 mol L⁻¹); H+Al – Extrator de Acetato de Cálcio 0,5 mol L⁻¹ (pH 7,0); MO- Matéria Orgânica.

MATERIAL SUPLEMENTAR 2 (S2)

Resistência Sistêmica Adquirida				
Gene	Alvo	Sentido 5'-3'	Primer	Referência
Isochorismato sintase (<i>ICS1</i>)	Biossíntese do ácido salicílico	F	GAAACAGTACAGTCCCTGCT	Einhardt et al., 2020
		R	TGTGGCTGGGAAAAGAAAAC	
		F	GTTTCCCCTGCTTTGAAAGAGA	
Chalcona isomerase (<i>CHAL</i>)	Biossíntese dos flavonóides	R	GGATTGGCCTCTAACTCTTTGAAG	Cruz, 2020
		F	GTGCAAGGGCTGCTTATG	Gao et al., 2018
Fenilalanina amônia-liase (<i>FAL</i>)	Via do fenilpropanóides	R	CCCAGTCCCTAATTCCTCTC	
		F	GCATCATGAATTTAGCCAACG	Youssef et al., 2013
Proteína relacionada à patogênese (<i>PRI</i>)	Marcador para SAR	R	TTCCAGGTGACCAAGCAAGT	
		Resistência Sistêmica Induzida		
Ácido 1-carboxílico-1- aminociclopropano oxidase (<i>ACO</i>)	Biossíntese do etileno	F	CCAATGCGCCATTCCATTGTTG	Rodrigues et al., 2022
		R	TGAGGCTACGGACATTCTGGTC	
Ácido 1-carboxílico-1- aminociclopropano sintase (<i>ACS</i>)	Biossíntese do ácido jasmônico	F	CTCTTAACCTTCATTCTTGCTAACC	Rashed et al., 2008
		R	TTGCTTCTGCTTCTTTGTATGC	
12-Oxofitodienoato redutase 3 (<i>OPR3</i>)	Inibidores de tripsina	F	GTGTATCAGCCTGGTGGG	Ibrahim et al., 2011
		R	GCACGAGGCTCTGGATAG	
Inibidor da tripsina de Kunitz (<i>KTI</i>)	Inibidores de serino protease	F	AAAGGGCGGCGGAATAGA	Rashed et al., 2008
		R	CTGGCAGACCCTTGAGAATAAC	
Inibidores de serino de Bowman-Birk (<i>BB1</i>)	Início da RSI	F	AATAATGAGCATGTTCCAGTG	Ibrahim et al., 2011
		R	GGCCTAGTAGCTTTTATTCATT	
Lipoxigenase (<i>LOX</i>)	Início da RSI	F	ATGTTCAACCGTATCATGTTCA	Ibrahim et al., 2011
		R	GGGTATCAAATCCAAGTTGGTG	
Gene constitutivo				
Ubiquitina (<i>UBIQ</i>)	Gene constitutivo	F	TGTAATGTTGGATGTGTTCCC	Einhardt et al., 2020
		R	GGGACACAATTGAGTTCAACA	

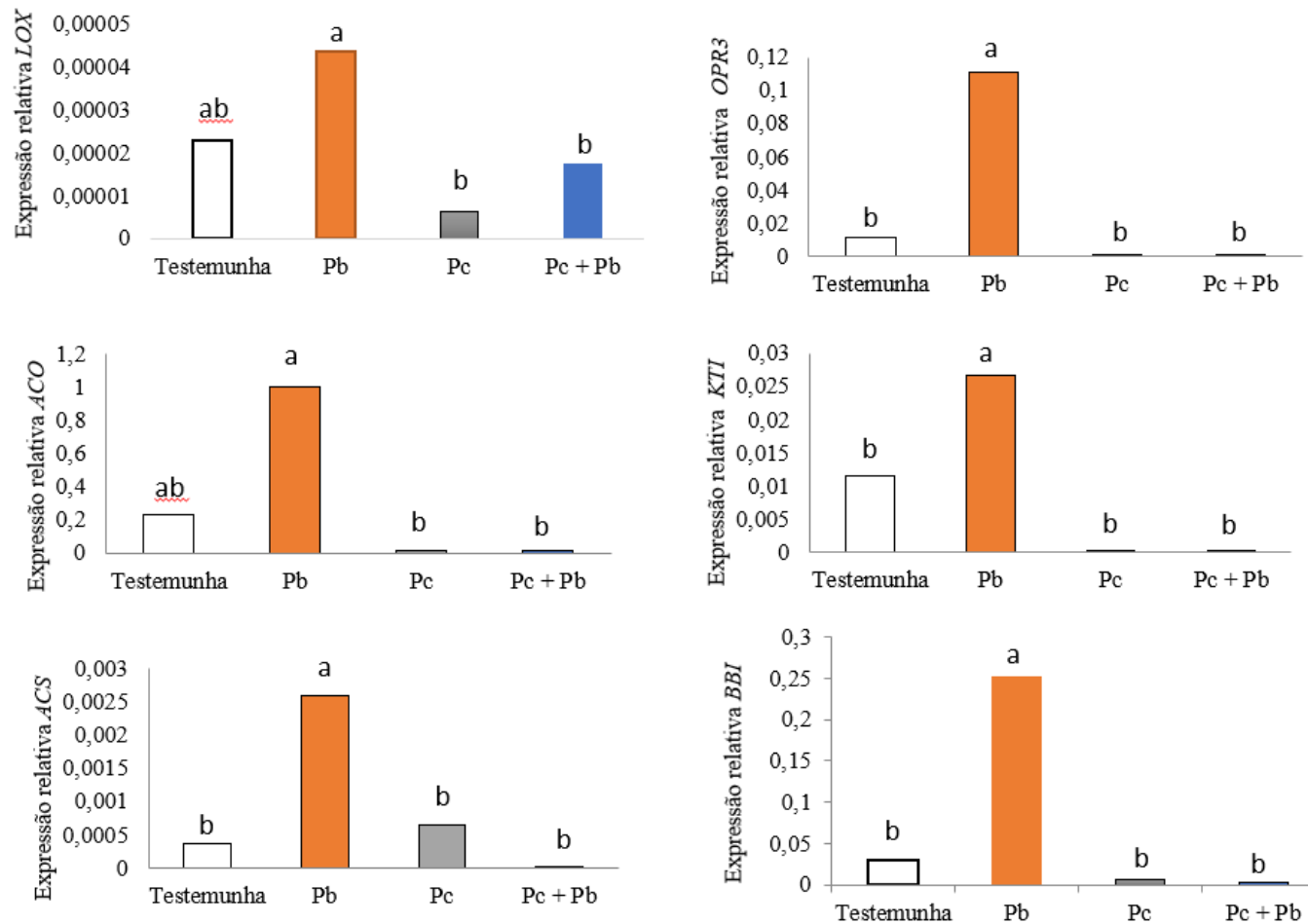
Tabela 2 – Genes e suas sequências de primer analisados nas raízes de plantas de soja não tratadas ou tratadas com *Pochonia chlamydosporia* e inoculadas ou não inoculadas com *Pratylenchus brachyurus* usando PCR de transcrição reversa quantitativa. F – Sentido 5' – 3'; R – Antisentido 5' – 3'

MATERIAL SUPLEMENTAR 3 (S3a)



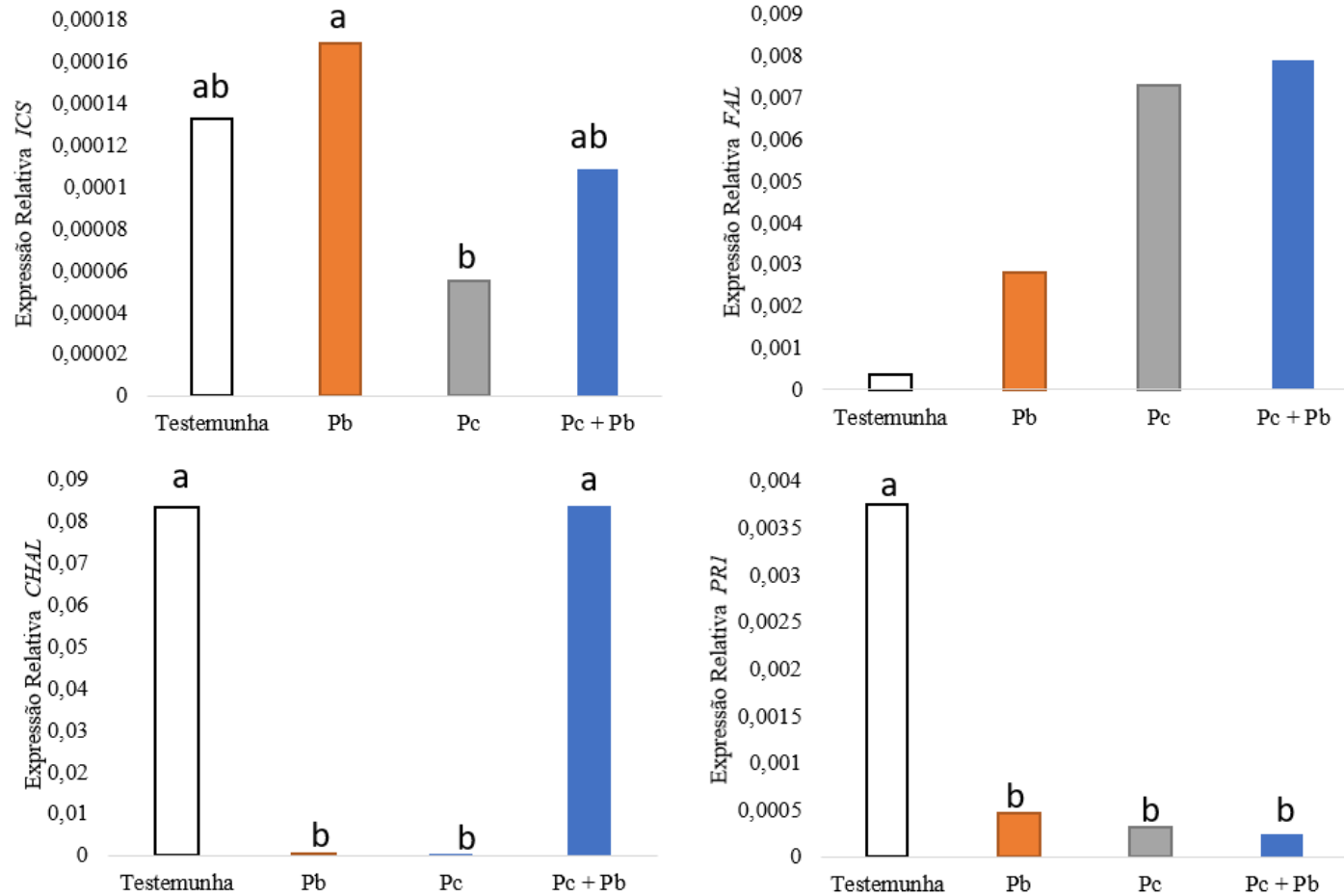
Material suplementar S3a - Expressão relativa de genes relacionados à defesa mediada pela resistência sistêmica adquirida (SAR) (7 dias após a inoculação) em raízes de soja tratadas com o nematoide *Pratylenchus brachyurus* (Pb) ou com o fungo *Pochonia chlamydosporia* (Pc) e com a combinação dos dois microrganismos (Pc + Pb). A testemunha corresponde às plantas que não receberam o fungo ou nematoide. Colunas com a mesma letra não são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). As colunas com * indicam que o tratamento diferiu do Controle, pelo teste Dunnett ($\alpha = 0,05$).

MATERIAL SUPLEMENTAR 4 (S3b)



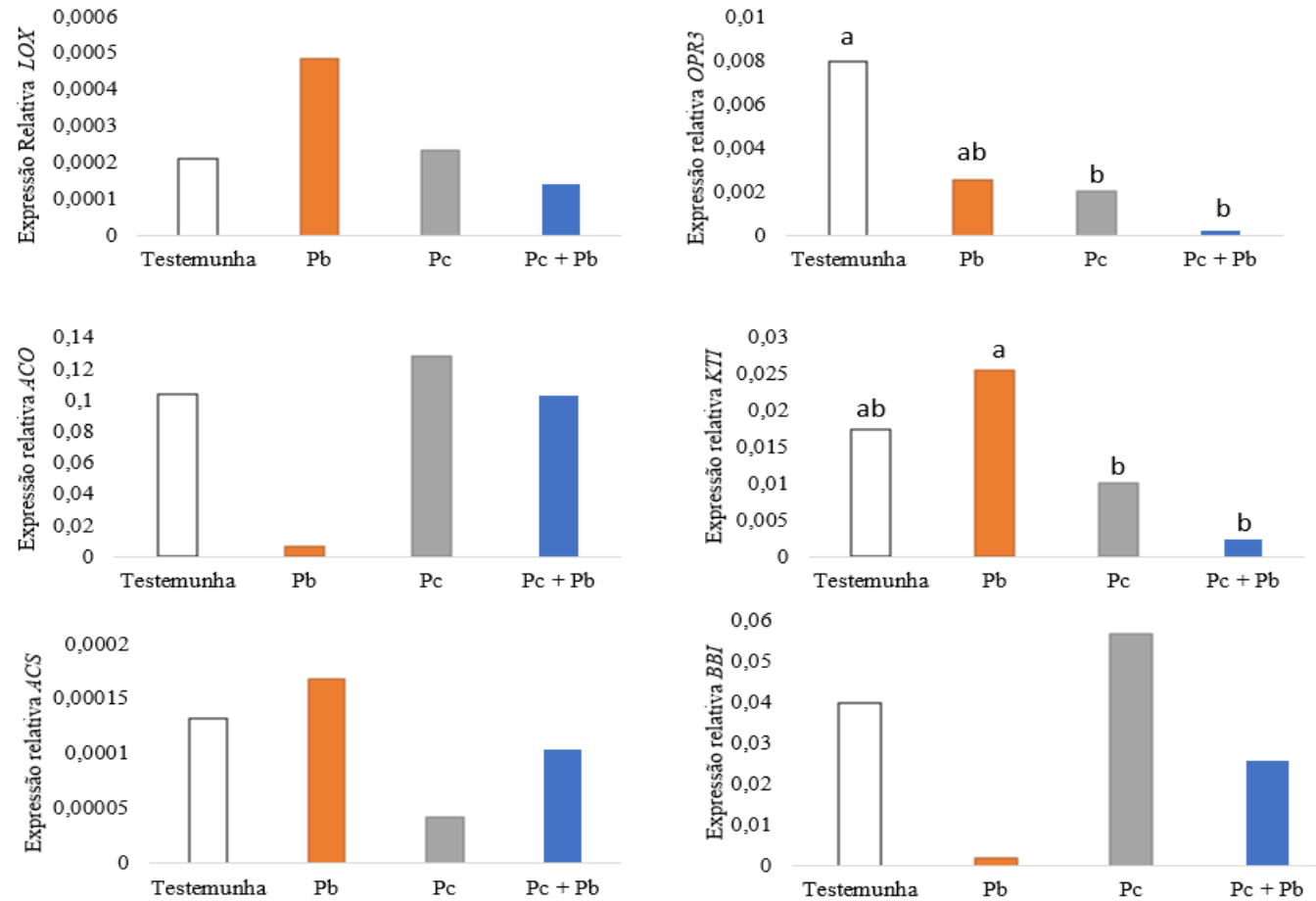
Material suplementar S3b - Expressão relativa de genes relacionados à defesa mediada pela resistência sistêmica induzida (ISR) (7 dias após a inoculação) em raízes de soja tratadas com o nematoide *Pratylenchus brachyurus* (Pb) ou com o fungo *Pochonia chlamydosporia* (Pc) e com a combinação dos dois microrganismos (Pc + Pb). A testemunha corresponde às plantas que não receberam o fungo ou nematoide. Colunas com a mesma letra não são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

MATERIAL SUPLEMENTAR 4 (S4a)



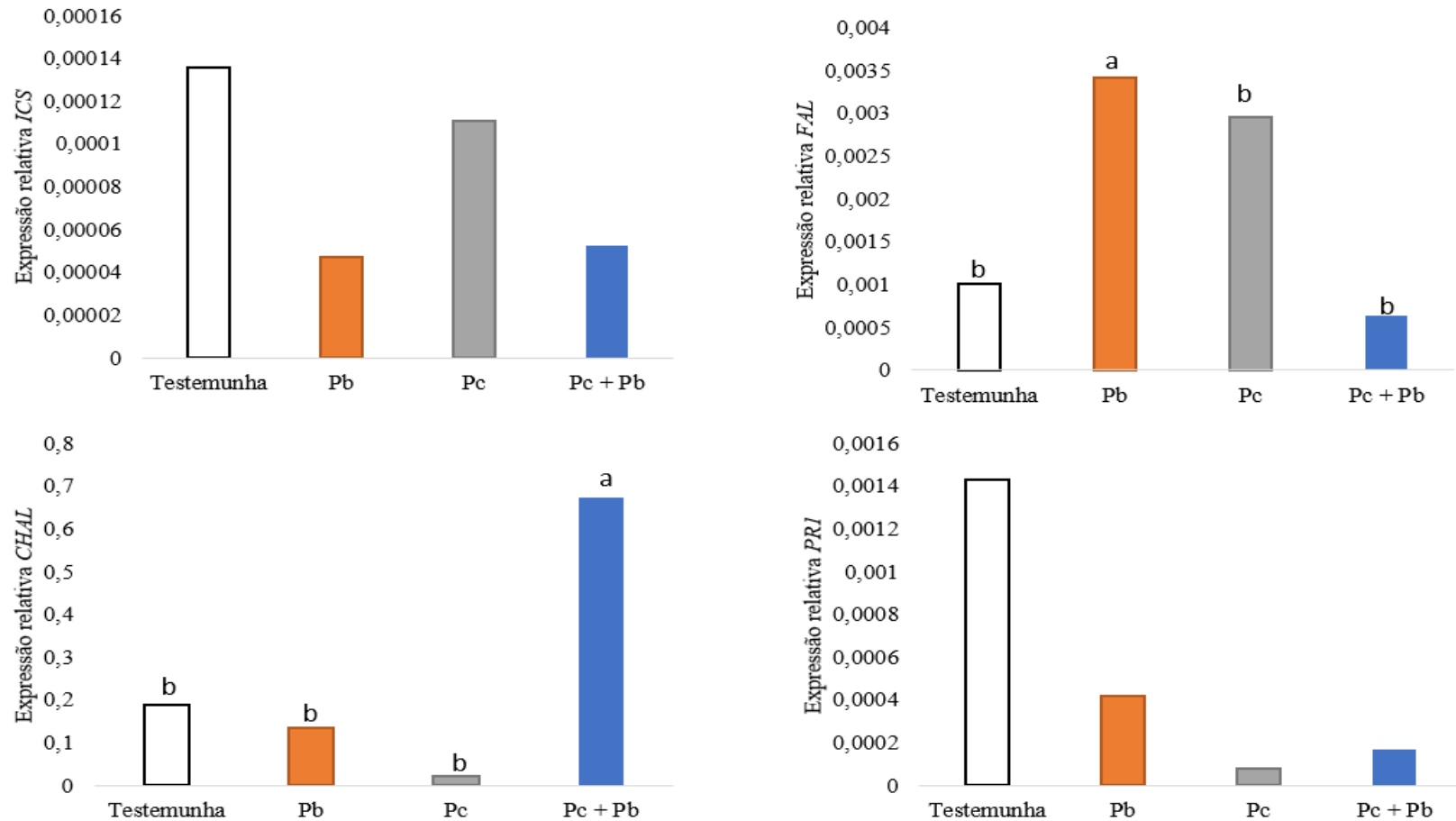
Material suplementar S4a - Expressão relativa de genes relacionados à defesa mediada pela resistência sistêmica adquirida (SAR) (15 dias após a inoculação) em raízes de soja tratadas com o nematoide *Pratylenchus brachyurus* (Pb) ou com o fungo *Pochonia chlamydosporia* (Pc) e com a combinação dos dois microrganismos (Pc + Pb). A testemunha corresponde às plantas que não receberam o fungo ou nematoide. Colunas com a mesma letra não são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

MATERIAL SUPLEMENTAR 4 (S4b)



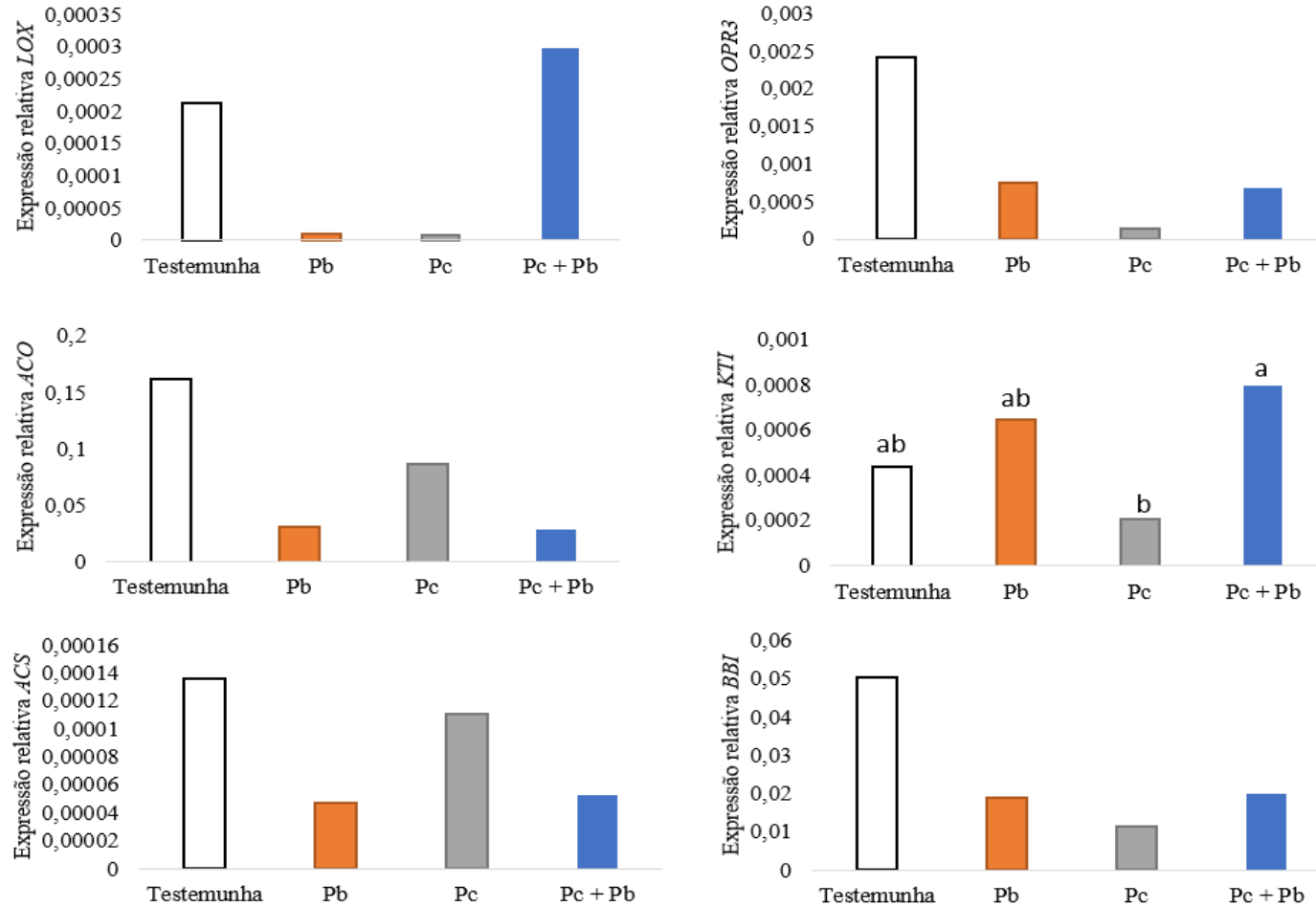
Material suplementar S4b - Expressão relativa de genes relacionados à defesa mediada pela resistência sistêmica induzida (ISR) (15 dias após a inoculação) em raízes de soja tratadas com o nematoide *Pratylenchus brachyurus* (Pb) ou com o fungo *Pochonia chlamydosporia* (Pc) e com a combinação dos dois microrganismos (Pc + Pb). A testemunha corresponde às plantas que não receberam o fungo ou nematoide. Colunas com a mesma letra não são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

MATERIAL SUPLEMENTAR 5 (S5a)



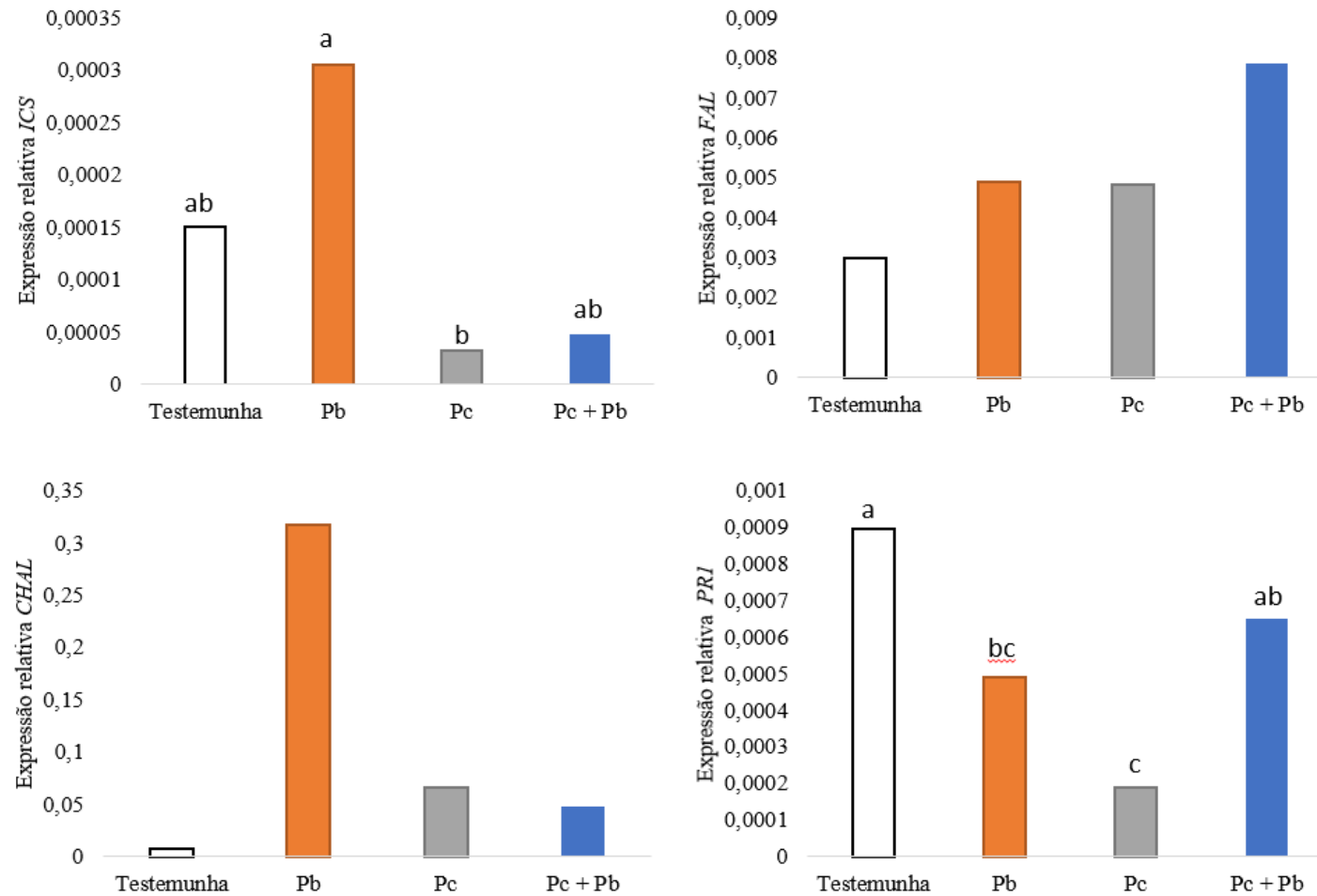
Material suplementar S5a - Expressão relativa de genes relacionados à defesa mediada pela resistência sistêmica adquirida (SAR) (30 dias após a inoculação) em raízes de soja tratadas com o nematoide *Pratylenchus brachyurus* (Pb) ou com o fungo *Pochonia chlamydosporia* (Pc) e com a combinação dos dois microrganismos (Pc + Pb). A testemunha corresponde às plantas que não receberam o fungo ou nematoide. Colunas com a mesma letra não são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

MATERIAL SUPLEMENTAR 5 (S5b)



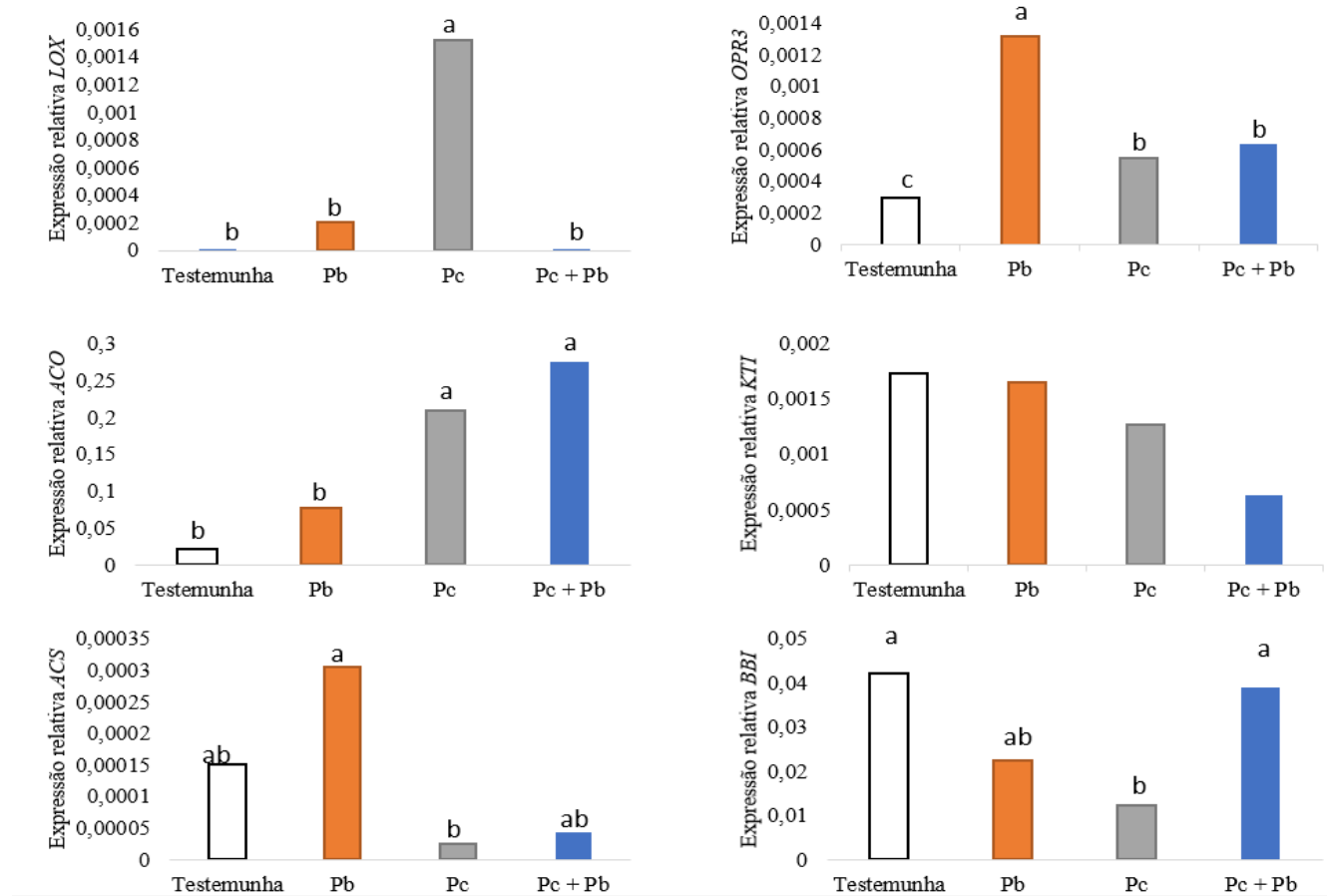
Material suplementar S5b - Expressão relativa de genes relacionados à defesa mediada pela resistência sistêmica induzida (ISR) (30 dias após a inoculação) em raízes de soja tratadas com o nematoide *Pratylenchus brachyurus* (Pb) ou com o fungo *Pochonia chlamydosporia* (Pc) e com a combinação dos dois microrganismos (Pc + Pb). A testemunha corresponde às plantas que não receberam o fungo ou nematoide. Colunas com a mesma letra não são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

MATERIAL SUPLEMENTAR 6 (S6a)



Material suplementar S6a - Expressão relativa de genes relacionados à defesa mediada pela resistência sistêmica adquirida (SAR) (60 dias após a inoculação) em raízes de soja tratadas com o nematoide *Pratylenchus brachyurus* (Pb) ou com o fungo *Pochonia chlamydosporia* (Pc) e com a combinação dos dois microrganismos (Pc + Pb). A testemunha corresponde às plantas que não receberam o fungo ou nematoide. Colunas com a mesma letra não são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

MATERIAL SUPLEMENTAR 6 (S6b)



Material suplementar S6b - Expressão relativa de genes relacionados à defesa mediada pela resistência sistêmica induzida (ISR) (60 dias após a inoculação) em raízes de soja tratadas com o nematoide *Pratylenchus brachyurus* (Pb) ou com o fungo *Pochonia chlamydosporia* (Pc) e com a combinação dos dois microrganismos (Pc + Pb). A testemunha corresponde às plantas que não receberam o fungo ou nematoide. Colunas com a mesma letra não são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

CAPÍTULO 2

Mecanismos envolvidos no controle de nematoides em soja por *Bacillus thuringiensis*

RESUMO

A soja é uma cultura de grande importância mundial, uma vez que essa é a principal fonte de farelo proteico e de óleo vegetal. Porém, a atividade de nematoides parasitas de plantas (PPNs) sobre essa cultura ocasiona perdas significativas na produção de grãos, resultando na busca por microrganismos antagonistas para reduzir as populações desses nematoides de forma eficiente e sustentável. Desse modo, neste artigo, foi investigado o potencial de quatro isolados de *Bacillus thuringiensis* – e de seus metabólitos – em reduzir populações de *Meloidogyne javanica*, *Heterodera glycines* e *Pratylenchus brachyurus* na soja. Também foi investigado o potencial desses isolados de se associarem às raízes e de induzir resistência sistêmica em soja. Para isso, os experimentos de biocontrole com as células bacterianas e com os metabólitos de *B. thuringiensis* foram conduzidos em casa de vegetação. Plantas tratadas ou não com *B. thuringiensis* foram confrontadas com *M. javanica*, *P. brachyurus* ou *H. glycines* para se avaliar a expressão de genes de defesa da soja, a concentração de compostos fenólicos totais (TSP) e de derivados de lignina-ácido tioglicólico (LGTA). Os isolados de *B. thuringiensis* foram eficientes em reduzir a população dos nematoides de 25,8 a 55,9% em relação ao tratamento controle. O mesmo potencial foi observado para os metabólitos, chegando a reprimir completamente a eclosão dos nematoides. Os isolados testados cresceram sobre as raízes de soja, criando um biofilme, que pode estar relacionado com a redução da população de PPNs. Por fim, a avaliação dos genes relacionados à defesa e a TSP e LGTA, evidenciaram o potencial de *B. thuringiensis* em induzir resistência em plantas contra PPNs. *Bacillus thuringiensis* foi capaz de reduzir a população dos principais nematoides parasitas da soja, por meio de produtos do seu metabolismo e por induzir resistência sistêmica em plantas.

Palavras-chave: Controle biológico. *Bacillus thuringiensis*. *Heterodera glycines*. *Meloidogyne javanica*. *Pratylenchus brachyurus*. Indução de resistência. Soja.

ABSTRACT

Soybean is a crop of great importance worldwide, since it is the main source of protein meal and vegetable oil. However, the activity of plant parasitic nematodes (PPNs) on this crop causes significant losses in grain production, resulting in the search for antagonistic microorganisms to reduce the populations of these nematodes in an efficient and sustainable way. Thus, in this article, the potential of four *Bacillus thuringiensis* isolates – and their metabolites – to reduce populations of *Meloidogyne javanica*, *Heterodera glycines* and *Pratylenchus brachyurus* in soybean was investigated. The potential of these isolates to associate with roots, to promote plant growth and to induce systemic resistance in soybean was also investigated. For this, biocontrol experiments with bacterial cells and with *B. thuringiensis* metabolites were carried out in a greenhouse. Plants treated or not with *B. thuringiensis* were confronted with *M. javanica*, *P. brachyurus* or *H. glycines* to evaluate the expression of soybean defense genes, the concentration of total phenolic compounds (TSP) and derivatives of lignin-thioglycolic acid (LGTA). The *B. thuringiensis* isolates were efficient in reducing the population of nematodes from 25.8 to 55.9% in relation to the control treatment. The metabolites also presented a negative effect on the nematodes, to the point of completely repressing the hatching of juveniles. The tested isolates grew on soybean roots, creating a biofilm, which may be related to the reduction in the population of PPNs. Finally, the evaluation of genes related to defense and TSP and LGTA, evidenced the potential of *B. thuringiensis* to induce resistance in plants against PPNs. *Bacillus thuringiensis* was able to reduce the population of the main parasitic nematodes of soybean, through products of their metabolism and by inducing systemic resistance in plants.

Key words: Biological control. *Bacillus thuringiensis*. *Heterodera glycines*. *Meloidogyne javanica*. *Pratylenchus brachyurus*. Resistance induction. Soybean.

1. INTRODUÇÃO

A cultura da soja está entre os dez cultivos de maior importância econômica em nível mundial, já que esta é a principal fonte de farelo proteico e de óleo vegetal (Bezerra et al., 2015; Jia et al., 2020). O Brasil é atualmente o maior produtor e exportador de soja, produzindo 121,79 milhões de toneladas em 38,502 milhões de hectares (FAOSTAT, 2020; CONAB, 2021). Apesar disso, essa cultura é hospedeira de diversos patógenos e pragas, o que podem acarretar o aumento do custo de produção e na redução da produtividade e da qualidade dos grãos (Sediyama et al., 2015). Dentre os organismos que causam prejuízos na produção de grãos de soja, pode-se destacar os nematoides parasitas de plantas (PPNs), que, de acordo com estimativas, podem ocasionar perdas de até 10,6% na produção mundial de soja (Silva et al., 2006). São conhecidos, até o momento, 100 espécies de PPNs contabilizadas em 50 gêneros capazes de parasitar a soja, porém, as espécies *Meloidogyne javanica*, *Heterodera glycines* e *Pratylenchus brachyurus* se destacam por serem altamente agressivos à soja, apresentarem alta taxa de reprodução e estarem amplamente distribuídos em campos de produção dessa cultura (Dias et al., 2010; Jones et al., 2013)..

Meloidogyne javanica e *H. glycines* são nematoides endoparasitas sedentários, que após o juvenil de segundo estágio (J2) penetrar nas raízes, inicia a alimentação em células que irão se diferenciar para se tornarem sítios de alimentação desse nematode. Porém, esses gêneros induzem a formação do local de alimentação de forma diferente, por meio da liberação de toxinas nas células e interferência na expressão genes da planta (Haegeman et al., 2012; Hewezi e Baum, 2013). O sítio de alimentação formado por *M. javanica* é chamado de células gigantes, resultantes de aumento do tamanho e número de núcleos das células, já *H. glycines* induz a formação dos sincícios por meio da dissolução das paredes celulares de células adjacentes e fusão de protoplastos. Outra diferença entre estes nematoides é que as fêmeas de *H. glycines* após a morte tornam-se estrutura de resistência para seus ovos. Tal estrutura é chamada de cisto (Niblack et al., 2006), mas *M. javanica* não produz estrutura de resistência. *Pratylenchus brachyurus* é um nematoide endoparasita migrador, o que significa que após penetrarem o tecido radicular, os indivíduos se movimentam pelos tecidos alimentando-se das células vegetais e ovipositando dentro e fora das raízes. Tal comportamento acarreta a formação de galerias necróticas nas raízes, o que faz com que esse nematoide seja conhecido como nematoide-das-lesões radiculares (Castillo e Vovlas, 2007).

Diversas técnicas como o controle químico, controle cultural, controle genético e o controle biológico são empregadas de forma integrativa a fim de reduzir a população desses microrganismos no solo e, conseqüentemente, garantir a produção (Macedo et al., 2012). Dentre essas técnicas, o controle biológico, que consiste na introdução artificial de antagonistas no ambiente ou no estímulo do desenvolvimento de microrganismos nativos (Baker e Cook, 1974) vem ganhando notoriedade devido à busca incessante por parte de pesquisadores por microrganismos eficientes no manejo de nematoides e desenvolvimento de bionematicidas para serem disponibilizados para uso no mercado. Bactérias e fungos são comumente mais utilizados devido à facilidade de produção massal e por serem altamente eficientes, porém as bactérias são mais frequentes e representam 80% dos produtos registrados no Brasil, sendo, dentre esses, apenas um registro não pertencente ao gênero *Bacillus*. *Bacillus firmus*, *B. methylotrophicus*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. paralicheniformis* e *B. velezensis*, isolados ou em combinação, são exaustivamente estudados para o manejo de nematoides e compõem o princípio ativo dos produtos registrados no Brasil, e atualmente um único isolado da espécie *B. thuringiensis*, em combinação com outras bactérias do mesmo gênero, compõe o princípio ativo de dois produtos registrados no ministério da agricultura, pecuária e abastecimento (MAPA) (AGROFIT, 2022), carecendo de variedade de isolados desta espécie para esta finalidade. A bactéria *B. thuringiensis* está estreitamente relacionada com a história do controle biológico de pragas agrícolas (Beegle e Yamamoto, 1992). Essa espécie de bactéria foi descrita em 1901 no Japão como a responsável por causar prejuízos ao infectar o bicho-da-seda (*Bombyx mori*). Posteriormente, *B. thuringiensis* passou a ser comercializado como produto agrícola para o controle de diversos insetos-pragas e, atualmente, com as ferramentas de biologia molecular, plantas geneticamente modificadas expressam a proteína cristal (Cry) de *B. thuringiensis*, que são tóxicas a diversas ordens de insetos, mas não aos seres humanos (Roh et al., 2007). Essas proteínas, Cry, causam a abertura de poros na membrana plasmática e o desequilíbrio osmótico, acarretando a lise celular e a morte do hospedeiro (Melo et al., 2014). Na fitonematologia, a eficiência de *B. thuringiensis* como agente biocontrole de nematoide já foi confirmado e plantas geneticamente modificadas resistentes ao parasitismo de nematoides devido à atividade nematicida de proteínas Cry já foram desenvolvidas experimentalmente (Li et al., 2008; Yu et al., 2008; Zi-Quan et al., 2008).

Os modos de ação de bactérias antagonistas a PPNs abrangem parasitismo direto (restrito ao gênero *Pasteuria*), competição, produção de compostos tóxicos e indução de resistência sistêmica. Um exemplo de competição, seria a formação de biofilme bacteriano

sobre as raízes, dificultado ou impedido a localização e a penetração do nematoide nas raízes. Em relação à indução de resistência, quando plantas de tomateiro são tratadas com metabólitos, ou diretamente com *B. thuringiensis*, ocorre maior expressão de genes e atividade de enzimas relacionadas à defesa, reduzindo, assim, a severidade de infecções por *Rashtonia solanacearum* e *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Akram et al., 2013; Takahashi et al., 2014; Yoshida et al., 2019). Desse modo, justifica-se avaliar a expressão de genes relacionados à defesa em plantas de soja tratadas com *B. thuringiensis* para comprovar se essa bactéria atua como indutora de resistência a PPNs.

Dessa forma, nesse trabalho, foi investigado o potencial nematicida de quatro isolados bacterianos de *B. thuringiensis* no manejo de nematoides importantes da soja – *M. javanica*, *H. glycines* e *P. brachyurus*. Posteriormente, foram avaliados o potencial dos metabólitos secundários produzidos por esses isolados em conter a população desses nematoides, a rizocompetência dos isolados, a capacidade de promover crescimento em plantas de soja e, por último, a expressão diferencial de genes relacionados à via de defesa mediada pelo ácido salicílico e ácido jasmônico em plantas de soja tratadas *B. thuringiensis* e/ou PPNs, a fim de elucidar seus mecanismos de ação.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção de inóculo de *Meloidogyne javanica*, *Heterodera glycines* e *Pratylenchus brachyurus*

As populações puras de *Pratylenchus brachyurus* (Goiás – Brasil), *Meloidogyne javanica* (Viçosa – Minas Gerais, Brasil) e *Heterodera glycines* (Goiás – Brasil) foram mantidas em casa de vegetação em plantas suscetíveis. Sendo assim, *P. brachyurus* foi mantido em plantas de sorgo, *M. javanica* em tomateiro e *H. glycines* em soja. A obtenção de ovos de *M. javanica* foi por meio da técnica descrita por Hussey e Barker (1973), modificada por Bonetti e Ferraz, (1981), enquanto a extração de ovos de *H. glycines* foi feita seguindo a metodologia descrita em Machado e Silva (2019). A extração de espécimes de *P. brachyurus* ocorreu como descrito por Coolen e D’Herde (1972). Posteriormente a isso, com auxílio da câmara de Peters, foi feita a calibração da suspensão aquosa contendo ovos ou espécimes dos PPNs para posterior inoculação das plantas pela infestação do solo.

Para obtenção dos juvenis de segundo estágio (J2), ovos de *M. javanica* e ovos de *H. glycines* foram depositados em câmara de eclosão contendo 0,1M de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ a 27 °C por

3 dias (Acedo e Dropkin, 1982; Tefft e Bone, 1984). Após isso, os J2 foram recolhidos, lavados em água corrente e recuperados em peneira de malha de abertura de 25 μm . Logo após, os J2 foram centrifugados a 6000 rpm por 7s e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, os J2 foram suspensos em 200 μL de uma solução contendo cloranfenicol a 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$, nistidina a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e penicilina 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, onde foram mantidos por 20 min em temperatura ambiente. O processo de centrifugar e ressuspender os J2 em antibiótico foi repetido por 3 vezes, sendo, por fim, suspensos em água esterilizada. Assim como J2 de *M. javanica* e os J2 de *H. glycines*, espécimes de *P. brachyurus* também foram desinfestados em solução contendo antibióticos.

Para os testes em condições de *in vitro*, ovos de *M. javanica* foram centrifugados em sacarose (Jenkins, 1964) e foram desinfestados em antibióticos, como descrito anteriormente.

2.2. Obtenção, cultivo e calibração da suspensão de *B. thuringiensis*

2.2.1. Os isolados e o seu cultivo em meio de cultura: foram utilizados nesse estudo quatro isolados bacterianos de *B. thuringiensis* da coleção do Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA) do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária da Unesp, Campus de Jaboticabal. Os isolados foram denominados: T03, M51, Br58 e T13. Inicialmente, as bactérias armazenadas em sílica-gel foram reativadas em meio cultivo LB líquido a 2% (M/V) previamente esterilizado e mantidas a 180 rpm, por 48h a 28 °C. Para todos os ensaios experimentais posteriores, seguiu-se o mesmo processo de crescimento bacteriano, em meio LB líquido a 2% (M/V) a 180 rpm, por 48h a 28 °C.

2.2.2. Calibração da suspensão bacteriana: em Erlenmeyer de 50 mL de capacidade foi adicionado 25 mL de meio LB a 2% (M/V) e, posteriormente, feita a esterilização seguindo as recomendações de Zauza et al., (2016). Após isso, foi adicionado células bacterianas do isolado Br58 e mantidos a 180 rpm, por 48h a 28 °C. Em seguida, a suspensão bacteriana foi centrifugada a 8000 rpm por 10 min, o sobrenadante foi descartado e o pelete formado foi suspenso em solução salina (0,85% de NaCl; 0,3% de DMSO 80). O processo de centrifugação e adição de solução salina foi repetido por 3 vezes e, em seguida, foi realizado a diluição seriada da suspensão bacteriana e o teste para contagem de unidade formadoras de colônia (UFC) em microgota foi aplicado, seguindo o protocolo descrito em Romeiro (2013). Com auxílio de um espectrofotômetro, a densidade óptica em 600 nm ('optical density' – OD₆₀₀) de cada diluição foi mensurada e correlacionada com o número de UFC. Sendo assim, foi feita a correlação da leitura de OD₆₀₀ de 0,559; 0,135; 0,029; e 0,007 com o número de UFC (Figura 1). Posteriormente, a suspensão bacteriana foi calibrada para a OD₆₀₀ de 0,135 (~

4E+08 UFC/mL) e, para o tratamento de sementes, foi utilizada a concentração de 2 mL para cada 1kg de sementes de soja.

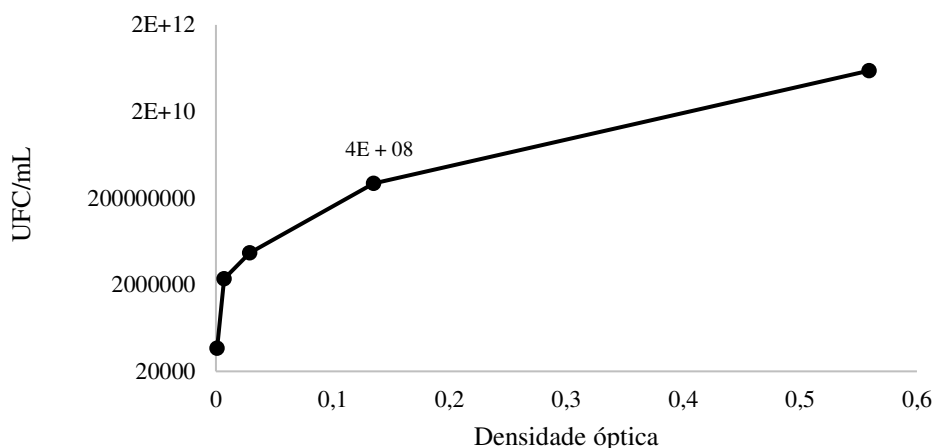


Figura 1 – Correlação entre absorvância e o número de unidade formadoras de colônias (UFC) de *Bacillus thuringiensis*.

2.3. Tratamento de sementes (TS) com *B. thuringiensis*

Para os ensaios experimentais, sementes de soja cv. 57HO123IPRO foram desinfestadas superficialmente. Para isso, as sementes foram mantidas em câmara fechada contendo HCl 37% e NaClO (3:100) (V:V) por 4 horas. Logo após isso, as sementes foram depositadas em tudo tipo Falcon de 50 mL e foi adicionado a suspensão bacteriana previamente calibrada para OD₆₀₀ a 100 nm. Os tubos foram cuidadosamente agitados para a dispersão homogênea das bactérias sobre a sementes. A concentração utilizada foi de 2 mL/Kg de sementes. Antes da semeadura, os tubos Falcon foram mantidos em temperatura ambiente até que as sementes estivessem secas.

2.4. Experimento de casa de vegetação: *B. thuringiensis* no controle *M. javanica*, *P. brachyurus* e *H. glycines* em soja

Substrato composto de latossolo vermelho-amarelo (solo arenoso – horizonte C) e areia lavada na proporção de 3:1 (V:V) (Franco-Arenosa) foi esterilizado seguindo o protocolo de Zauza et al., (2016) e o perfil químico do solo foi ajustado para condições ideais para o cultivo da soja (Tabela 1). Em seguida, sementes de soja previamente tratadas com *B. thuringiensis* foram depositadas em vasos de 2 L de capacidade contendo o solo esterilizado. Sete dias após a semeadura, foi adicionada uma suspensão aquosa contendo 800 espécimes de *P. brachyurus*

ou 1000 ovos de *M. javanica* ou 1000 ovos de *H. glycines*, para os devidos tratamentos. As três espécies de nematoides foram confrontadas com os 4 isolados bacterianos, sem mistura de espécies de nematoides e de isolados de *B. thuringiensis*. O ensaio permaneceu em casa de vegetação por 60 dias após a inoculação (dai) a ± 27 °C e em seguida os ovos e espécimes dos nematoides foram extraídos e a população mensurada. A massa de raiz frescas dos tratamentos foram consideradas e comparadas entre si por análise estatística. Para esse ensaio experimental, foi adotado o delineamento inteiramente casualizado (DIC), sendo que cada tratamento foi composto por seis repetições.

pH H ₂ O	pH KCl	P	K mg/dm ³	Ca ²⁺	Mg ²⁺ cmolc/dm ³	Al ³⁺
6,74	6,02	37,8	35	1,46	0,56	0
H + Al	SB	t	T	V	MO	P-Rem
		cmolc/dm ³		%	dag/kg	mg/L
0,8	2,11	2,11	2,91	72,5	0,41	26,1

Tabela 1 – Caracterização química do solo usado nos experimentos de casa de vegetação. pH na água usando a razão solo/solução de 1:2.5; P e K – Mehlich⁻¹ Extrator; Ca²⁺, Mg²⁺, Al³⁺ - KCl extrator (1.0 mol L⁻¹); H+Al – Extrator de acetato de cálcio 0.5 mol L⁻¹ (pH 7.0); OM- Matéria Orgânica.

2.5. Extração de metabólitos de *B. thuringiensis* e controle de *M. javanica*, *P. brachyurus* e *H. glycines*

2.5.1. Preparo do extrato contendo metabólitos de *B. thuringiensis*: para esse teste, os isolados bacterianos T03, Br58 e M51 foram crescidos em meio LB líquido a 2% (M/V) como anteriormente descrito. Para a obtenção dos metabólitos livres de células bacterianas, seguiu-se o procedimento de Gao et al. (2016). Sendo assim, após o período de 48 h, o meio LB contendo células bacterianas foi centrifugado a 8000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi transferido para tubos tipo eppendorfs esterilizados com capacidade de 2 mL e o pelete foi descartado. Para eliminar todas as células bacterianas, com auxílio de membrana millipore de abertura de 0.45 µm sobre uma de abertura de 22 µm, o sobrenadante foi filtrado. Logo em seguida, o sobrenadante resultante foi fracionado, onde parte do sobrenadante foi armazenado a -20 °C até a execução dos experimentos e a outra parte passou pelo processo de desnaturação de proteínas. Para isso, o sobrenadante foi autoclavado a 120 °C por 20 min e, por último,

armazenado a -20 °C O sobrenadante autoclavado e não autoclavado foram mantidos a -20 °C até o momento da execução dos ensaios experimentais.

2.5.2. Eclosão e mortalidade de juvenis de segundo estágio (J2) de *M. javanica* em metabólitos de *B. thuringiensis*: para avaliação da eclosão e da mortalidade de J2 de *M. javanica*, o teste foi realizado em condições *in vitro*. Assim, em poços de placa de ELISA de 96 poços, foram adicionados 20 µL de suspensão aquosa contendo 1000 µg/ml estreptomicina e 1000 µg/ml cloranfenicol, 20 µL de suspensão contendo em média 100 ovos ou 40 J2 de *M. javanica* previamente desinfestados e o sobrenadante bacteriano, resultando em um volume final de 200 µL. Como controle, foram utilizadas água autoclavada e meio de cultura LB líquido a 2% (M/V) livre de crescimento de microrganismos. Sendo assim, os tratamentos foram: 1) suspensão aquosa; 2) meio de cultura LB; 3) metabólitos da bactéria e 4) metabólitos da bactéria com proteínas desnaturadas por temperatura. Todos os tratamentos, incluindo as testemunhas, possuíam 100 µg/ml estreptomicina e 100 µg/ml cloranfenicol. Da mesma forma, todos os tratamentos, incluindo as testemunhas, receberam ovos ou J2 de *M. javanica*. Ovos e J2 permaneceram em contato direto com os metabólitos por 48h e seguida a eclosão e mortalidade foram avaliados. Para estimar a eclosão, foi calculado o número de J2 eclodidos e a porcentagem de eclosão de cada tratamento foi comparada por análise estatística. A mortalidade foi mensurada por meio da adição 10 µL de NaOH a 1M em cada poço da placa de ELISA e os nematoides móveis foram considerados com vivos, enquanto os não móveis foram dados como mortos. Para a execução desse experimento, cada tratamento foi repetido quatro vezes.

2.5.3. Metabólitos de *B. thuringiensis* no controle de *P. brachyurus* e *H. glycines*: inicialmente, sementes de soja cv. 57HO123IPRO desinfestadas superficialmente foram depositadas em vasos plásticos de 400 mL de capacidade contendo solo previamente esterilizado (Tabela 1). Após 7 dias, 250 espécimes de *P. brachyurus* e 400 J2 de *Heterodera glycines* mantidos em contato direto com os metabólitos de *B. thuringiensis* por 30 min foram depositados nos vasos contendo as plantas de soja. Os tratamentos foram os mesmos utilizados na avaliação com *M. javanica*. O experimento foi mantido em casa de vegetação a 30 °C ± 2 por 45 dias e ao final desse período os nematoides foram extraídos e a população de nematoides foi mensurada e comparada por análise estatística. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), sendo que cada tratamento foi repetido seis vezes.

2.6. Avaliação da colonização epifítica das raízes de soja pelos isolados bacterianos (Rizocompetência)

Para determinar se os isolados são capazes de formar biofilme sobre as raízes de soja, foi executado o teste de rizocompetência (Romeiro, 2013). Assim, sementes de soja foram desinfestadas superficialmente por imersão por 1 min em álcool 70%, seguindo de 2 min em NaClO a 0,5%, sucessivas lavagens em água autoclavada e, por último, secas em papel absorvente. Após isso, as sementes foram tratadas com a suspensão bacteriana ($OD_{600} = 100nm$) na concentração de 2 mL/kg de sementes e foram depositadas em tubos de ensaio contendo meio de cultura água-ágar (AA) a 0,2%, previamente esterilizado. Os tubos de ensaio foram mantidos em temperatura ambiente com fotoperíodo de 12h e, após 10 dias, o crescimento bacteriano sobre as raízes foi registrado. Como testemunha, foram utilizadas sementes não tratadas com *B. thuringiensis*.

2.7. Indução de resistência

2.7.1. Execução do experimento: para essa avaliação, foi usado somente o isolado M51 de *B. thuringiensis*. Sendo assim, sementes previamente desinfestadas e tratadas com o isolado M51 foram depositadas em vaso plástico de 400 mL de capacidade contendo substrato previamente esterilizado. Passados 7 dias da semeadura, as plântulas de soja receberam uma suspensão aquosa contendo 600 espécimes de *P. brachyurus* ou 800 J2 de *M. javanica* ou 800 J2 de *H. glycines*. Desse modo, os tratamentos foram: 1) plantas sem nematoides e sem tratamento de sementes com a bactéria; 2) sementes tratadas com *B. thuringiensis*; 3) plantas inoculadas com *P. brachyurus*; 4) plantas inoculadas com *M. javanica*; 5) plantas inoculadas com *H. glycines*; 6) sementes tratadas com *B. thuringiensis* e posteriormente inoculadas com *P. brachyurus*; 7) sementes tratadas com *B. thuringiensis* e posteriormente inoculadas com *M. javanica*, e 8) sementes tratadas com *B. thuringiensis* e posteriormente inoculadas com *H. glycines*.

2.7.2. Controle de nematoides da soja pelo isolado M51 de *B. thuringiensis* nos ensaios de indução de resistência : para determinar o efeito de *B. thuringiensis* na população dos nematoides aos 60 dai, as raízes de plantas que receberam nematoides passaram pelo processo de extração de ovos ou de espécimes como descrito anteriormente (Tópico 2.1) e a população dos nematoides foi quantificada e comparada por análise estatística. Neste caso, o foi adotado o delineamento inteiramente casualizado, em que cada tratamento foi repetido seis vezes.

2.7.3. Extração de RNA e PCR em tempo real: passando 7 e 15 dai, as plantas foram coletadas, lavadas e secas rápida e cuidadosamente, congeladas em nitrogênio líquido e, por fim, armazenadas a -80 °C até o momento das análises. Posteriormente, o tecido radicular total foi triturado a pó fino em almofariz e 100 mg foram utilizados para a extração de RNA. O RNA foi extraído com TRIzol (Invitrogen) e a contaminação de DNA foi removida com RQ1 Rnase-free Dnase (Promega). Para precisão, a quantidade de RNA foi medida em um fluorômetro Qubit usando o kit Qubit RNA HS Assay (Invitrogen) e a qualidade e a integridade do RNA foram verificadas por eletroforese em gel de agarose a 1,2%. Para a síntese de cDNAs de fita simples, a transcrição reversa foi feita utilizando 1,2 µg de RNA total com oligo (dT) e *primers* em um volume final de 20 µl, usando o Sistema SuperScript First Strand Synthesis para RT-PCR (Invitrogen). A PCR quantitativa de transcrição reversa (RT-qPCR) aconteceu em um termociclador CFX em tempo real (Bio-Rad), usando SYBR Green PCR Master Mix, conforme as recomendações do fabricante. Todas as reações ocorreram em duplicata e os valores de expressão relativa para cada gene estudado foram calculados usando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak e Schmittgen, 2001). Os genes investigados estão descritos na Tabela 2. O experimento foi conduzindo em delineamento inteiramente casualizado, sendo que em cada tratamento foi utilizado três repetições, sendo que cada repetição era composta por três parcelas experimentais.

2.7.4. Extração e quantificação de derivados da lignina-ácido tioglicólico (LTGA) e de compostos fenólicos solúveis totais (TSP): para esse teste, 100 mg de raízes trituradas mantidas a -80 °C foram homogeneizadas em 1 mL de solução de metanol a 80% (vol/vol), em eppendorf de 1,5 mL. Posteriormente, os tubos tipo eppendorf foram depositados em termomix e o extrato bruto foi agitado a 300 rpm a 25 °C por 12 horas e, em seguida, a mistura foi centrifugada a 13.000 × g por 30 minutos. A concentração de fenólicos solúveis totais (TSP) foi determinada no extrato metanólico e o pelete foi mantido a 20 °C para determinar a concentração de LTGA (Barber e Ride, 1988; Zieslin e Ben-Zaken, 1993; Rodrigues et al., 2005; Fortunato et al., 2015). Assim como para a análise molecular, experimento foi conduzindo em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições, sendo que cada repetição era composta por três parcelas experimentais.

2.8. Análise estatística

Todos os dados coletados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk ($\alpha > 0,05$) e, posteriormente, ao teste de variância (ANOVA). Os dados obtidos nos experimentos de controle biológico com quatro isolados de bactérias, uso de metabólitos para

o controle de nematoides, promoção de crescimento, análise de TSP, LGTA e expressão genica, após a serem submetidos à ANOVA, foram comparados pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Para a avaliação da eficiência de M51 em conter a reprodução dos nematoides, os dados foram comparados pelo teste F ($p < 0,05$).

As análises foram realizadas no software estatístico SISVAR. Com o auxílio do software MetaboAnalyst (v 5.0), os valores de expressão gênica foram analisados e Heatmaps foram criados.

Resistência Sistêmica Adquirida					
Gene	Alvo	Sentido 5'-3'	Primer	Referência	
Chalcona isomerase (<i>CHAL</i>)	Biossíntese dos flavonoides	F	GTTTCCCCTGCTTTGAAAGAGA	Cruz et al., 2020	
		R	GGATTGGCCTCTAACTCTTTGAAG		
Fenilalanina amônia- liase (<i>FAL</i>)	Via do fenilpropanoides	F	GTGCAAGGGCTGCTTATG	Gao et al., 2016	
		R	CCCAGTCCCTAATTCCTCTC		
Proteína relacionada à patogênese (<i>PRI</i>)	Marcador para SAR	F	GCATCATGAATTTAGCCAACG	Youssef et al., 2013	
		R	TTCCAGGTGACCAAGCAAGT		
Resistência Sistêmica Induzida					
Ácido 1-carboxílico-1- aminociclopropano sintase (<i>ACS</i>)	Biossíntese do etileno	F	CTCTTAACCTTCATTCTTGCTAACC	Rodrigues et al., 2022	
		R	TTGCTTCTGCTTCTTTGTATGC		
Inibidor da tripsina de Kunitz (<i>KTI</i>)	Inibidores de tripsina	F	AAAGGGCGGCGGAATAGA	Rashed et al., 2008	
		R	CTGGCAGACCCTTGAGAATAAC		
Inibidores da serina protease de Bowman- Birk (<i>BBI</i>)	Inibidores de serino protease	F	AATAATGAGCATGTTCCAGTG		
		R	GGCCTAGTAGCTTTTATTCATT		
Gene constitutivo					
Ubiquitina (<i>UBIQ</i>)	Gene constitutivo	F	TGTAATGTTGGATGTGTTCCC	Einhardt et al., 2020	
		R	GGGACACAATTGAGTTCAACA		

Tabela 2 – Genes e suas sequências de primer analisados nas raízes de plantas de soja não tratadas ou tratadas com *Bacillus thuringiensis* e inoculadas ou não inoculadas com *Meloidogyne javanica*, *Pratylenchus brachyurus* e *Heterodera glycines* usando PCR de transcrição reversa quantitativa. F – Sentido 5' – 3'; R – Antisentido 5' – 3'.

3. RESULTADOS

3.1. Biocontrole de nematoides da soja por *B. thuringiensis*

Os isolados M51, T03, Br58 e T13 de *B. thuringiensis* foram capazes de reduzir significativamente a população de *M. javanica*, de *P. brachyurus* e de *H. glycines* em condições de casa de vegetação ($p < 0,05$) (Figura 2). Em relação a *M. javanica*, quando feito o tratamento de sementes prévio com os isolados, houve uma redução do número de ovos por grama de raiz (ovos.g⁻¹) de 40,5 a 55,9%, diferenciando-os da testemunha, mas não houve diferença estatística entre isolados (Figura 2^a). O mesmo foi observado quando avaliada a população total de *H. glycines* por grama de raiz (população total.g⁻¹), em que houve a redução de 36,6 a 41,8%, diferenciando os tratamentos da testemunha, mas não entre si (Figura 2B). Diferentemente, para *P. brachyurus*, os isolados promoveram a redução do número de espécimes por grama de raiz (espécimes.g⁻¹) de forma significativa em relação à testemunha, mas em índices diferentes entre si, como expresso pela análise estatística. Sendo assim, Br58, T03 e M51 foram iguais entre si e reduziram o número de espécimes. G⁻¹ em 47,1; 44,5 e 39,6%, respectivamente. O isolado T13 foi capaz de reduzir 25,8% o número de espécimes. G⁻¹, não diferindo-se do isolado M51 (Figura 2C).

A massa seca da raiz foi mensurada e, de acordo com a análise estatística, não houve diferença significativa entre a testemunha e plantas tratadas e não tratadas com *B. thuringiensis* e inoculados ou com as diferentes espécies de nematoides ($p < 0,05$) (Figura 2D, E e F).

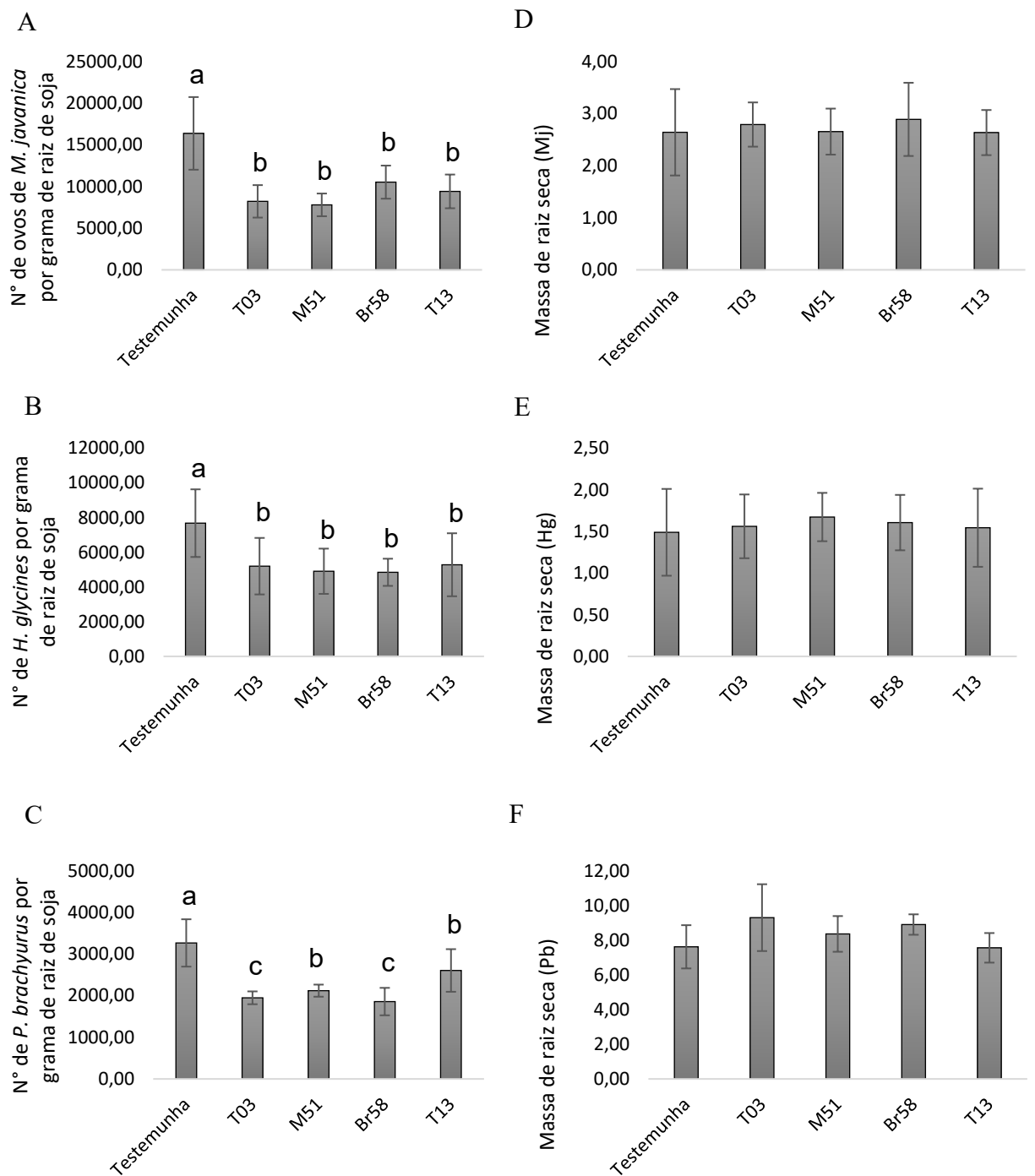


Figura 2 – Efeitos de diferentes isolados de *Bacillus thuringiensis* sobre fitonematoides em rezízes de soja. Número de *Meloidogyne javanica* (A), *Pratylenchus brachyurus* (B) e *Heterodera glycines* (C) aos 60 dias após a inoculação dos nematoides em plantas tratadas com os isolados T03, M51, Br58 e T13 de *B. thuringiensis*. Em (D), (E) e (F) correspondem à massa de raiz seca de plantas, em gramas, tratadas com os isolados T03, M51, Br58 e T13 de *B. thuringiensis* aos 60 dias após a inoculação de *M. javanica*, *P. brachyurus* e *H. glycines*, respectivamente. Colunas com a mesma letra, não são estatisticamente diferentes pelo teste Tukey ($p < 0,05$). As barras representam o desvio padrão ($n = 6$).

3.2. Metabólitos de *B. thuringiensis* no manejo de PPNs

3.2.1. *Meloidogyne javanica*: quando mantido ovos de *M. javanica* em contato direto com os metabólitos dos isolados M51, T03 e Br58, foi observado a inibição de 100% na eclosão dos nematoides ($p < 0,01$) (Figura 3). Esse resultado foi observado independentemente se os metabólitos foram mantidos ou não sobre alta temperatura. Nas testemunhas (água e LB), ocorreu a inibição natural da eclosão em até 86% (Figura 3^a, B e C). O mesmo ocorreu nas análises de mortalidade de J2 de *M. Javanica*, uma vez que os metabólitos de M51, T03 e Br58 ocasionaram uma mortalidade superior a 86%, enquanto nas testemunhas foi observado até 8% de mortalidade natural ($p < 0,01$). Extrato bacteriano com metabólitos totais ou metabólitos com proteínas desnaturadas resultaram na mesma mortalidade de os J2 de *M. javanica*, como expresso na análise estatística (Figura 3D, E e F).

3.2.2. *Pratylenchus brachyurus*: quando espécimes de *P. brachyurus* foram mantidos em contato direto com metabólitos dos isolados de *B. thuringiensis* antes da inoculação em plantas de soja, houve efeito significativo sobre o número total de nematoides ($p < 0,01$) (Figura 4). Em relação aos metabólitos de M51, houve redução significativa de *P. brachyurus* apenas nos tratamentos em que os metabólitos passaram pelo processo de desnaturação de proteínas antes de entrar em contato com nematoides. Essa redução foi superior a 56% (Figura 4^a). De forma oposta, a desnaturação de proteínas por temperatura inibiu o efeito nematicida do extrato metabólico de T03, uma vez que ocorreu redução da população de *P. brachyurus* somente no tratamento sem aquecimento (Figura 4B). A redução promovida por metabólitos de T03 foi de 39,5%. Por sua vez, em Br58, ambos os tratamentos promoveram a redução de espécimes de *P. brachyurus*, diferenciando-os da testemunha, mas não entre si. A redução notada para metabólitos sem aquecimento e com desnaturação de proteínas foi de 38,5 e 30,1%, respectivamente (Figura 4C).

3.2.3. *Heterodera glycines*: os tratamentos com metabólitos de *B. thuringiensis*, com e sem proteínas desnaturadas por temperatura, não foram capazes de reduzir a população dessa espécie de nematoides, sendo estatisticamente semelhante às testemunhas (Figura 4D, E e F).

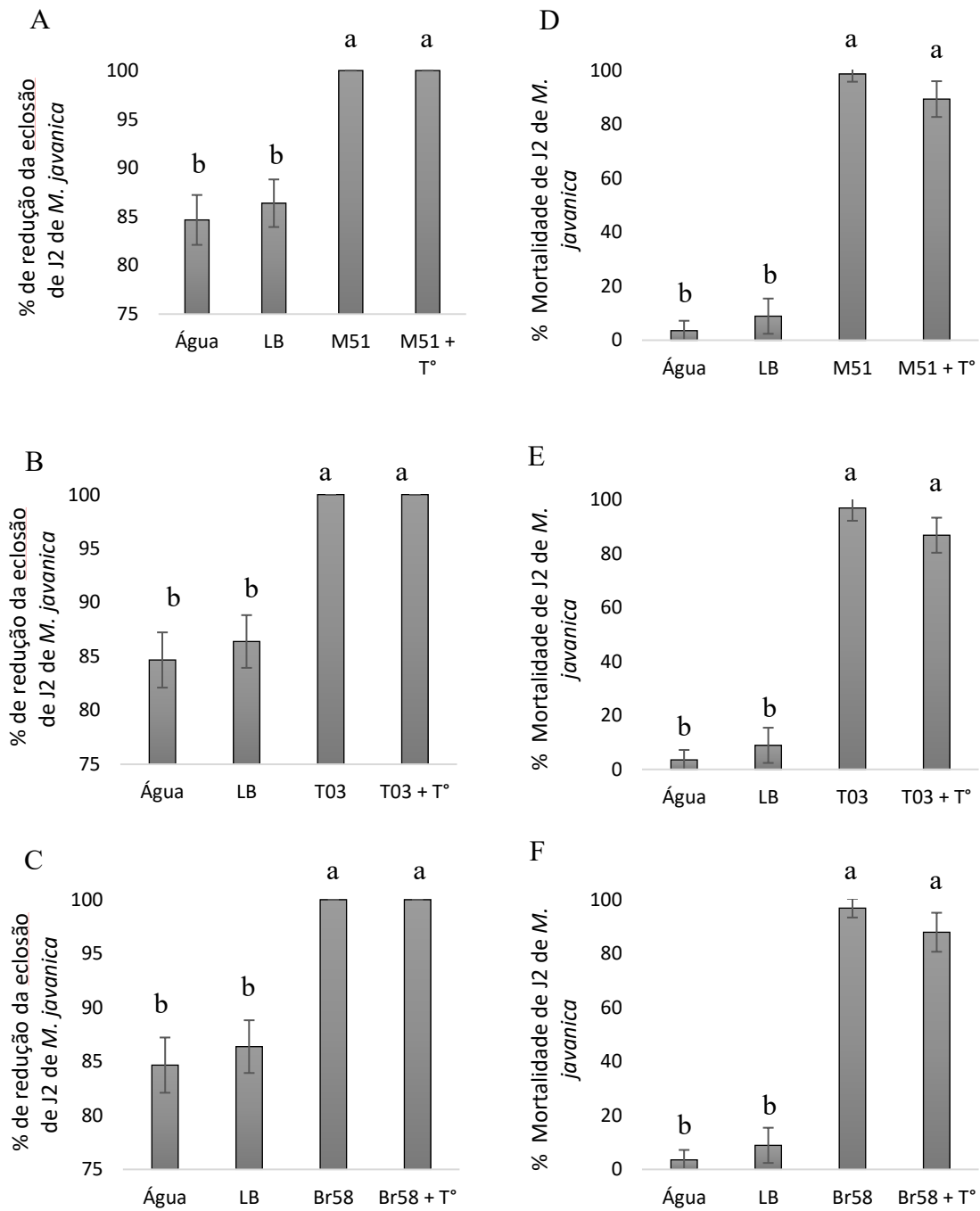


Figura 3 – Efeitos dos extratos metabólicos dos diferentes isolados de *Bacillus thuringiensis* sobre a eclosão e mortalidade de juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica*. Em (A) a (C) correspondem a avaliação da eclosão e (D) a (F) a mortalidade de *M. javanica* 48h após contato direto com metabólitos dos isolados de M51, T03 e Br58 de *Bacillus thuringiensis*. Tratamentos com T° corresponde a extrato metabólico dos isolados de *B. thuringiensis* que passaram pelo processo de desnaturação de proteínas por temperatura. Colunas com a mesma letra, não são estatisticamente diferentes pelo teste Tukey ($p < 0,05$). As barras representam o desvio padrão ($n = 4$).

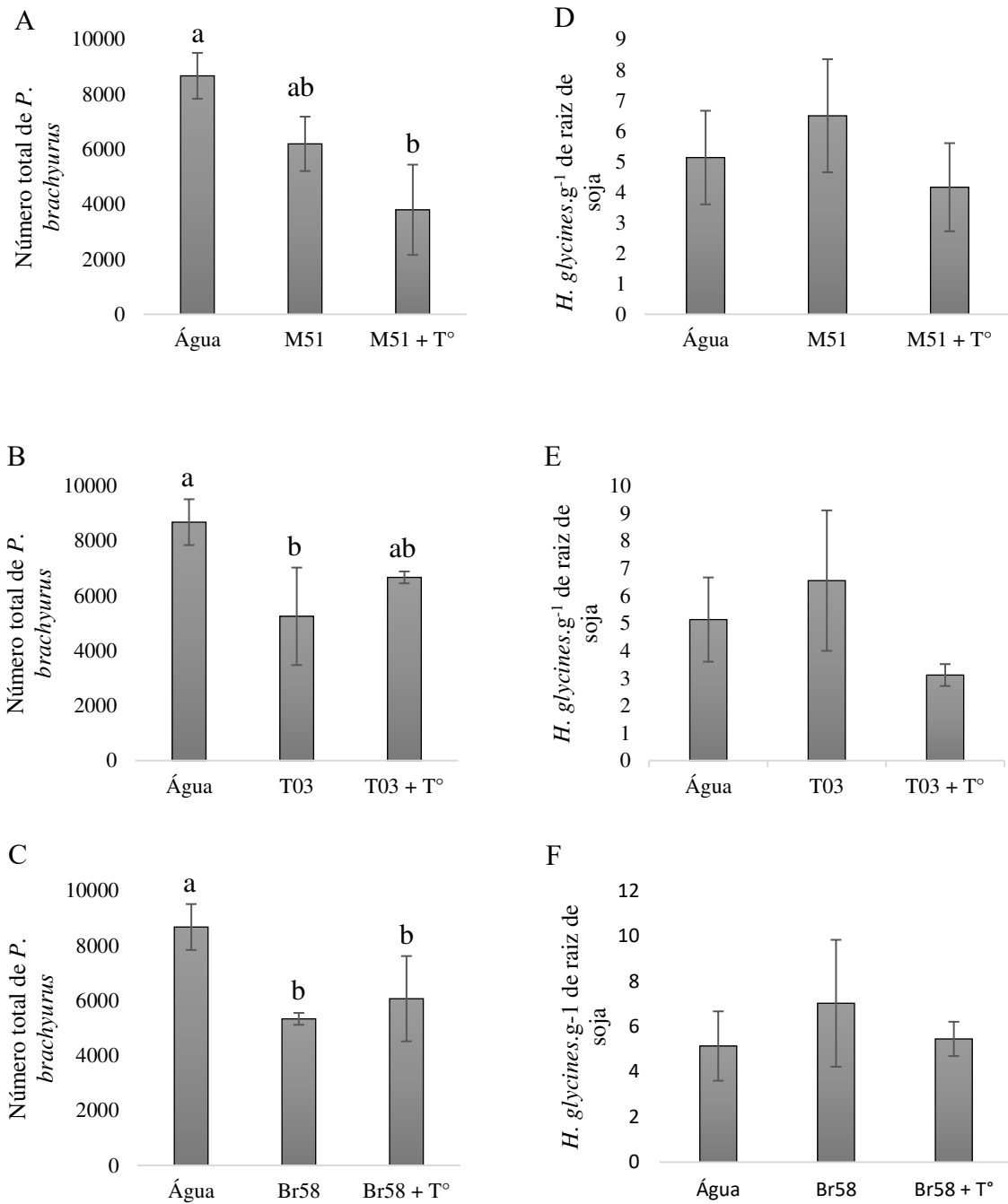


Figura 4 – Número de *Pratylenchus brachyurus* (A, B e C) e de *Heterodera Glycines* (D, E e F) aos 45 dias após a infestação do solo com nematoides previamente tratados com metabólitos dos isolados M51 (A e D), T03 (B e E) e Br58 (C e F) de *Bacillus thuringiensis*. Colunas com a mesma letra, não são estatisticamente diferentes pelo teste Tukey ($p < 0,05$). As barras representam o desvio padrão ($n = 6$).

3.3. Rizocompetência

Todos os isolados foram capazes de crescer superficialmente nas raízes de soja, em condições *in vitro* (Figura 5). Assim, ao longo de 10 dias, de acordo com o desenvolvimento das raízes, foi notado o crescimento bacteriano sobre as raízes. Na medida que as raízes cresciam e aprofundavam no meio de cultura, as bactérias acompanhavam o desenvolvimento radicular, sendo essa fotografadas após 10 dias de crescimento.

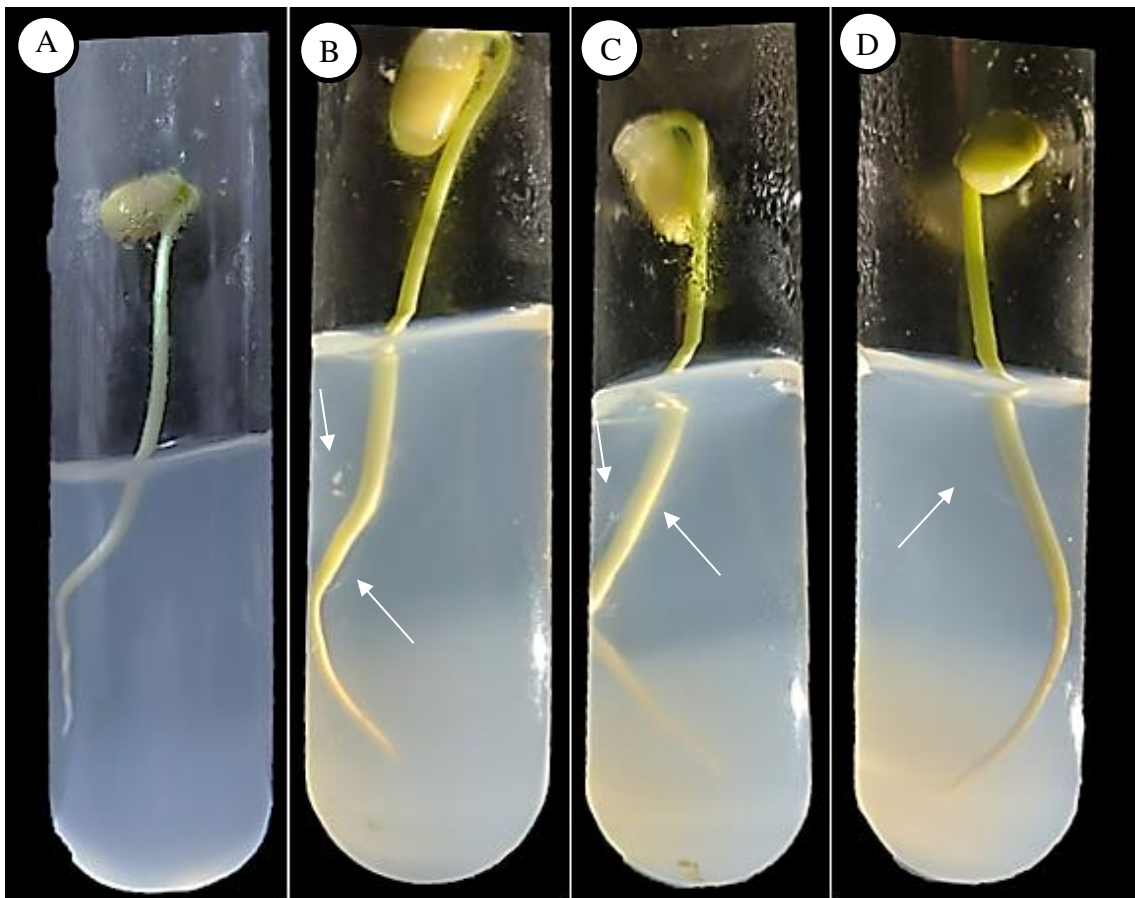


Figura 5 – Formação de biofilme em raízes de soja 10 dias após o tratamento de sementes com os isolados T03 (B); M51 (C) e Br58 (D) de *Bacillus thuringiensis*. Foi dado como testemunha (A) plantas oriundas de sementes sem inoculação bacteriana. Setas indicam a formação do biofilme bacteriano sobre as raízes.

3.4. Indução de resistência

3.4.1. M51 de *B. thuringiensis* no controle de nematoides da soja para o ensaio de indução de resistência

Assim como na avaliação de biocontrole realizada anteriormente (Tópico 3.1), aos 60 dai o isolado M51 de *B. thuringiensis* reduziu de forma significativa a população de *M. javanica*, de *P. brachyurus* e de *H. glycines* ($p < 0,05$) (Figura 6). Desse modo, para *M. javanica*, o número de ovos.g⁻¹ de raiz foi reduzido em 50,1%, quando comparado a plantas da testemunha. Por sua vez, com *P. brachyurus* ocorreu a redução significativa de 24,5% do número de espécimes.g⁻¹ de raiz de soja. Quando avaliados os dados de *H. glycines*, verificou-se que a população total.g⁻¹ de raiz de soja foi reduzida em 30,6%, em comparação com a testemunha.

3.4.2. Produção de TSP e LGTA

A concentração total de compostos fenólicos (TSP) foi influenciada pelos tratamentos somente na avaliação de 7dai ($p < 0,01$) (Figura 7). Quando as plantas foram expostas a *B. thuringiensis* e/ou *M. javanica*, houve indução da produção de TSP somente nos tratamentos nos quais havia nematoides, produzindo 2,86 a 3,96 vezes mais TSP em comparação ao tratamento que recebeu unicamente *B. thuringiensis* e o tratamento testemunha (Figura 7^a). Isso foi observado em plantas inoculadas com *B. thuringiensis* e/ou com *P. brachyurus*, onde foi notado o incremento de 2,72 a 3,40 vezes mais de TSP somente nos tratamentos em que foram inoculados com *P. brachyurus*, sendo esses tratamentos diferentes estatisticamente do tratamento que recebeu somente *B. thuringiensis* e da testemunha (Figura 7^B). Diferentemente, a inoculação combinada de *B. thuringiensis* com *H. glycines* ocasionou o acréscimo de 4,1 a 5,1 vezes mais de TSP, quando comparado aos tratamentos que havia unicamente *B. thuringiensis* ou *H. glycines* e a testemunha. Nesse caso, o tratamento com os dois organismos diferenciou-se estatisticamente dos demais tratamentos e os tratamentos em que os organismos estavam isolados foram equivalentes entre si e a testemunha (Figura 7^C).

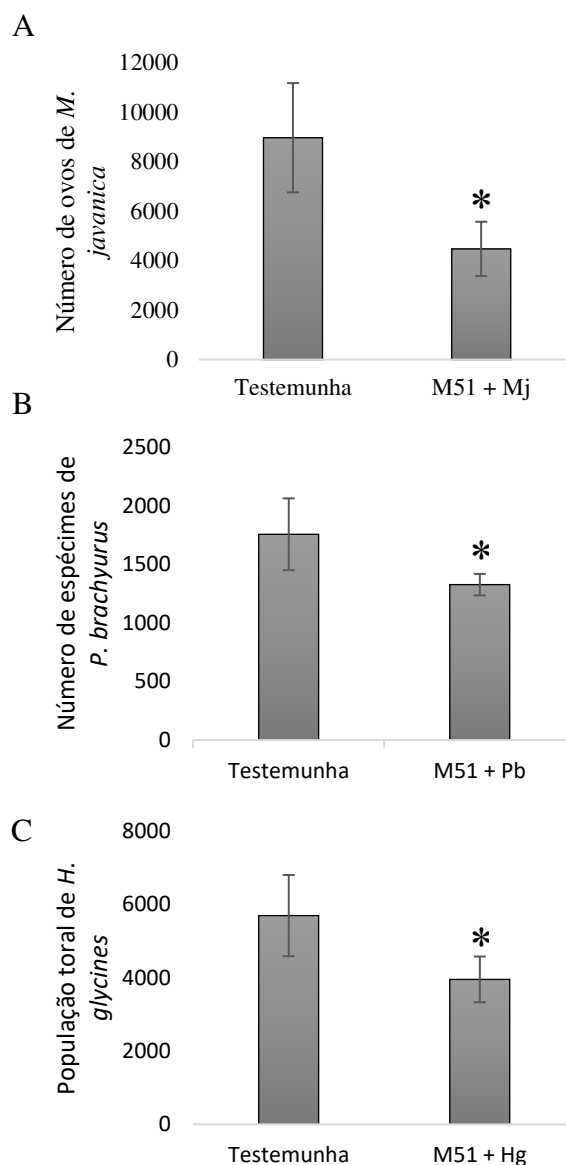


Figura 6 – Efeito do isolado M51 de *Bacillus thuringiensis* sobre o número de *Meloidogyne javanica* (A), *Pratylenchus brachyurus* (B) e *Heterodera glycines* (C) em raízes de soja aos 60 dias após o tratamento de sementes de soja com a bactéria. *Medias diferenciam-se uma da outra pelo teste t ($p < 0,05$). As barras representam o desvio padrão ($n = 6$).

3.4.3. Produção de TSP e LGTA

A concentração total de compostos fenólicos (TSP) foi influenciada pelos tratamentos somente na avaliação de 7dai ($p < 0,01$) (Figura 7). Quando as plantas foram expostas a *B. thuringiensis* e/ou *M. javanica*, houve indução da produção de TSP somente nos tratamentos nos quais havia nematoides, produzindo 2,86 a 3,96 vezes mais TSP em comparação ao tratamento que recebeu unicamente *B. thuringiensis* e o tratamento testemunha (Figura 7^a). Isso foi observado em plantas inoculadas com *B. thuringiensis* e/ou com *P. brachyurus*, onde foi

notado o incremento de 2,72 a 3,40 vezes mais de TSP somente nos tratamentos em que foram inoculados com *P. brachyurus*, sendo esses tratamentos diferentes estatisticamente do tratamento que recebeu somente *B. thuringiensis* e da testemunha (Figura 7B). Diferentemente, a inoculação combinada de *B. thuringiensis* com *H. glycines* ocasionou o acréscimo de 4,1 a 5,1 vezes mais de TSP, quando comparado aos tratamentos que havia unicamente *B. thuringiensis* ou *H. glycines* e a testemunha. Nesse caso, o tratamento com os dois organismos diferenciou-se estatisticamente dos demais tratamentos e os tratamentos em que os organismos estavam isolados foram equivalentes entre si e a testemunha (Figura 7C).

Em relação a concentração de derivados de lignina-ácido tioglicólico (LTGA), aos 7 dai, a aplicação combinada de *B. thuringiensis* e *M. javanica* levou ao aumento de 1,81 a 2,79 vezes a quantidade LTGA, quando comparado aos tratamentos em que os organismos foram inoculados isoladamente e à testemunha ($p \leq 0,01$) (Figura 8^a). O mesmo foi observado aos 15 dai, em que o tratamento em que *B. thuringiensis* e *M. javanica* foram co-inoculados diferenciou-se de forma significativa dos demais tratamentos e a testemunha, aumentando em 1,28 a 1,43 vezes a LTGA (Figura 8B).

Houve interferência dos tratamentos sobre a LGTA somente aos 15 dai, quando *B. thuringiensis* e *P. brachyurus* foram co-inoculados em plantas de soja ($p \leq 0,05$) (Figura 8D). Assim, no tratamento em que os organismos estavam concomitantes, houve o incremento de 1,28 vezes mais de LGTA, quando comparado com a testemunha. A aplicação *B. thuringiensis* e/ou *H. glycines* não interferiram na LGTA.

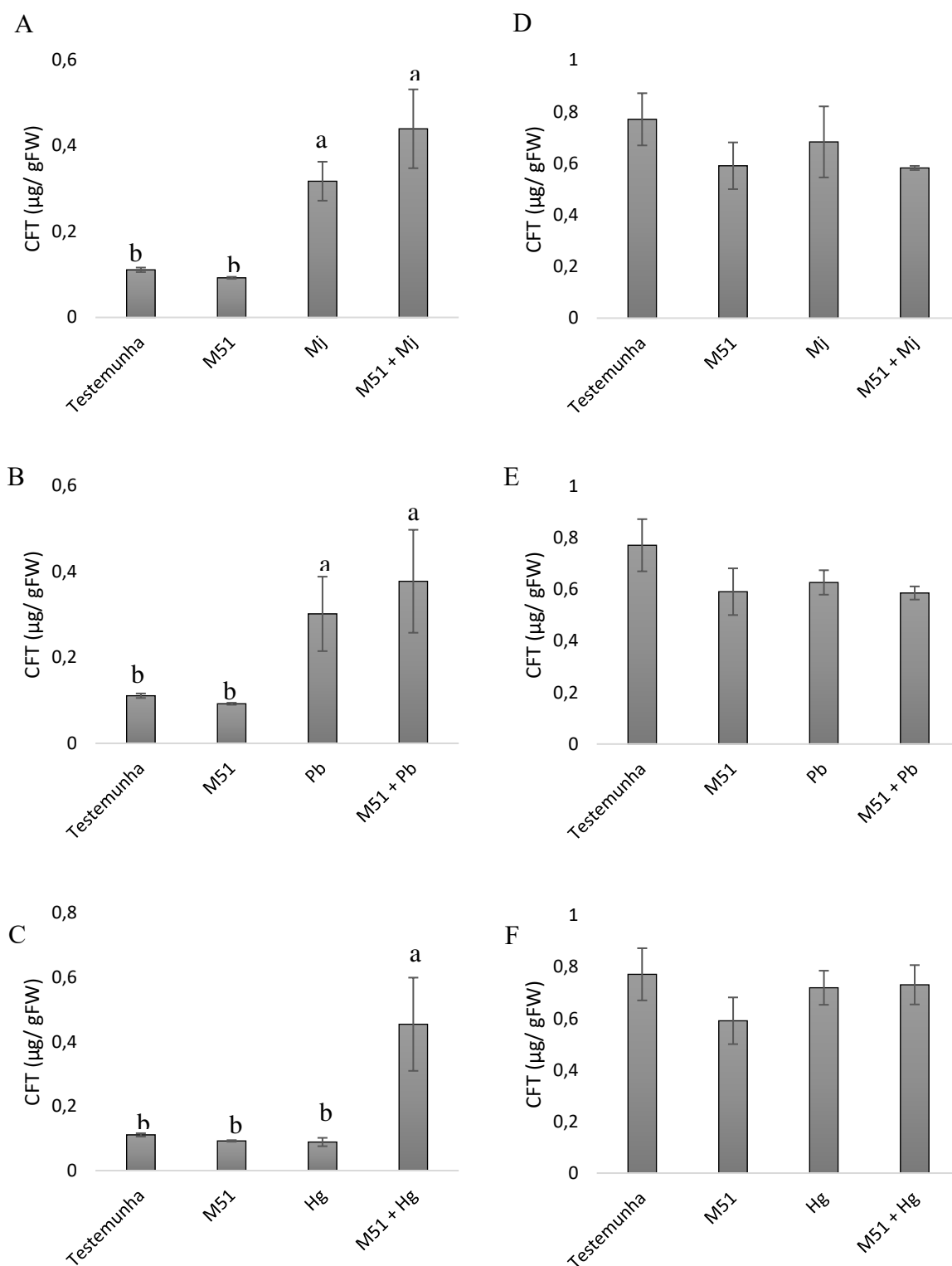


Figura 7 –Concentração total de compostos fenólicos (CFT) em plantas tratadas ou não tratadas com o isolado M51 de *Bacillus thuringiensis* aos 7 e 15 dias após a inoculação (dai) de *Meloidogyne javanica* (Mj), *Pratylenchus brachyurus*(Pb) ou *Heterodera glycines* (Hg). Em (A) a (C) correspondem a avaliação realizada aos 7 dai e de (D) a (E) são referentes as avaliações aos 15 dai. Colunas com a mesma letra não são estatisticamente diferentes pelo teste Tukey ($p < 0,05$). As barras representam o desvio padrão ($n = 3$).

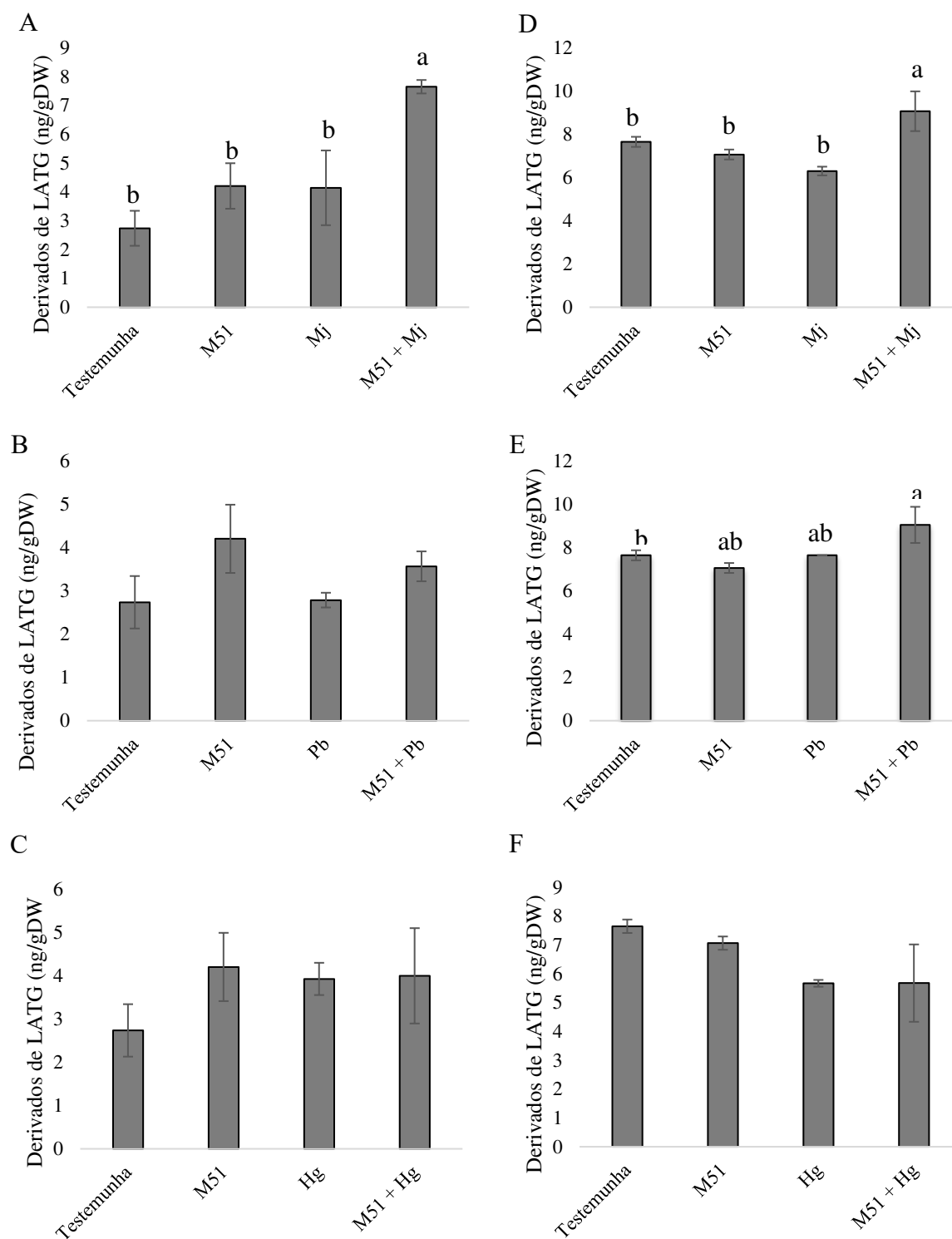


Figura 8 – Concentração de derivados de lignina-ácido tioglicólico (LATG) em plantas tratadas ou não tratadas com o isolado M51 de *Bacillus thuringiensis* aos 7 e 15 dias após a inoculação (dai) de *Meloidogyne javanica* (Mj), *Pratylenchus brachyurus* (Pb) ou *Heterodera glycines* (Hg). Em (A) a (C) correspondem a avaliação realizada aos 7 dai e de (D) a (E) são referentes as avaliações aos 15 dai. Colunas com a mesma letra não são estatisticamente diferentes pelo teste Tukey ($p < 0,05$). As barras representam o desvio padrão ($n = 3$)

3.4.4 Expressão diferencial de genes relacionados às vias de defesa dependentes do ácido salicílico e ácido jasmônico em plantas de soja

3.4.4.1 – Alterações nas vias de defesa das plantas de soja ocasionados pela presença de *B. thuringiensis* e *M. javanica*: aos 7 dai, todos os genes vegetais relacionados à defesa avaliados neste estudo foram influenciados pela presença isolada ou combinada de M51 de *B. thuringiensis* e de *M. javanica* ($p < 0,05$) (Figura 9; Material Suplementar S1). Assim, a presença de nematoides induziu plantas de soja a responder de forma significativa pela regulação positiva do gene *KTI*, expressando de 33 a 55 vezes mais esse gene em relação às plantas testemunhas e plantas que receberam unicamente *B. thuringiensis*. Igualmente, o gene *ACS* foi fortemente expresso em plantas que receberam J2 de *M. javanica*, diferenciando-o estatisticamente dos demais tratamentos. Em relação ao gene *BBI*, quando comparado à testemunha, esse gene foi regulado negativamente em até 3,6 vezes menos que em plantas do tratamento que combinou os dois microrganismos (M51 + Mj), sendo diferente um do outro pela análise estatística. Para *PRI*, aos 7 dai, esse gene foi expresso em quantidades superiores em plantas do tratamento que recebeu unicamente J2 *M. javanica*, sendo ele diferente dos demais tratamentos. Nesse caso, não houve diferença significativa entre a testemunha e os tratamentos em que as sementes foram tratadas com *B. thuringiensis*. O gene *CHAL*, no tratamento com *B. thuringiensis* e *M. javanica*, foi produzido 2,6 vezes mais que em plantas testemunhas. Para a regulação do gene *FAL*, houve uma regulação negativa em plantas que receberam *B. thuringiensis*, quando comparados à testemunha. No entanto, plantas do tratamento com nematoides e plantas co-inoculadas com os dois organismos diferenciaram-se uma da outra, sendo que o primeiro tratamento expressou até 3,7 vezes mais *FAL* que o segundo (Figura 9^a). Aos 15 dai, como exceção do gene *BBI*, todos os genes avaliados foram influenciados pelos tratamentos ($p < 0,05$) (Figura 9B; Material Suplementar S2). Desse modo, foi observado a regulação negativa do gene *KTI* em até 23 vezes menos em plantas do tratamento inoculado unicamente com nematoides, quando comparado com a testemunha. Para *ACS*, plantas co-inoculadas com os dois microrganismos produziram significativamente mais que as plantas da testemunha e plantas que receberam de forma isolada *M. javanica* ou *B. thuringiensis*, tornando-os estatisticamente diferentes. Nesse caso, não houve diferença significativa entre a testemunha e os tratamentos inoculados somente com nematoides ou com bactérias. O gene de defesa *CHAL* foi induzido 2,8 a 4,9 vezes mais em plantas que foram previamente tratadas unicamente com *B. thuringiensis*, diferenciando-o da testemunha e dos tratamentos que receberam nematoides (Mj e M51 + Mj). No entanto, Mj e M51 + Mj não foram

diferentes da testemunha. Em relação ao gene *FAL*, todos os tratamentos diferenciaram entre si e da testemunha. Em plantas do tratamento com *B. thuringiensis* e *M. javanica*, houve maior expressão desse gene, produzindo 10, 36 e 138 vezes mais que em plantas que receberam nematoides, plantas do tratamento com bactérias e planta testemunha, respectivamente. Plantas com a presença de *B. thuringiensis* (M51 e M51 + Mj) regularam positivamente a expressão do gene de defesa *PR1*, sendo esses iguais um ao outro, mas diferentes estatisticamente da testemunha e de plantas que receberam unicamente *M. javanica*. Assim, houve a regulação positiva de 5 a 33 vezes mais em plantas dos tratamentos M51 e M51 + Mj, quando comparado à testemunha e o Mj.

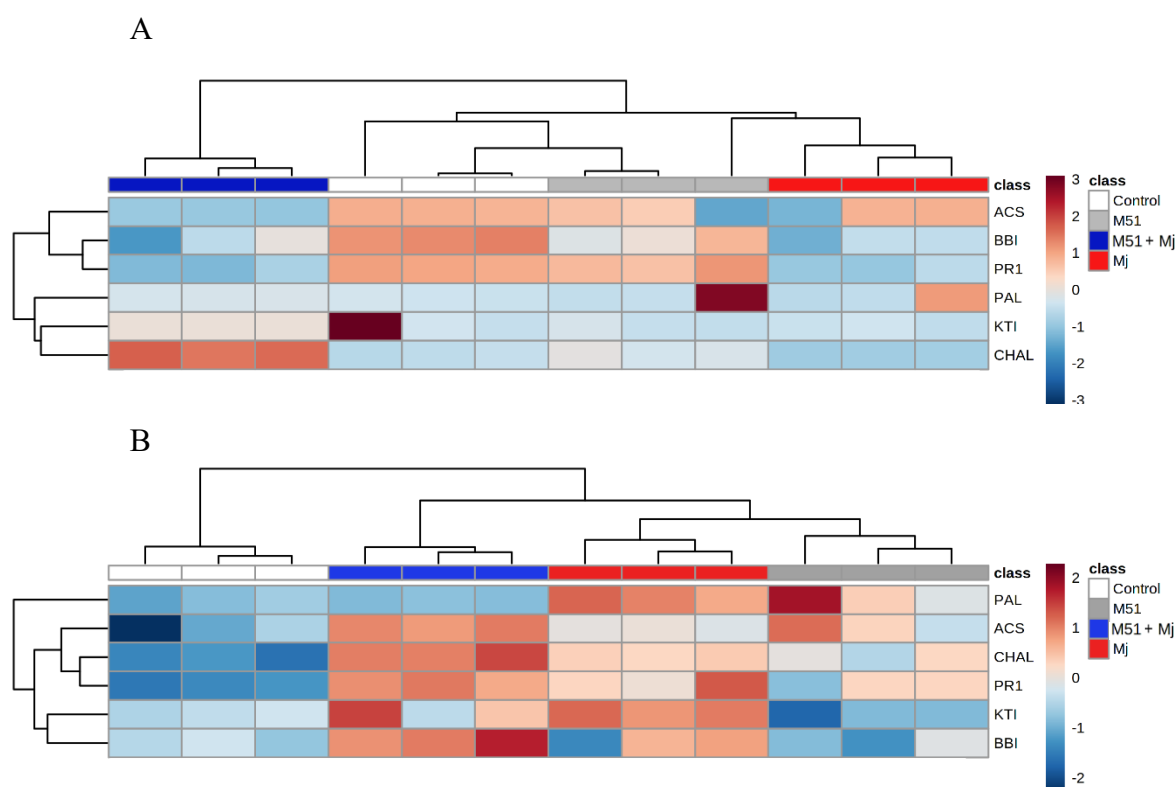


Figura 9 – Representação do mapa de calor da expressão diferencial dos genes relacionados à defesa em tecidos radiculares de soja tratados com o isolado M51 de *Bacillus thuringiensis* aos 7 e 15 dias após a inoculação (dai) de *Meloidogyne javanica* (Mj). Em (A) plantas avaliadas aos 7 dai e em (B) plantas avaliadas aos 15 dai. A expressão dos genes é representada no mapa de calor na escala de cores de -3 a 3 no esquema de cores azul-vermelho. Os genes são representados em linhas enquanto os tratamentos em colunas. A amplificação do gene Ubiquitina (*UBIQ*) da soja foi utilizada como controle interno para normalização dos dados. Para cada amostra de raiz, foram utilizadas três repetições biológicas com suas respectivas duas repetições técnicas.

3.4.4.2 – Alterações nas vias de defesa das plantas de soja ocasionados pela presença de *B. thuringiensis* e *P. brachyurus*: a presença de *P. brachyurus* com *B.*

thuringiensis aos 7 dai influenciaram de forma significativa a expressão de genes relacionados a defesa em plantas de soja ($p < 0,05$) (Figura 10; Material Suplementar S3). Para o gene *KTI*, plantas do tratamento que recebeu unicamente *P. brachyurus* tiveram a expressão desse gene aumentada em 24,4; 8,15 e 5,29 vezes mais do que nos tratamentos em que os organismos foram combinados, quando havia unicamente *B. thuringiensis* e da testemunha, respectivamente. Ainda, para *KTI*, aos 7 dai, houve a regulação negativa desse gene nos tratamentos quem os organismos estão concomitantes, quando comparado à testemunha, diferenciando-os estatisticamente. A expressão do gene *BBI* foi regulada negativamente em até 2,34 vezes menos em plantas que receberam bactérias e nematoides, quando comparada à testemunha. Já para o gene *ACS*, houve uma forte regulação positiva em plantas com nematoides (Pb), diferenciando esse tratamento dos demais. Plantas que receberam bactérias e nematoides a expressão do gene *CHAL* foi 5,14 vezes mais do que plantas que receberam unicamente bactérias e 7,45 vezes mais do que a testemunha, diferenciando-o desses tratamentos. No entanto, plantas que receberam unicamente nematoides obtiveram 3,24 vezes mais a expressão do gene *CHAL* em relação à testemunha, sendo um diferente do outro estatisticamente. O gene *FAL* foi reprimido em plantas que combinaram os dois microrganismos, quando comparado à testemunha. Nesse caso, a produção de *FAL* foi 5,5 vezes menos que na testemunha, sendo significativamente diferentes. A presença de nematoides acarretou a regulação negativa do gene *PR1*, sendo esses tratamentos diferentes da testemunha e do tratamento que recebeu unicamente bactérias (Figura 10^a).

Aos 15 dai, com exceção do gene de defesa *BBI*, os genes foram influenciados quando na presença de *B. thuringiensis* e *H. glycines* ($p > 0,05$) (Figura 10B; Material Suplementar S4). Quando plantas foram inoculadas com *P. brachyurus* tiveram a expressão do gene *KTI* reprimida de 5,7 a 7,4 vezes, quando comparadas a plantas da testemunha e ao tratamento que recebeu os dois microrganismos, sendo, assim, estatisticamente diferentes. No entanto, quando inoculadas unicamente com *B. thuringiensis*, essas têm a expressão normal do gene *KTI*, sendo igual à testemunha. Plantas inoculadas unicamente com *B. thuringiensis* induziu a regulação positiva do gene *ACS* em 3,08; 3,7, e 25 vezes mais que nos tratamentos onde os dois organismos estão combinados, nos tratamentos que receberam somente nematoides e que a testemunha, respectivamente. Em relação ao gene *CHAL*, os tratamentos com *B. thuringiensis* (M51 e M51 + Pb), aos 15 dai, foram estatisticamente semelhantes, regulando positivamente de 4,9 a 8,2 vezes mais em relação ao tratamento com nematoide e à testemunha. Plantas tratadas com *B. thuringiensis* expressão *FAL* de 3,8 a 22,4 vezes mais que os demais tratamentos

e a testemunha, sendo diferentes pela análise estatística. Porém, quando inoculadas unicamente com *P. brachyurus*, ocorreu a repressão do gene *FAL* em 3,9 e 5,8, em relação ao tratamento em que havia bactérias e nematoides e a testemunha, respectivamente. O gene *PR1* foi regulado positivamente no tratamento que havia unicamente bactérias, comparando-o com os demais tratamentos e foi regulado negativamente em plantas que receberam unicamente nematoides, sendo esse diferente estatisticamente da testemunha.

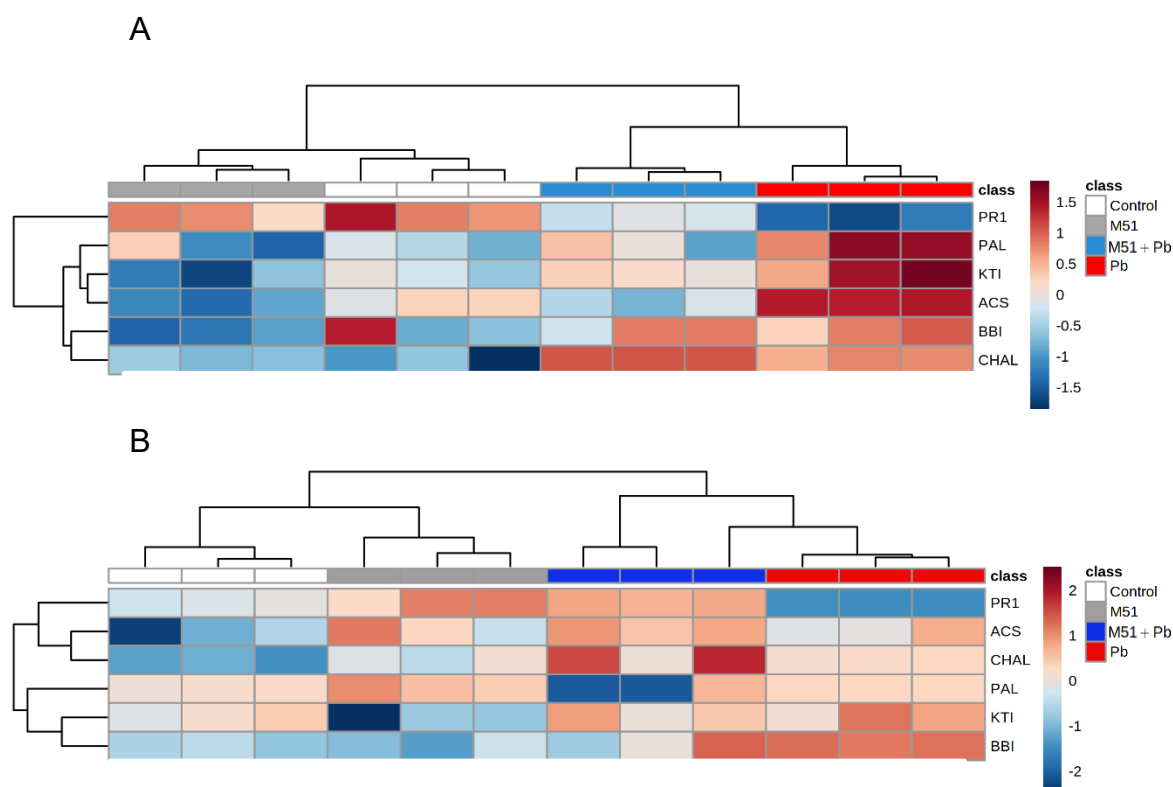


Figura 10 – Representação do mapa de calor da expressão diferencial dos genes relacionados à defesa em tecidos radiculares de soja tratados com o isolado M51 de *Bacillus thuringiensis* aos 7 e 15 dias após a inoculação (dai) de *Pratylenchus brachyurus* (Pb). Em (A) plantas avaliadas aos 7 dai e em (B) plantas avaliadas aos 15 dai. A expressão dos genes é representada no mapa de calor na escala de cores de -2 a 2 no esquema de cores azul-vermelho. Os genes são representados em linhas enquanto os tratamentos em colunas. A amplificação do gene Ubiquitina (*UBIQ*) da soja foi utilizada como controle interno para normalização dos dados. Para cada amostra de raiz, foram utilizadas três repetições biológicas com suas respectivas duas repetições técnicas.

3.4.4.3 – Alterações nas vias de defesa das plantas de soja ocasionados pela presença de *B. thuringiensis* e *H. glycines*: em relação as plantas de soja que foram inoculadas com *B. thuringiensis* e/ou *H. glycines* aos 7 dai, houve expressão diferencial dos genes relacionados à defesa ($p \leq 0,05$) (Figura 11; Material Suplementar S5). Desse modo, plantas co-inoculadas com os dois microrganismos (*B. thuringiensis* e *H. glycines*) obtiveram de 3,28

a 5,83 vezes mais a expressão do gene *KTI* em relação aos demais tratamentos e a testemunha, tornando-o diferente desses pela análise estatística. Quando os organismos estavam presentes de forma isolada, não influenciaram a expressão do gene *KTI*, fazendo com que esses fossem considerados iguais à testemunha, de acordo com análise estatística. O gene *BBI* foi regulado negativamente em plantas que receberam nematoides (Hg e M51 + Hg), sendo expresso de 2,94 a 3,19 vezes menos quando comparado a plantas testemunha. A presença dos microrganismos, combinados ou não combinados, acarretou a regulação negativa do gene *ACS*, diferenciando os tratamentos da testemunha. Por sua vez, quando co-inoculados *B. thuringiensis* com *H. glycines* ocasionou regulação positiva de *CHAL*, sendo esse gene expresso 12,45; 48,23 e 18,07 vezes mais do que plantas inoculadas unicamente com bactérias, unicamente com nematoides e da testemunha, respectivamente. Ainda, em relação ao gene *CHAL*, plantas infectadas com *H. glycines* diferenciaram-se estatisticamente das plantas da testemunha, expressando até 2,66 vezes menos esse gene. O mesmo foi observado na avaliação da expressão do gene *FAL*, em que plantas com *B. thuringiensis* e com *H. glycines* foram regulados positivamente, produzindo de 2,18 a 14,80 vezes mais o gene *FAL*, diferenciando-se da testemunha e dos demais tratamentos. Quando os microrganismos estavam presentes isoladamente, a plantas produziram de 3,63 a 6,77 vezes menos *FAL*, em relação à testemunha. Para o gene *PR1*, aos 7 dai, ocorreu a regulação negativa nos tratamentos que receberam nematoides, sendo esses diferentes estatisticamente da testemunha e do tratamento que recebeu unicamente *B. thuringiensis* (Figura 11^a).

Aos 15 dai, com exceção do gene de defesa *BBI*, os genes foram influenciados quando na presença de *B. thuringiensis* e *H. glycines* ($p < 0,05$) (Figura 11B; Material Suplementar S6). A co-inoculação de *B. thuringiensis* e *H. glycines* acarretou a regulação negativa de 3,83 vezes a expressão de *KTI*, em relação à testemunha, sendo diferentes pela análise estatística. A presença de *B. thuringiensis* (tratamentos M51 e M51 + Hg) em plantas de soja ocasionou a regulação positiva do gene *ACS*, sendo expresso de 14,3 a 25 vezes mais que na testemunha e em plantas infectadas por *H. glycines*. Já o gene de defesa *CHAL* diferenciou-se dos demais tratamentos em plantas que receberam unicamente *B. thuringiensis*, produzindo até 4,89 vezes mais esse gene, em relação à testemunha. O mesmo foi observado na expressão do gene *FAL*, em que plantas tratadas com bactérias produziram 3,8 vezes mais *FAL* que plantas que compunham a testemunha. No entanto, a co-inoculação dos organismos levou a regulação negativa desse gene, quando comparado à testemunha. Por fim, houve a regulação positiva do gene *PR1* em plantas que receberam *B. thuringiensis* e/ou *H. glycines*, quando comparados à

testemunha. Nesse caso, além de diferenciarem da testemunha, foram diferentes entre si. Plantas que receberam bactérias obtiveram valores maior de expressão de *PR1*, em relação a que recebeu unicamente *H. glycines* (Figura 11B).

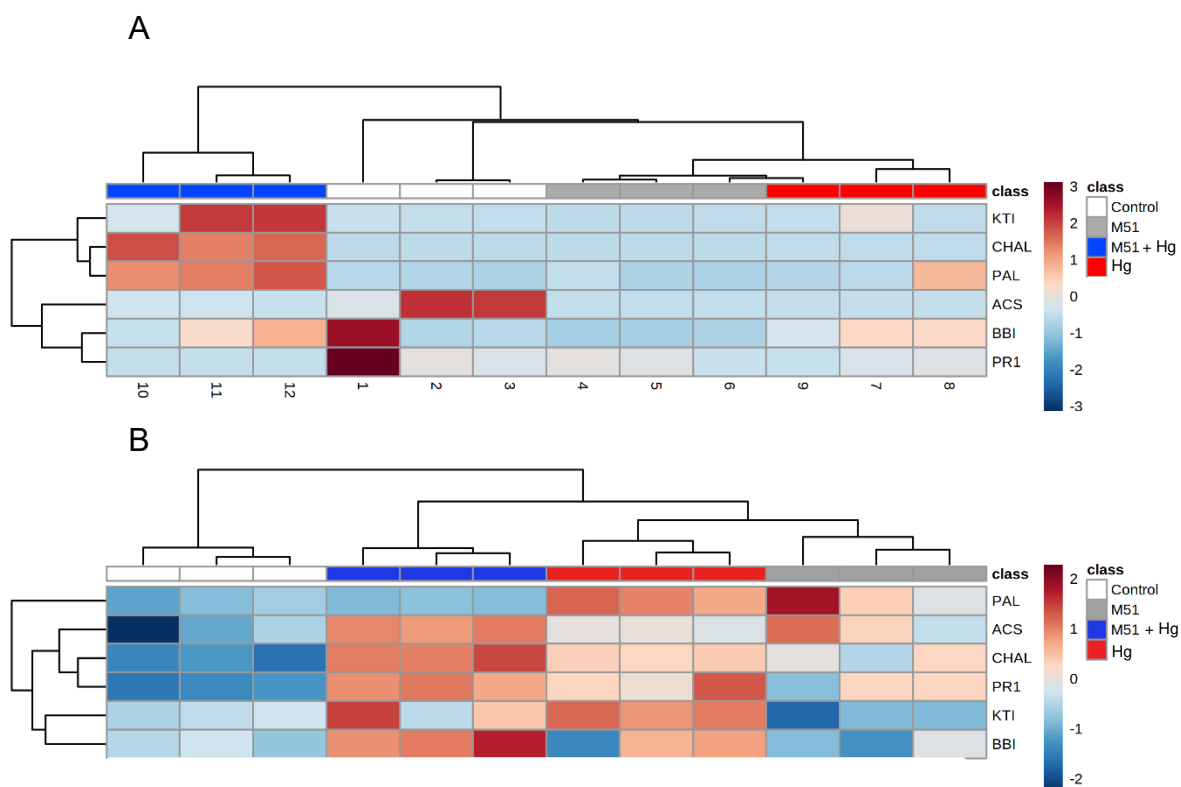


Figura 11 – Representação do mapa de calor da expressão diferencial dos genes relacionados à defesa em tecidos radiculares de soja tratados com o isolado M51 de *Bacillus thuringiensis* aos 7 e 15 dias após a inoculação (dai) de *Heterodera glycines* (Hg). Em (A) plantas avaliadas aos 7 dai e em (B) plantas avaliadas aos 15 dai. A expressão dos genes é representada no mapa de calor na escala de cores de -2 a 2 no esquema de cores azul-vermelho. Os genes são representados em linhas enquanto os tratamentos em colunas. A amplificação do gene Ubiquitina (*UBIQ*) da soja foi utilizada como controle interno para normalização dos dados. Para cada amostra de raiz, foram utilizadas três repetições biológicas com suas respectivas duas repetições técnicas.

4. DISCUSSÃO

4.1 – O controle biológico: *Bacillus thuringiensis* é uma bactéria amplamente estudada no manejo de pragas e patógenos agrícolas (Sediyama et al., 2015). Nesse artigo, foi confirmada a atividade nematicida de quatro isolados bacterianos de *B. thuringiensis* (M51, T03, Br58 e T13) no controle de nematoides importantes para a soja, as espécies *M. javanica*, *P. brachyurus* e *H. glycines*. De acordo com os experimentos com os metabólitos dos diferentes isolados de *B. thuringiensis*, foi demonstrado que existe mais de um composto com atividade nematicida e que há especificidade dos compostos com o gênero de nematoide avaliado. Para alguns

isolados, a desnaturação de proteínas por temperatura causou a inibição do efeito nematotóxico sobre *M. javanica* e *P. brachyurus*, mas não para *H. glycines*, o que justifica a hipótese mencionada acima. Além disso, é possível que o modo de ação de *B. thuringiensis* sobre *H. glycines* ocorra por outro fator, que não seja metabólitos. Um dos isolados, o M51, foi avaliado quanto a sua capacidade de atuar como indutor de resistência contra os três nematoides citados anteriormente e foi comprovado que o tratamento de sementes com isolado M51 de *B. thuringiensis* tornou as plantas mais resistentes à infecção pelos nematoides testados.

Os PPNs foram confrontados com os quatro isolados bacterianos e houve uma redução de 25,8 a 55,9% de suas populações. No entanto, devido ao isolado T13 ter uma eficiência inferior aos demais isolados na redução da população de *P. brachyurus* (25,8%), este não participou dos estudos posteriores. Os isolados testados apresentaram alta eficiência na redução do número dos nematoides em condições de casa de vegetação e o seu uso, no futuro, para o manejo de PPNs em condições de campo deve ser avaliado, uma vez que a não seletividade dos isolados é ideal para o manejo em áreas de produção de soja nas quais ocorrem misturas de gêneros de PPNs.

O mecanismo de ação de *B. thuringiensis* para o controle de nematoide mais documentado é a atividade de proteínas Crys, que são tóxicas a insetos e a nematoides (Bravo et al., 2007; Zi-Quan et al., 2008). Essas proteínas inibem a eclosão, causam mortalidade de J2 e são material de estudo na engenharia genética para a transformação genética de plantas, a fim de obter resistência a PPNs (Li et al., 2008; Yu et al., 2008; Zi-Quan et al., 2008). Além das proteínas Cry, também são conhecidas as proteínas turingiensina, quitinase e metaloproteínases, que são antagonistas a nematoides, mas não há relato na literatura de compostos de *B. thuringiensis* com efeito nematocida (Bel et al., 2022). Neste trabalho, foi utilizado o substrato com metabólitos totais (proteínas e compostos) e substrato em que as proteínas foram desnaturadas por temperatura (apenas compostos), a fim de verificar se o controle exercido pelos isolados foi por meio de proteínas, ou por compostos ou pela combinação do dois. Ao se analisar a taxa de eclosão e a taxa de mortalidade de *M. javanica* quando ovos e juvenis foram tratados com substratos de *B. thuringiensis*, observou-se a presença de metabólitos nematotóxicos, uma vez que independentemente se havia ou não proteínas desnaturadas, ocorreu a inibição total da eclosão e a mortalidade de J2 de *M. javanica*. Esse resultado foi observado para os três isolados bacterianos estudados (M51, Br58 e T03).

Em relação aos metabólitos no controle de *P. brachyurus*, um padrão diferente do que ocorreu para *M. javanica* foi observado, em relação ao isolado T03, em que a desnaturação de

proteínas por temperatura inibiu o seu efeito nematotóxico. Por sua vez, para os metabólitos produzidos pelo isolado M51 e Br58, após submetido à alta temperatura, estes mantiveram sua capacidade de reduzir a população de *P. brachyurus* em raízes de soja, evidenciando a presença de compostos nematotóxico não termossensíveis.

Meloidogyne javanica mostrou-se mais suscetível à ação dos metabólitos dos isolados estudados quando comparado a *P. brachyurus* e a *H. glycines*, sendo este último não influenciado pelos tratamentos. É interessante observar que, independentemente se os metabólitos dos três isolados passaram ou não pelo processo de desnaturação de proteínas por temperatura, mantiveram o efeito nematotóxico sobre *M. javanica*, mas isso não ocorreu para *P. brachyurus* quando confrontados com metabólitos aquecidos de T03. É possível que o composto não termossensível, que causou a mortalidade e inibição da eclosão de juvenis de *M. javanica* não tenha efeito significativo sobre *P. brachyurus*, mas que esse isolado, T03, atua por outros mecanismos. O mesmo é observado para *H. glycines*, justificando experimentos para investigar outros mecanismos de ação destes três isolados de *B. thuringiensis*.

Bacillus cereus, uma bactéria estreitamente relacionada a *B. thuringiensis*, foi capaz de causar mortalidade e inibir a reprodução de *M. incognita* por afetar os tecidos do intestino e dos órgãos reprodutivos, por meio de um metabólito produzido em meio de cultura LB. Posteriormente, com o fracionamento dos metabólitos por diferença de polaridade e o uso de técnicas, como a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS), a identidade do compostos foi descoberta e, com a esfingosina sintetizada, foi confirmado o efeito nematotóxico do composto (Gao et al., 2016). Tais métodos podem ser utilizados para a identificação de compostos produzidos por *B. thuringiensis* capazes de reduzir a população de nematoides.

4.2 – *Bacillus thuringiensis* e *M. javanica* na indução de resistência: a presença de *M. javanica* e/ou de *B. thuringiensis* induziu a resposta de defesa mediada pela via do ácido salicílico (SAR) e do ácido jasmônico (ISR) em plantas aos 7 e 15 dai. No geral, aos 7 dai, os nematoides induziram a regulação positiva de genes de defesa em plantas de soja, enquanto a bactéria de controle biológico os regulou negativamente, mesmo quando os dois microrganismos estavam concomitantes, exceto para o gene *CHAL*. A percepção da presença de J2 de *M. javanica* acarretou o forte aumento da expressão do gene *ACS* aos 7 dai e de *FAL* aos 7 e 15 dai. No entanto a presença da bactéria, *B. thuringiensis*, aos 7 dai, reduziu a expressão de *FAL*, neutralizando o efeito de resposta causada pela infecção dos nematoides. Contudo, *B.*

thuringiensis interferiu positivamente na expressão de *CHAL* aos 7 dai e de *ACS*, *FAL* e *PR1* aos 15 dai, atuando como indutor de resistência a infecção de *M. javanica*.

O gene *ACS* codifica para a enzima ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico, que catalisa para a biossíntese do etileno, hormônio já conhecido por atuar na senescência e amadurecimento dos frutos e por inibir a infecção de nematoides do gênero *Meloidogyne* (Fudali et al., 2013; Gheysen e Mitchum, 2019). Essa redução ocorre possivelmente por meio da diminuição na atração das raízes, como já demonstrado ao avaliar *Arabidopsis* e tomateiro expostos a inibidores de síntese do etileno e plantas insensíveis ao etileno, que obtiveram significativamente menos nematoides nos tecidos das raízes (Kumari et al., 2016; Shukla et al., 2018).

O gene *FAL* codifica para a enzima fenilalanina amônia liase, que é a primeira enzima da via dos fenilpropanoides, via metabólica envolvida com mecanismos de defesa mediada por SAR (Koukol e Conn, 1961; Camm e Towers, 1973; Dixon et al., 2002). Os fenilpropanoides são pigmentos florais, antibióticos, protetores da radiação ultravioleta (UV), repelentes de insetos e são importantes para a interação planta-microrganismo, com atividade contra fungos, bactérias, vírus e nematoides fitopatogênicos. Por exemplo, na via dos fenilpropanoides, há produção de compostos fenólicos, lignificação da parede celular e produção de flavonoides e diversas proteínas relacionadas à patogenicidade, como PR1 que é um marcador molecular para SAR e que tem função desconhecida (Dixon et al., 2002; Ohri e Pannu, 2010). Em acordo com a elevação da expressão do gene *FAL*, neste trabalho ocorreu maior produção de compostos fenólicos totais (CFT) e, conseqüentemente, maior lignificação de parede celular, visto que a polimerização dos CFT origina a lignina (Higuchi, 1985). Diversos trabalhos já comprovaram a capacidade de uma variedade de compostos fenólicos vegetais atuarem contra nematoide, reduzindo a eclosão e causando mortalidade (Ohri e Pannu, 2010). Ademais, a polimerização, de CFT para lignina e suberina, ocasiona maior lignificação de parede celular, o que pode impedir ou dificultar a penetração e o movimento dos nematoides no sistema radicular.

O gene *CHAL* é codificado para uma chalcona sintase, que é a primeira enzima específica para a via dos flavonoides, produzindo ‘esqueletos’ de chalcona dos quais derivam todos os flavonoides (Ferreira et al., 2012). Os flavonoides além de estarem envolvidos na resistência a fungos e nematoides sedentários e migradores, têm um importante papel na proteção contra os raios UV, na inibição de auxinas, alelopatia e coloração de flores (Ohri e Pannu, 2010). Já em 1998, por Baldrige et al., eram observados genes da via dos flavonoides envolvidos em resposta de defesa a PPNs do gênero *Pratylenchus*. No entanto, anteriormente a

isso, já era documentado que em plantas de soja resistentes a *M. incognita* ocorria a reação de hipersensibilidade e o acúmulo de gliceolina, um isoflavonoide presentes em plantas soja. Além da gliceolina, outros diversos flavonoides foram capazes de causar a inibição da eclosão, causar motilidade e reduzir a reprodução dos nematoides (Ohri e Pannu, 2010).

4.3 – *Bacillus thuringiensis* e *P. brachyurus* na indução de resistência: em relação à expressão de genes de defesa em plantas que receberam ao *P. brachyurus* e/ou *B. thuringiensis*, no geral, aos 7 dai, a presença do nematoide endoparasita migrador levou à ativação das vias de defesa SAR e IRS, enquanto a combinação dos dois microrganismos ocasionou a regulação negativa, com exceção do gene *CHAL*. Nesse primeiro momento, as bactérias sozinhas não influenciaram as plantas. De forma oposta, aos 15 dai, a presença dos nematoides ocasionou a regulação negativa dos genes enquanto a da bactéria os regulou positivamente. Ainda, aos 15 dai, com a presença do isolado bacteriano, a expressão de *CHAL* foi mantida sob regulação positiva. Aos 7 e 15 dai, *P. brachyurus* e *B. thuringiensis* induziram maior produção de TSP e LGTA. Possivelmente, o mecanismo de defesa induzido pela associação de *P. brachyurus* e *B. thuringiensis* foi semelhante ao que ocorreu para *M. javanica*, por meio da produção de TSP, maior lignificação de parede celular e produção de flavonoides.

4.4 – *Bacillus thuringiensis* e *H. glycines* na indução de resistência: no início da infecção, aos 7 dai, *H. glycines* e *B. thuringiensis*, aplicados de forma isolada, silenciaram a resposta de defesa, porém a combinação dos dois microrganismos induziu resposta de defesa por meio da via do SAR (*CHAL* e *PAL*) e ISR (*KTI*). No entanto, a combinação dos dois microrganismos também acarretou a regulação negativa de genes, como o *ACS*, o que pode ter prejudicado o estabelecimento de *H. glycines* no sistema radicular.

Como mencionado anteriormente, o *ACS* está relacionado à síntese do etileno e, diferentemente do que ocorre para o gênero *Meloidogyne*, esse hormônio vegetal tem efeito positivo na infecção por *H. glycines*, sendo a regulação negativa desse gene interessante como mecanismo de defesa. Em trabalhos anteriores, foi observado que plantas mutantes para a síntese do etileno ou expostas a inibidores do etileno tem menos nematoides de cistos e que o aumento dos níveis de etileno leva ao aumento da expansão do sincício, que são as células de alimentação de *H. glycines* (Goverse et al., 2007; Wubben et al., 2007; Kammerhofer et al., 2015).

A regulação positiva da expressão do gene *BBI*, gene relacionado a inibidores de proteases, aos 7dai, quando os dois microrganismos estão concomitantes, sinaliza para a

resposta de defesa média por ISR. Os inibidores de proteases têm efeito antinutricional em insetos e a nematoides por meio da inibição da atividade proteolítica das enzimas digestivas, interferindo no desenvolvimento e reprodução (Bowman, 1946; Birk et al., 1963; Pompermayer et al., 2003). A regulação positiva de *BBI* combinado com a ativação da SAR, aos 15 dai, expresso pelo marcador molecular *PR1* e com maior produção de TSP, pode ser um dos mecanismos envolvidos na redução de *H. glycines* em raízes de soja.

Para a interação isolada de *B. thuringiensis* ou combinada com PPNs, em alguns casos, houve a regulação negativa de genes defesa de planta. Tais dados podem, de forma errônea, levar à interpretação de que a presença de microrganismos benéficos e/ou controle biológico pode induzir plantas a ficarem mais suscetíveis ao parasitismo de patógenos vegetais. Já foi demonstrado que a atenuação da resposta de defesa promovida por organismos benéficos é semelhante aos dos patógenos e tem o objetivo de estabelecer uma relação simbiótica com plantas sem que sejam confrontados pelos seus mecanismos de defesa. As estratégias podem ser por meio da liberação de efetores, ou em alguns casos, a modificação de MAMPs (Padrões Moleculares Associados a Microrganismos) para que as plantas os percebam de forma mais atenuada (Buscaill e van der Hoorn, 2021). No entanto, vale ressaltar, que ocorre a expressão de genes de defesa importantes como o *CHAL*, que está diretamente relacionado à redução da população de nematoides e, além disso, os agentes de biocontrole utilizam diversos mecanismos de ação, como a produção de metabólitos e proteínas tóxicas, por exemplo. Assim, a combinação de diversos mecanismos de ação, incluindo a regulação de genes importantes, acarreta a redução da população de PPNs, como observado neste trabalho.

Bacillus thuringiensis é um organismo de biocontrole que se mostrou com atividade relevante para o manejo dos três principais nematoides parasitas da soja. Observamos que os metabólitos produzidos pelos três isolados aqui estudados têm efeito nematicida e que *B. thuringiensis* ativa mecanismos de defesa contra *M. javanica*, *P. brachyurus* e *H. glycines* em plantas de soja. Ao investigar os mecanismos de defesa envolvidos, foi observada a ativação de vias de defesa dependentes do ácido salicílico e do ácido jasmônico. De forma comum, genes relacionados à produção de flavonoides e maior produção de compostos fenólicos e derivados da lignina ocorreu para os três nematoides, quando a bactéria estava presente.

5. CONCLUSÃO

Bacillus thuringiensis é um agente eficiente de controle biológico dos três principais nematoides parasitas da soja. Os metabólitos produzidos pelos isolados M51, T03 e Br58 têm atividade nematicida, sendo capazes de inibir totalmente a eclosão e de causar a mortalidade de nematoides. Além disso, esses isolados associam-se epifiticamente às raízes de soja, possibilitando exercer os seus potenciais nematicidas. Por último, a via de defesa mediada pelo ácido salicílico e ácido jasmônico são ativadas em plantas tratadas com *B. thuringiensis*, o que pode contribuir para a redução de nematoides nas raízes.

6. REFERÊNCIAS

- Acedo, J. R., Dropkin, V. H. (1982). Technique for Obtaining Eggs and Juveniles of *Heterodera glycines*. *Journal of Nematology* 14, 420.
- Akram, W., Mahboob, A., Javed, A. A. (2013). *Bacillus thuringiensis* strain 199 can induce systemic resistance in tomato against *Fusarium* wilt. *European Journal of Microbiology and Immunology* 3, 275–280. Doi: 10.1556/EUJMI.3.2013.4.7.
- Baker, K., Cook, R. J. (1974). *Biological control of plant pathogens*. W.H. Freeman and Company.
- Baldrige, G. D., O'Neill, N. R., Samac, D. A. (1998). Alfalfa (*Medicago sativa* L.) resistance to the root-lesion nematode, *Pratylenchus penetrans*: defense-response gene mRNA and isoflavonoid phytoalexin levels in roots. *Plant Molecular Biology* 38, 999–1010. Doi: 10.1023/A:1006182908528.
- Barber, M. S., Ride, J. P. (1988). A quantitative assay for induced lignification in wounded wheat leaves and its use to survey potential elicitors of the response. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 32, 185–197. Doi: 10.1016/S0885-5765(88)80015-8.
- Beegle, C. C., and Yamamoto, T. (1992). History of *Bacillus thuringiensis* Berliner research and development. *The Canadian Entomologist* 124, 587–616. Doi: 10.4039/ENT124587-4.
- Bel, Y., Galeano, M., Baños-Salmeron, M., Escriche, B. (2022). The use of *Bacillus thuringiensis* to control plant-parasitic nematodes More Information. *Journal of Plant Science and Phytopathology*, 62–64. Doi: 10.29328/journal.jpssp.1001076.
- Bezerra, A. R. G., Sedyama, T., Borém, A., Soares, M.M. (2015) – Importância Econômica. In: Sedyama, T.; Silva, F. & Borém, A. (Eds.) – Soja do plantio à colheita. UFV, Viçosa, p. 9-26.
- Birk, Y., Gertler, A., Khalef, S. (1963). A pure trypsin inhibitor from soya beans. *Biochemical Journal* 87, 284. Doi: 10.1042/BJ0870281.
- Bonetti, J. I. S., Ferraz, S. (1981). Modificações do método de Hussey e Barker para extração de ovos de *Meloidogyne 117xigua* em raízes de cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira* 6, 553.
- Bowman, D. E. (1946). Differentiation of Soybean Antitryptic Factors. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 63, 547–550. Doi: 10.3181/00379727-63-15668.
- Bravo, A., Gill, S. S., Soberón, M. (2007). Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon* 49, 423–435. Doi: 10.1016/J.TOXICON.2006.11.022.

Buscaill, P., van der Hoorn, R. A. L. (2021). Defeated by the nines: nine extracellular strategies to avoid microbe-associated molecular patterns recognition in plants. *Plant Cell* 33, 2116–2130. Doi: 10.1093/PLCELL/KOAB109.

Camm, E. L., Towers, G. H. N. (1973). Phenylalanine ammonia lyase. *Phytochemistry* 12, 961–973. Doi: 10.1016/0031-9422(73)85001-0.

Castillo, P., Vovlas, N. (2007). *Pratylenchus (Nematoda: Pratylenchidae): Diagnosis, Biology, Pathogenicity and Management*. Brill doi: 10.1163/EJ.9789004155640.I-523.

CONAB (2021). COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento de safra brasileiro – Boletim da Safra de Grãos – safra 2020/2021. <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos> Acessado em: 12 de outubro de 2022.

Coolen, W. A., D’Herde, C. J. (1972). A Method for the Quantitative Extraction of Nematodes from Plant Tissue. Ghent, Bélgica. State Nematology and Entomology Research Station, , 77p.

Cruz, M. F. A., Pinto, M. O., Barros, E. G., and Rodrigues, F. Á. (2020). Differential gene expression in soybean infected by *Phakopsora pachyrhizi* in response to acibenzolar-S-methyl, jasmonic acid and silicon. *Journal of Phytopathology* 168, 571–580. Doi: 10.1111/JPH.12935.

Dias, W.P., Garcia, A., Silva, J.F.V., Carneiro, G.E.S., 2010. Nematóide em soja: identificação e controle. Londrina: Embrapa soja 8 p. (Circular Técnica 76)..

Dixon, R. A., Achnine, L., Kota, P., Liu, C. J., Reddy, M. S. S., Wang, L. (2002). The phenylpropanoid pathway and plant defence—a genomics perspective. *Molecular Plant Pathology* 3, 371–390. Doi: 10.1046/J.1364-3703.2002.00131.X.

Einhardt, A. M., Ferreira, S., Hawerth, C., Valadares, S. V., Rodrigues, F. Á. (2020). Nickel potentiates soybean resistance against infection by *Phakopsora pachyrhizi*. *Plant Pathology* 69, 849–859. Doi: 10.1111/PPA.13169.

FAOSTAT (2020). FAOSTAT – Countries by commodity. Available at: https://www.fao.org/faostat/en/#rankings/countries_by_commodity [Accessed October 12, 2022].

Ferreira, M. L. F., Rius, S. P., Casati, P. (2012). Flavonoids: Biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Frontiers in Plant Science* 3, 1–15. Doi: 10.3389/FPLS.2012.00222/BIBTEX.

Fortunato, A. A., Debona, D., Bernardeli, A. M. A., Rodrigues, F. A. (2015). Defence-Related Enzymes in Soybean Resistance to Target Spot. *Journal of Phytopathology* 163, 731–742. Doi: 10.1111/JPH.12370.

Fudali, S. L., Wang, C., Williamson, V. M. 2013. Ethylene signaling pathway modulates attractiveness of host roots to the root-knot nematode *Meloidogyne hapla*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 26:75–86.

- Gao, H., Qi, G., Yin, R., Zhang, H., Li, C., Zhao, X. (2016). *Bacillus cereus* strain S2 shows high nematocidal activity against *Meloidogyne incognita* by producing sphingosine. *Scientific Reports* 6, 1–11. Doi: 10.1038/SREP28756.
- Gheysen, G., and Mitchum, M. G. (2019). Phytoparasitic Nematode Control of Plant Hormone Pathways. *Plant Physiology* 179, 1212–1226. Doi: 10.1104/PP.18.01067.
- Goverse, A., Overmars, H., Engelbertink, J., Schots, A., Bakker, J., Helder, J. (2000) Both induction and morphogenesis of cyst nematode feeding cells are mediated by auxin. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13: 1121–1129
- Haegeman, A., Mantelin, S., Jones, J. T., Gheysen, G. (2012). Functional roles of effectors of plant-parasitic nematodes. *Gene* 492, 19–31. Doi: 10.1016/J.GENE.2011.10.040.
- Hewezi, T., Baum, T. J. (2013). Manipulation of plant cells by cyst and root-knot nematode effectors. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 26:9-16.
- Higuchi, Takayoshi. (1985). “Biosynthesis of Lignin,” in *Biosynthesis and biodegradation of wood components*, ed. Takayoshi. Higuchi (Academic Press), 141–159.
- Hussey, R. S., Barker, K. R. (1973). A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. *Plant Disease Reporte* 57, 1025–1028.
- Jenkins, W. R. (1964). A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant Disease Reporter* 48, 692.
- Jia, F., Peng, S., Green, J., Koh, L., Chen, X. (2020). Soybean supply chain management and sustainability: A systematic literature review. *Journal of Cleaner Production* 255. Doi: 10.1016/j.jclepro.2020.120254.
- Jones, J. T., Haegeman, A., Danchin, E. G. J., Gaur, H. S., Helder, J., Jones, M. G. K., Kikuchi, T., Manzanilla-López, R., Palomares-Rius, J. E., Wesemael, W. M. L., Roland, P. N. (2013). Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 14, 946–961. Doi: 10.1111/MPP.12057.
- Kammerhofer, N., Radakovic, Z., Regis, J. M. A., Dobrev, P., Vankova, R., Grundler, F. M. W., Siddique, S., Hofmann, J., Wiczorek, K. (2015). Role of stress-related hormones in plant defence during early infection of the cyst nematode *Heterodera schachtii* in *Arabidopsis*. *New Phytologist* 207, 778–789. Doi: 10.1111/NPH.13395.
- Koukol, J., Conn, E. E. (1961). The Metabolism of Aromatic Compounds in Higher Plants: IV. Purification and properties of the phenylalanine deaminase of *Hordeum vulgare*. *Journal of Biological Chemistry* 236, 2692–2698. Doi: 10.1016/S0021-9258(19)61721-7.
- Kumari, C., Dutta, T. K., Banakar, P., Rao, U. (2016). Comparing the defence-related gene expression changes upon root-knot nematode attack in susceptible versus resistant cultivars of rice. *Scientific Reports* 6, 1–13. Doi: 10.1038/srep22846.

- Li, X. Q., Tan, A., Voegtline, M., Bekele, S., Chen, C. S., Aroian, R. v. (2008). Expression of Cry5B protein from *Bacillus thuringiensis* in plant roots confers resistance to root-knot nematode. *Biological Control* 47, 97–102. Doi: 10.1016/J.BIOCONTROL.2008.06.007.
- Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 25, 402–408. Doi: 10.1006/METH.2001.1262.
- Macedo, N., Macedo, D., Campos, M., Novaretti, W., Ferraz, L. (2012). Manejo de pragas e nematoides. In: Santos, F.; Borem, A.; Caldas, C. (Eds.). *Cana-deaçúcar: bioenergia, açúcar e etanol*, 2º ed. UFV, Viçosa-MG, p.119-160.
- Machado, A. C. Z., Silva, A. S. (2019). “Extração de Nematoides,” in *Métodos em Nematologia Agrícola*, eds. A. C. Z. Machado, S. A. da Silva, and L. C. C. B. Ferraz (Piracicaba: Sociedade Brasileira de Nematologia), 9–35.
- AGROFIT (2022). Sistemas de agrotóxicos fitossanitários. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acessado em 12 de outubro de 2022.
- Melo, A. L. D. A., Soccol, V. T., Soccol, C. R. (2014). *Bacillus thuringiensis*: mechanism of action, resistance, and new applications: a review. *Critical Reviews in Biotechnology* 36, 317–326. Doi: 10.3109/07388551.2014.960793.
- Niblack, T. L., Lambert, K. N., Tylka, G. L. (2006). A Model Plant Pathogen from the Kingdom Animalia: *Heterodera glycines*, the Soybean Cyst Nematode. *Annual Review of Phytopathology* 44, 283–303. Doi: 10.1146/annurev.phyto.43.040204.140218.
- Ohri, P., Pannu, S. K. (2010). Effect of phenolic compounds on nematodes- A review. *Journal of Applied and Natural Science* 2, 344–350. Doi: 10.31018/JANS.V2I2.144.
- Pompermayer, P., Falco, M. C., Parra, J. R. P., Silva-Filho, M. C. (2003). Coupling diet quality and Bowman-Birk and Kunitz-type soybean proteinase inhibitor effectiveness to *Diatraea saccharalis* development and mortality. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 109, 217–224. Doi: 10.1046/J.0013-8703.2003.00107.X.
- Rashed, N. A., MacDonald, M. H., Matthews, B. F. (2008). Protease Inhibitor Expression in Soybean Roots Exhibiting Susceptible and Resistant Interactions with Soybean Cyst Nematode. *Journal of Nematology* 40, 138. Available at: /pmc/articles/PMC2586541.
- Rodrigues, F. Á., Jurick, W. M., Datnoff, L. E., Jones, J. B., Rollins, J. A. (2005). Silicon influences cytological and molecular events in compatible and incompatible rice-*Magnaporthe grisea* interactions. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 66, 144–159. Doi: 10.1016/J.PMPP.2005.06.002.
- Roh, J. Y., J Choi, ae Y., Li, M. S., Jin, B. R., Je, Y. H. (2007). *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for insect pest control. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 17, 547–559.

Romeiro, R. S. (2013). Técnica de microgota para contagem de células bacterianas viáveis em uma suspensão. Laboratório de Bacteriologia de Plantas. Disciplina FIP- 640. Bactérias Fitopatogênicas. Roteiro das aulas práticas. Aula 08 Unidade 09 Técnica da microgota. 1–7. Available at: <https://pt.slideshare.net/mayconcoliveira3/tecnica-de-microgota-33443889> [Accessed October 17, 2022].

Sediyama, T., Silva, F., Borém, A. eds. (2015). *Soja: do plantio à colheita*. Editora UFV.

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, 615–633. Doi: 10.1111/MPP.12547.

Silva, J. F. V., Dias, W. P., Garcia, A., Carneiro, G. E. de S. (2006). Perdas por nematóides chegam a 10,6% da soja mundial. 103–107.

Takahashi, H., Nakaho, K., Ishihara, T., Ando, S., Wada, T., Kanayama, Y., Asano, S., Yoshida, S., Tsushima, S., Hyakumachi, M. (2014). Transcriptional profile of tomato roots exhibiting *Bacillus thuringiensis*-induced resistance to *Ralstonia solanacearum*. *Plant Cell Reports* 33:1 33, 99–110. doi: 10.1007/S00299-013-1515-1.

Tefft, P. M., Bone, L. W. (1984). Zinc-mediated hatching of eggs of soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*. *Journal of Chemical Ecology* 10, 361–372. doi: 10.1007/BF00987863.

Wubben, M. J. E., Su, H., Rodermel, S. R., Baum, T. J. (2007). Susceptibility to the Sugar Beet Cyst Nematode Is Modulated by Ethylene Signal Transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14, 1206–1212. doi: 10.1094/MPMI.2001.14.10.1206.

Yoshida, S., Koitabashi, M., Yaginuma, D., Anzai, M., Fukuda, M. (2019). Potential of bioinsecticidal *Bacillus thuringiensis* inoculum to suppress gray mold in tomato based on induced systemic resistance. *Journal of Phytopathology* 167, 679–685. doi: 10.1111/JPH.12864.

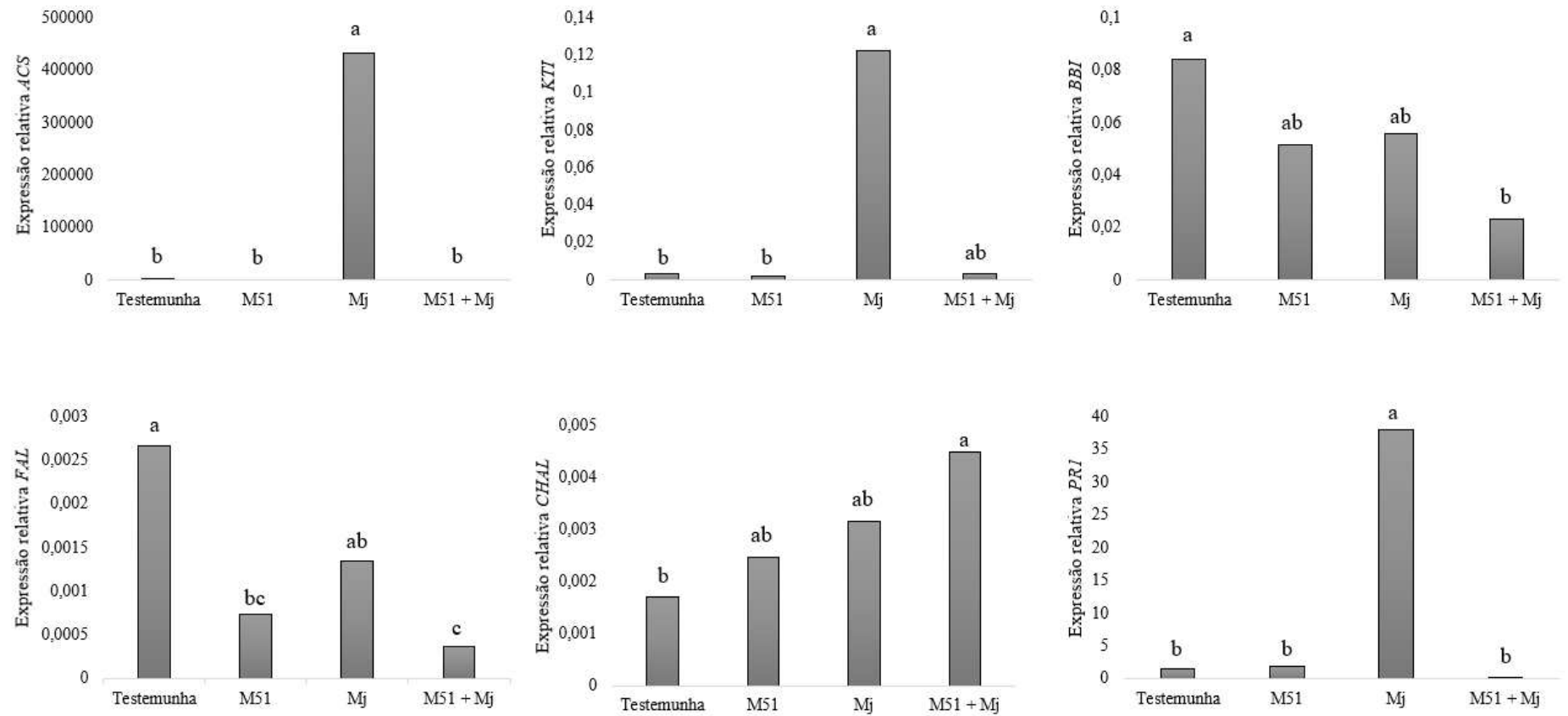
Youssef, R. M., MacDonald, M. H., Brewer, E. P., Bauchan, G. R., Kim, K. H., Matthews, B. F. (2013). Ectopic expression of AtPAD4 broadens resistance of soybean to soybean cyst and root-knot nematodes. *BMC Plant Biology* 13, 1–11. doi: 10.1186/1471-2229-13-67/TABLES/5.

Yu, Z., Bai, P., Ye, W., Zhang, F., Ruan, L., Yu, Z., Sun, M. (2008). A Novel Negative Regulatory Factor for Nematicidal Cry Protein Gene Expression in *Bacillus thuringiensis*. *J Microbiol Biotechnol* 6, 1033–1039.

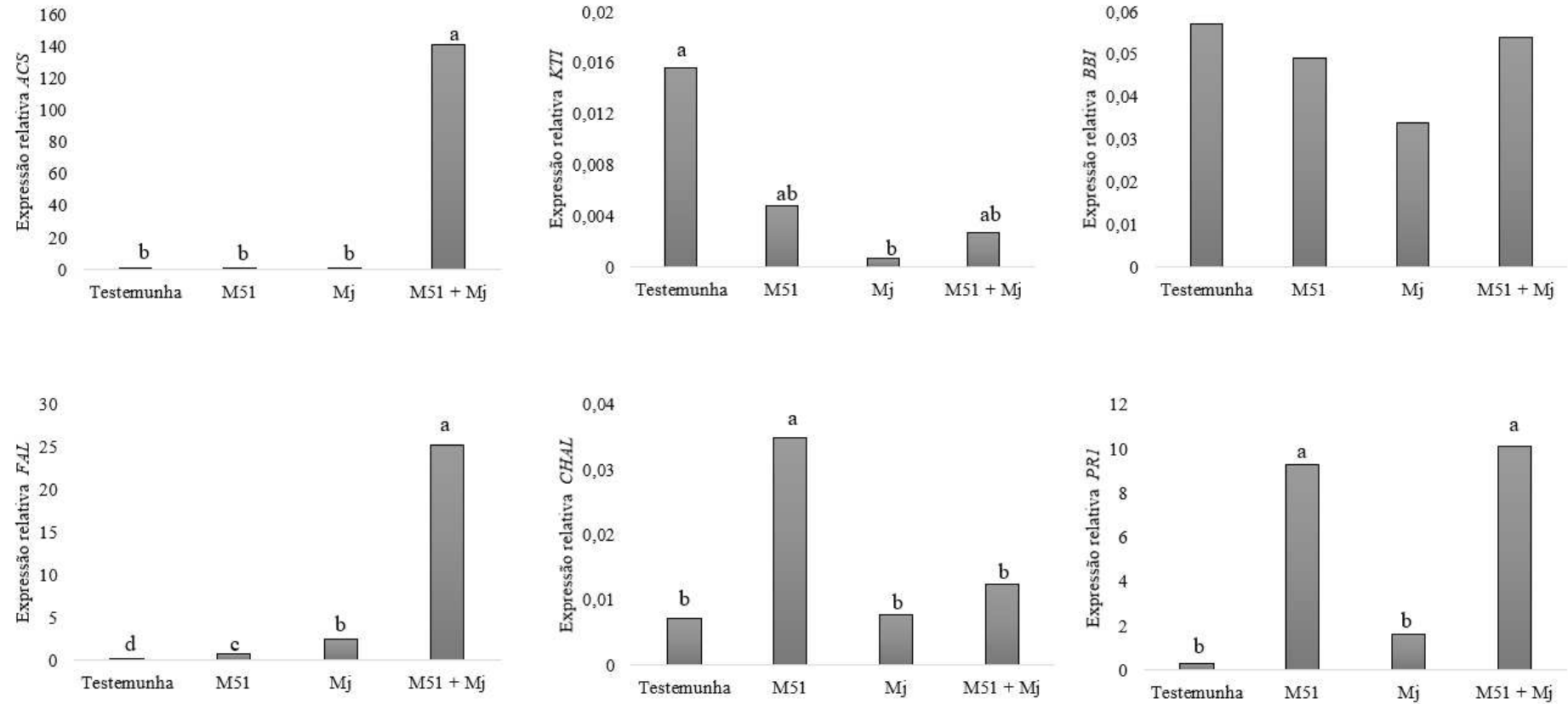
Zauza, E. A. v., Alfenas, A. C., Mafia, R. G. (2016). “Esterilização, preparo de meios de cultura e fatores associados ao cultivo de fitopatógenos,” in *Métodos em Fitopatologia*, eds. A. C. Alfenas and R. G. Mafia (Viçosa: Editora UFV), 27–54.

Zieslin, N., Ben-Zaken, R. (1993). Peroxidase activity and presence of phenolic substances in peduncles of rose flowers. *Plant physiology and biochemistry (Paris)* 31, 333–339.

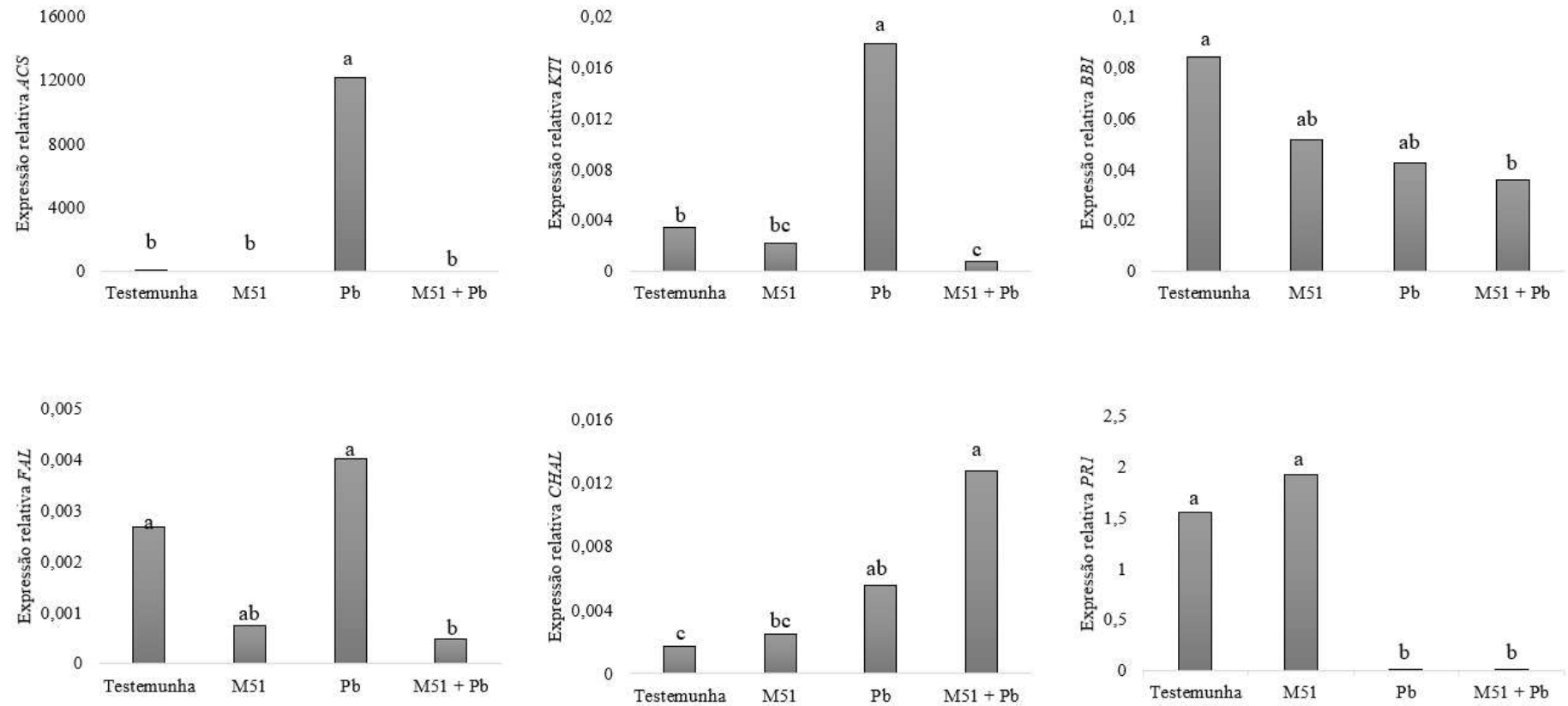
Zi-Quan, Y., Qian-Lan, W., Bin, L., Xue, Z., zi-Niu, Y., Ming, S. (2008). *Bacillus thuringiensis* crystal protein toxicity against plant-parasitic nematodes. *Chinese Journal of Agricultural Biotechnology* 5, 13–17. doi: 10.1017/S1479236208002003.



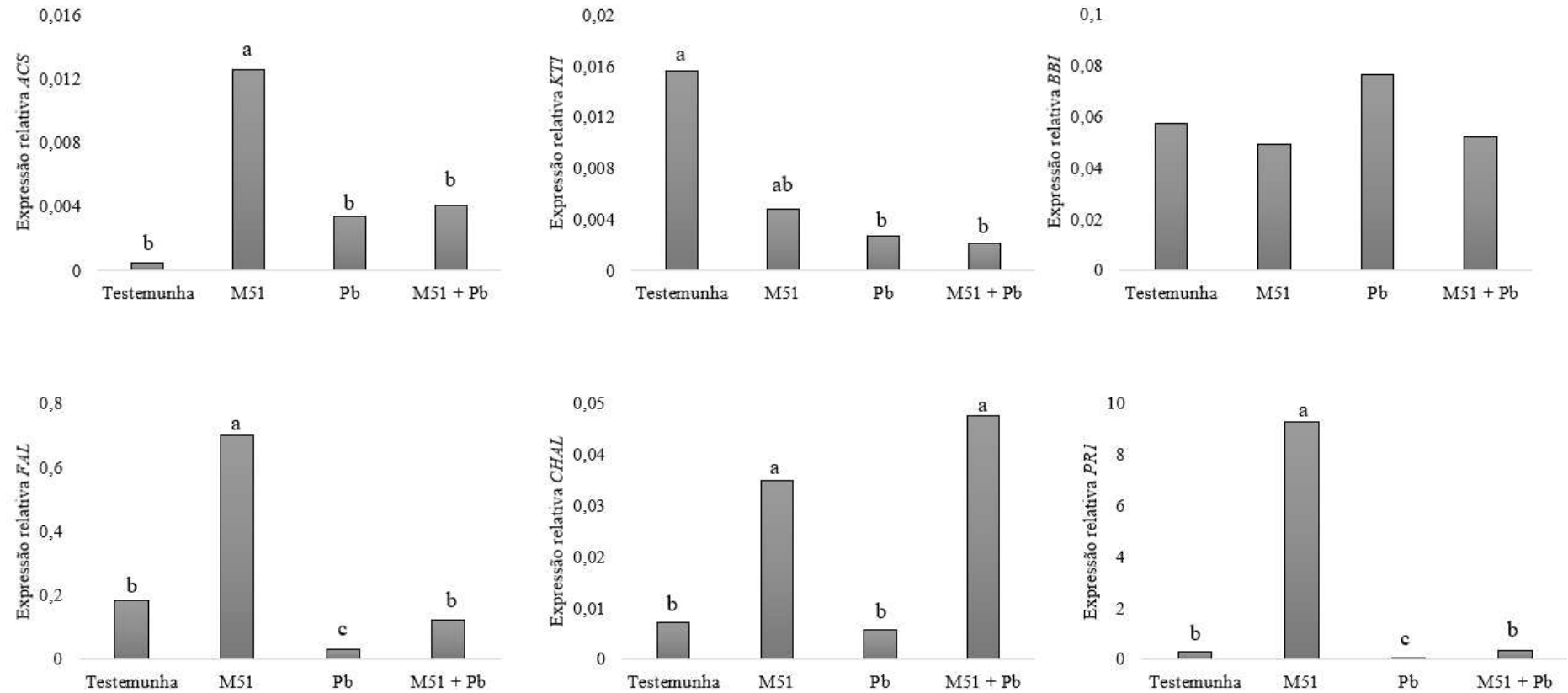
Material suplementar S1 - Expressão relativa de genes relacionados à defesa (7 dias após a inoculação) em raízes de soja tratadas com *B. thuringiensis* (M51), e infectadas por *M. javanica* (Mj) e com a combinação dos dois microrganismos (M51 + Mj). A testemunha corresponde às plantas que não receberam bactéria ou nematoide. Colunas com a mesma letra não são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey (p < 0,05).



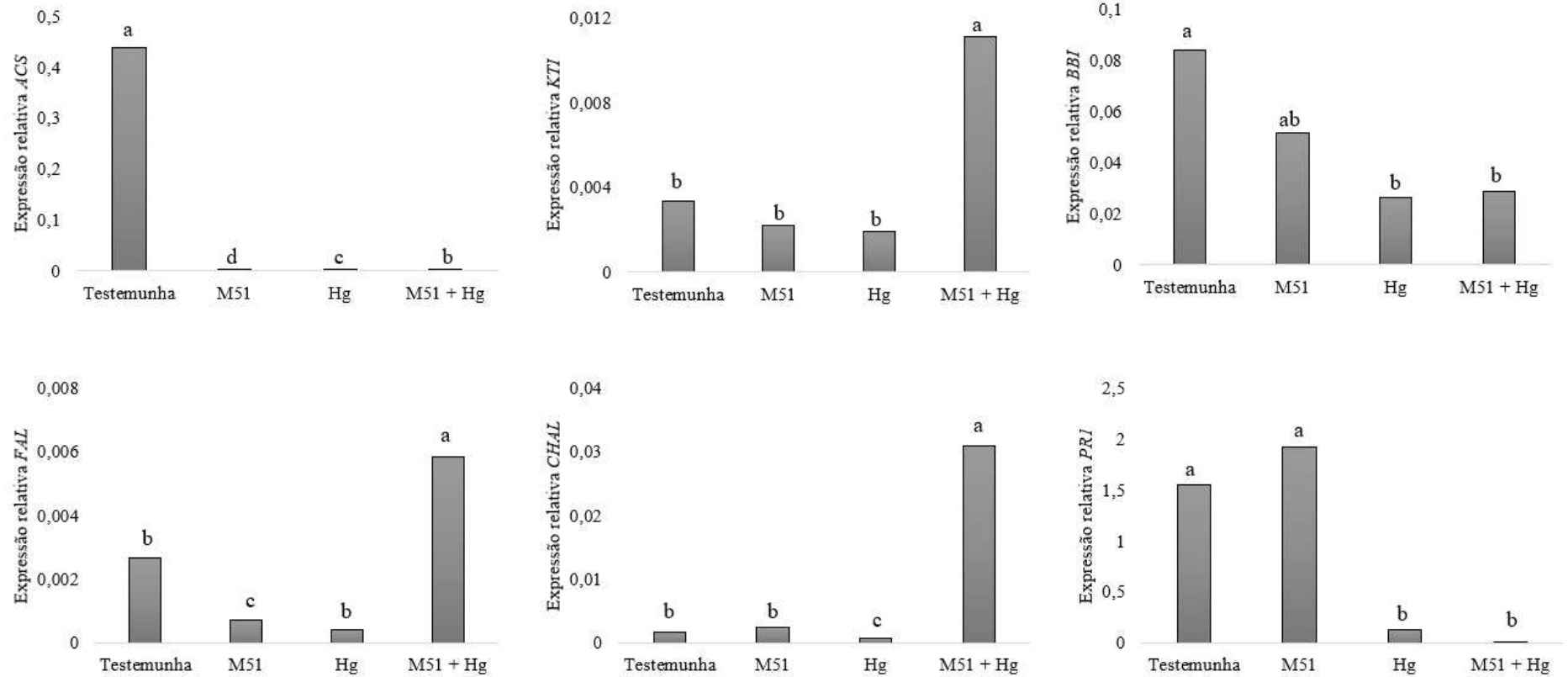
Material suplementar S2 - Expressão relativa de genes relacionados à defesa (15 dias após a inoculação) em raízes de soja tratadas com *B. thuringiensis* (M51), e infectadas por *M. javanica* (Mj) e com a combinação dos dois microrganismos (M51 + Mj). A testemunha corresponde às plantas que não receberam bactéria ou nematoide. Colunas com a mesma letra não são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).



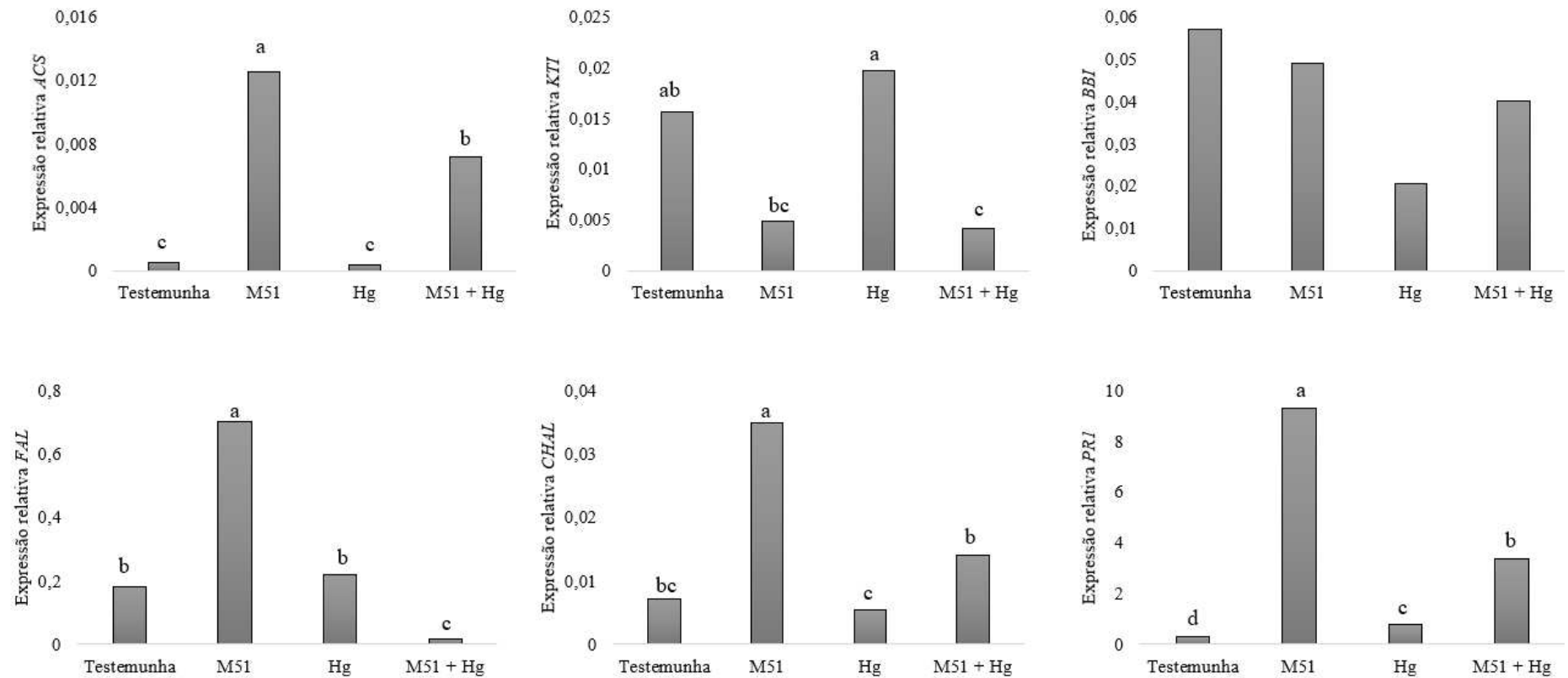
Material suplementar S3 - Expressão relativa de genes relacionados à defesa (7 dias após a inoculação) em raízes de soja tratadas com *B. thuringiensis* (M51), e infectadas por *P. brachyurus* (Pb) e com a combinação dos dois microrganismos (M51 + Pb). A testemunha corresponde às plantas que não receberam bactéria ou nematoide. Colunas com a mesma letra não são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).



Material suplementar S4 - Expressão relativa de genes relacionados à defesa (15 dias após a inoculação) em raízes de soja tratadas com *B. thuringiensis* (M51), e infectadas por *P. brachyurus* (Pb) e com a combinação dos dois microrganismos (M51 + Pb). A testemunha corresponde às plantas que não receberam bactéria ou nematoide. Colunas com a mesma letra não são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).



Material suplementar S5 - Expressão relativa de genes relacionados à defesa (7 dias após a inoculação) em raízes de soja tratadas com *B. thuringiensis* (M51), e infectadas por *H. glycines* (Hg) e com a combinação dos dois microrganismos (M51 + Hg). A testemunha corresponde às plantas que não receberam bactéria ou nematoide. Colunas com a mesma letra não são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).



Material suplementar S5 - Expressão relativa de genes relacionados à defesa (15 dias após a inoculação) em raízes de soja tratadas com *B. thuringiensis* (M51), e infectadas por *H. glycines* (Hg) e com a combinação dos dois microrganismos (M51 + Hg). A testemunha corresponde às plantas que não receberam bactéria ou nematoide. Colunas com a mesma letra não são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

CONCLUSÕES GERAIS

- O isolado Pc10 de *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* é um agente de biocontrole eficiente em reduzir a população de *Pratylenchus brachyurus* em raízes soja;
- A presença de *P. chlamydosporia* e *P. brachyurus* induz vias de defesa dependentes de ácido salicílico e ácido jasmônico e a combinação desses dois microrganismos em plantas causa maior expressão de genes relacionados à defesa e produção de compostos antagonistas aos nematoides;
- Os isolados T03, T13, Br58 e M51 de *Bacillus thuringiensis* são eficientes em reduzir a população de *Meloidogyne javanica*, *Heterodera glycines* e *Pratylenchus brachyurus*, que são os três principais nematoides parasitas da soja;
- Os metabólitos produzidos por *Bacillus thuringiensis* tem atividade nematicida contra *Meloidogyne javanica*, *Heterodera glycines* e *Pratylenchus brachyurus*;
- *Bacillus thuringiensis* isolado M51 induz a via de defesa mediada por ácido salicílico e ácido jasmônico em plantas de soja, o que pode contribuir para a redução de nematoides radiculares.