

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

Seleção de rizobactérias para o controle de *Meloidogyne javanica* e para a promoção de crescimento da soja.

Dyênici Rodrigues
Magister Scientiae

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2024**

DYÊNICI RODRIGUES

Seleção de rizobactérias para o controle de *Meloidogyne javanica* e para a promoção de crescimento da soja.

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

Orientador: Leandro Grassi de Freitas

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2024**

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

T

R696s
2024
Rodrigues, Dyênici, 1998-
Seleção de rizobactérias para o controle de *Meloidogyne javanica* e para promoção de crescimento da soja / Dyênici Rodrigues. – Viçosa, MG, 2024.
1 dissertação eletrônica (43 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Leandro Grassi de Freitas.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Fitopatologia, 2024.
Referências bibliográficas: f. 37-43.
DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2024.831>
Modo de acesso: World Wide Web.

1. Soja - Doenças e pragas - Controle biológico.
2. Nematoda em plantas. 3. Rizóbio. 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

DYÊNICI RODRIGUES

Seleção de rizobactérias para o controle de *Meloidogyne javanica* e para a promoção de crescimento da soja.

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

APROVADA: 20 de agosto de 2024.

Assentimento:

Dyênici Rodrigues
Autora

Leandro Grassi de Freitas
Orientador

Essa dissertação foi assinada digitalmente pela autora em 20/12/2024 às 17:55:47 e pelo orientador em 20/12/2024 às 18:48:31. As assinaturas têm validade legal, conforme o disposto na Medida Provisória 2.200-2/2001 e na Resolução nº 37/2012 do CONARQ. Para conferir a autenticidade, acesse <https://siadoc.ufv.br/validar-documento>. No campo 'Código de registro', informe o código **CJXK.QIT9.VY90** e clique no botão 'Validar documento'.

Aos meus pais, Nilton César (in memorian) e Lindinaura. Nem toda a eternidade seria o suficiente para eu amar vocês. Obrigada por renunciarem aos seus sonhos para que eu pudesse viver os meus. Sempre será por vocês!

AGRADECIMENTOS

A Deus. Sem seu amor, eu nada seria. Mesmo dando inúmeros motivos para não ser amada, o Senhor permanece comigo todos os dias.

Aos meus pais. Papai, onde estiver, obrigada por não me deixar desistir. Mesmo no seu pior dia, sua força e determinação me fizeram continuar o caminho que sonhamos juntos. Hoje você não comemora comigo, mas sei que estaria orgulhoso de me ver aqui. Sigo te amando, todos os dias. Seus esforços e dedicação serão honrados. Saudades. Mamãe, você é a melhor do mundo. Eu não existo sem você. O impossível não existe para você, não quando o assunto sou eu. Trabalha na rua, faz faxina, junta latinhas, mas não me permite desistir dos sonhos que tenho. Essa vida não é o suficiente para eu te amar.

A minha irmã. Graci, você acredita mais em mim do que eu mesma. Você é meu braço direito, minha incentivadora. O quanto eu me orgulho de você, garota. Eu te amo mais que tudo nessa vida. Seremos sempre nós duas.

Ao meu orientador. Obrigada pelo suporte e por acreditar no meu trabalho. Hoje me torno Fitopatologista porque o senhor abriu as portas do seu laboratório para que eu pudesse viver meu sonho. É um prazer imenso saber que tenho seu apoio.

Ao Laboratório de Controle Biológico de Fitonematoides e colaboradores. Obrigada pelo suporte, ensinamentos compartilhados e incentivo para desenvolver minha pesquisa.

A Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Fitopatologia e seus colaboradores. Obrigada por me permitirem viver toda essa experiência e pela oportunidade de realizar a pós-graduação.

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

Aos meus amigos. O que seria de mim sem vocês? Já dizia um velho ditado que, sozinho a gente até vai mais rápido, mas com os amigos vamos mais longe. Eu amo vocês, mais do que consigo explicar. Obrigada por tornarem a caminhada mais leve. Sintam-se abraçados e saibam que estou aqui por vocês assim como estiveram aqui por mim.

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

“Assim como as estações, a vida tem ciclos. Os melhores dias são como memórias antigas de um verão regado de risadas, de aventuras e de calor. Mas depois do verão vem o outono. As folhas caem, as circunstâncias mudam. E o inverno é tão traiçoeiro que é quase impossível notar quando de fato começa e quando termina. Os dias são escuros, mais curtos. Parecem saber que se fossem longos derrubariam até os mais valentes entre nós. As estações nos dão a oportunidade de redescobrirmos o significado do que é paciência. Nos levam à reflexão, à esperança de uma nova primavera. No outono, no inverno, esperamos a primavera chegar. E assim como as estações: a vida.”

(17 de janeiro – Os Arrais)

RESUMO

RODRIGUES, Dyênici, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2024. **Seleção de rizobactérias para o controle de *Meloidogyne javanica* e para a promoção de crescimento da soja.** . Orientador: Leandro Grassi de Freitas.

A soja (*Glycine max*) é uma cultura amplamente cultivada em todo o mundo e o Brasil se destaca nesse cenário com produção estimada de 124 milhões de toneladas do grão. Entretanto, a cultura apresenta grande suscetibilidade a inúmeras pragas e doenças, que comprometem seu rendimento e qualidade dos grãos. Os nematoides do gênero *Meloidogyne* são considerados os mais importantes na cultura da soja, sendo que a espécie *M. javanica* é a de ocorrência mais generalizada. No campo, as lavouras de soja apresentam sintomas em reboleiras, onde é possível observar plantas pequenas, murchas e amareladas devido à deficiência mineral. Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de isolados de rizobactérias para o controle de *Meloidogyne javanica* em soja, bem como seu efeito na promoção de crescimento das plantas. Foram obtidos 50 isolados de rizobactérias e bactérias endofíticas de plantas antagonistas aos fitonematoides. Os isolados foram avaliados nos quesitos formação de endósporos, degradação de quitina e solubilização de fósforo e potássio. Vinte e sete isolados produziram endósporos e foram submetidos a seleção massal através do método de microbiolização de semente e teste em casa de vegetação para o biocontrole do nematoide. O experimento foi conduzido com delineamento inteiramente casualizado e seis repetições por tratamento. Desses isolados, oito se destacaram pelo maior controle do nematoide e foram reavaliados em casa de vegetação quanto ao controle de *M. javanica* e promoção de crescimento vegetal, também em tratamento de sementes. Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado com oito repetições por tratamento. As plantas foram mantidas por 45 dias antes da avaliação. O isolado Cp4 causou o maior controle de *M. javanica*, reduzindo em 65% o número de ovos por grama de raiz e 70% o número de galhas por grama de raiz e foi eficiente em promover o crescimento da soja. Entretanto, os isolados Mc6 e McE4 resultaram em maior promoção de crescimento de plantas de soja. Esses três isolados serão mais profundamente estudados no futuro para o possível desenvolvimento de um produto de biocontrole de nematoides.

Palavras-chave: controle biológico; nematoide-das-galhas; *bacillus* spp.

ABSTRACT

RODRIGUES, Dyênici, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2024. **Selection of rhizobacteria to control *Meloidogyne javanica* and promote soybean growth.** Adviser: Leandro Grassi de Freitas.

Soybean (*Glycine max*) is a crop widely cultivated throughout the world and Brazil stands out in this scenario with an estimated production of 124 million tons of the grain. However, the crop is highly susceptible to numerous pests and diseases, which compromise its yield and grain quality. Nematodes of the genus *Meloidogyne* are considered the most important in soybean crops, with the species *M. javanica* being the most widespread. In the field, plant symptoms of the nematodes infection occur in patches, where it is possible to observe small, withered and yellowed plants due to mineral deficiency. This work aimed to evaluate the potential of rhizobacteria isolates for controlling *Meloidogyne javanica* in soybean (*Glycine max*), as well as its effect on promoting plant growth. Fifty isolates of rhizobacteria and endophytic bacteria were obtained from plants antagonistic to phytonematodes. The isolates were evaluated in terms of endospore formation, chitin degradation and phosphorus and potassium solubilization. Twenty-seven isolates produced endospores and were subjected to mass selection using the seed microbiolization method and a greenhouse test for the biocontrol of the nematode. The experiment was conducted in a completely randomized design with six replications per treatment. Of the isolates, eight stood out for their greater control of the nematode and were reevaluated in a greenhouse on the control *M. javanica* and plant growth promotion, also in seed treatment. The experiments were conducted in a completely randomized design with eight replications per treatment. The plants were maintained for 45 days before the evaluation. The isolate Cp4 caused the greatest control of *M. javanica*, reducing the number of eggs per gram of root by 65% and the number of galls per gram of root by 70% and promoted the soybean growth. The isolates Mc6 and McE4 resulted in greater growth promotion of soybean plants. These three isolates will be further studied for a possible development of a nematode biocontrol product.

Keywords: biological control; root-knot nematode; bacillus spp.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo geral	13
2.2 Objetivos específicos	13
3 MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1 Identificação de <i>Meloidogyne</i> spp.	14
3.2 Obtenção e multiplicação dos inóculos de <i>Meloidogyne javanica</i>	14
3.3 Obtenção das plantas antagonistas	14
3.4 Isolamento de rizobactérias de plantas antagonistas.....	14
3.5 Isolamento das bactérias endofíticas de plantas antagonistas	15
3.6 Seleção de cepas formadoras de endósporos	15
3.7 Seleção de cepas quitinolíticas	15
3.8 Seleção de cepas solubilizadoras de fósforo	16
3.9 Seleção de cepas solubilizadoras de potássio.....	16
3.10 Seleção massal dos isolados para o controle de <i>Meloidogyne javanica</i>	16
3.11 Avaliação em casa de vegetação das cepas para promoção de crescimento de soja e controle de <i>Meloidogyne javanica</i>	17
3.12 Identificação dos isolados	18
3.13 Monitoramento de temperatura	18
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
4.2 Isolamento de rizobactérias de plantas antagonistas.....	20
4.3 Seleção de cepas formadoras de endósporos	20
4.4 Seleção de cepas quitinolíticas, solubilizadoras de fósforo e potássio	21
5 CONCLUSÃO.....	36
REFERÊNCIAS.....	37

1 INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max*) é uma cultura amplamente cultivada em todo o mundo. Sua versatilidade na geração de produtos garante a popularidade da cultura (Saravy et al., 2019). Na safra de 2021/2022, o Brasil produziu cerca de 123,8 milhões de toneladas de grãos de soja em 40,9 milhões de hectares (CONAB, 2022), superando os EUA, que produziram 121,5 milhões de toneladas de grãos de soja em 34,9 milhões de hectares (Estados Unidos, 2022), destacando-se como o principal produtor mundial do grão. Entretanto, como qualquer outra cultura, a soja apresenta grande suscetibilidade a inúmeras pragas e doenças que comprometem seu rendimento e qualidade (Pires et al., 2016; Saravy et al., 2019), e esse é um dos inúmeros desafios enfrentados pelo sojicultores para manter a produção em níveis elevados e bom rendimento (Bueno et al., 2021).

Entre os patógenos que prejudicam a cultura, fitonematoides são de grande importância, pois causam perdas estimadas em US\$ 10 bilhões por ano ao agronegócio brasileiro (Gonzaga e Moura, 2019). Nos campos de produção de soja no Brasil, quatro fitonematoides se destacam: o nematoide do cisto da soja (SCN) (*Heterodera glycines*), o nematoide das galhas (*Meloidogyne* spp.), o nematoide das lesões radiculares (*Pratylenchus brachyurus*) e o nematoide reniforme (*Rotylenchulus reniformes*). Além disso, espécies dos gêneros *Scutellonema* e *Helicotylenchus* estão emergindo como potenciais ameaças à cultura (Machado et al., 2019).

Meloidogyne spp., desponta como o gênero com espécies fitopatogênicas mais significativo. Esses vermes microscópicos são classificados como endoparasitas obrigatórios com hábito sedentário. Causam alterações fisiológicas, bioquímicas e estruturais que debilitam as plantas hospedeiras. Quando infectadas, as plantas apresentam galhas em seu sistema radicular, deficiência de nutrientes e crescimento retardado (Keçici et al., 2022). Os juvenis de segundo estágio, ou J2, são a fase móvel do nematoide que encontram as raízes radiculares e iniciam a infecção (Antil et al., 2021).

Os nematoides desse gênero penetram o sistema radicular das plantas de soja e liberam proteínas efetoras nas células do córtex, que acarretam inúmeras alterações fisiológicas, morfológicas e bioquímicas (Moslehi et al., 2021). Um conjunto de quatro

a oito células próximas ao xilema e floema são ativadas pelo J2 do nematoide e crescem sem se dividir, tornando-se células gigantes, que serão o sítio de alimentação do nematoide que se torna sedentário até o final de seu ciclo de vida. No córtex, as células próximas às células gigantes sofrem hiperplasia e formam um tumor chamado de galha, principal sintoma de uma infecção iniciada por nematoides do gênero *Meloidogyne* (Asmus, 2001). No campo, as lavouras de soja apresentam sintomas em reboleiras, onde é possível observar plantas subdesenvolvidas e amareladas. Uma planta afetada, normalmente, apresenta folhas com manchas cloróticas ou necrose entre as nervuras. Em alguns casos pode não ocorrer redução no tamanho das plantas, contudo, no florescimento, é notório um aumento no abortamento de vagens e amadurecimento prematuro das plantas atacadas (EMBRAPA, 2021)

O ciclo de vida de *Meloidogyne* spp. em soja dura em torno de 25 a 30 dias em condições ideais de temperatura e umidade. Este ciclo divide-se em seis estágios biológicos (ovo, quatro fases de juvenis e fêmea adulta) e cada fêmea pode produzir em torno de 400 ovos, fazendo com que ocorra um aumento significativo na população em um período muito curto de tempo (Ferraz, 2001; Karssen Moens, 2006; Ferraz e Monteiro, 2018). Tal característica torna o controle desse fitopatógeno um desafio muito grande (Norling, 2012; Adam et al., 2014). Na cultura da soja as espécies *Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne incognita* se destacam como os maiores causadores de danos (EMBRAPA, 2021).

Entre os métodos utilizados no manejo de fitonematoides, os nematicidas sintéticos dos grupos dos organofosforados, carbamatos e a abamectina ainda são muito utilizados. Esses produtos atuam no metabolismo de esteroides, respiração e transmissão de impulsos nervosos. Contudo, os microrganismos benéficos que habitam o solo, também podem ser afetados de forma negativa por esses nematicidas, criando impacto direto sobre a microbiota do solo, o que não é desejado (Manzanilla-Lopez et al., 2002). Além disso, existe uma perda muito grande na eficácia desses produtos quando o fitonematoide já invadiu o sistema radicular, visto que sua eficiência é melhor quando o fitonematoide procura de forma ativa hospedeiros no solo. Uma outra questão importante é o crescente surgimento de populações de fitonematoides resistentes aos nematicidas (Torres-Acosta et al., 2012). Todos os efeitos nocivos dos nematicidas sintéticos, sejam eles ao ambiente ou a saúde

humana, demandam o uso de alternativas ecológicas para o controle desses fitopatógenos (Stirling, 2011).

O controle genético, por meio de cultivares resistentes, também é uma alternativa no controle de fitonematoides. Através do uso de ferramentas biotecnológicas, como marcadores moleculares, construção de diferentes bibliotecas de cDNA, sequenciamento, entre outras metodologias, buscam-se genes específicos de resistência que possam ser inseridos, depois que estudados por completo, em cultivares de soja e disponibilizados no mercado (EMBRAPA, 2021).

Uma outra vertente que já era conhecida, mas que vem se destacando nos últimos anos no cenário agrícola quando o assunto é controle de fitonematoides, é o uso de agentes de controle biológico (BCAs). É crescente o número de pesquisadores que começaram a desenvolver nematicidas baseados em agentes biológicos como fungos, bactérias e outros microrganismos (Ahmad et al., 2021). O controle biológico é baseado na ideia de explorar direta ou indiretamente um patógeno ou inimigo natural do parasita, a fim de inibir ou reduzir a incidência ou gravidade de uma doença (Cook e Baker, 1983; Mesa-Valle et al., 2020).

São considerados BCAs os microrganismos que são capazes de suprimir os fitonematoides, seja por antagonismo (parasitando, matando ou consumindo os fitonematoides, ou ainda produzindo moléculas que afetam o fitonematoide de forma negativa) ou por promover algum efeito na planta que aumente suas respostas de defesa (Stirling, 2011).

Entre os BCAs, fungos e bactérias são os microrganismos que mais se destacam. Eles surgem de maneira natural na microbiota do solo e apresentam um grande potencial no controle de fitonematoides (Blyuss et al., 2019; El-Eslamboly et al., 2019). O mercado já dispõe de vários produtos comerciais produzidos por fungos, principalmente dos gêneros *Trichoderma* e *Pochonia*, e bactérias, com destaque para os gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Pasteuria* (Martínez-Medina et al., 2017; Carneiro et al., 2020).

Os BCAs desenvolveram algumas estratégias para atingir os diferentes estágios do ciclo de vida dos fitonematoides, seja por estruturas especializadas, como anéis constritores, redes tridimensionais de hifas e esporos adesivos (Jiang et al.,

2017; Al-Ani et al., 2022), por meio da liberação de compostos nematicidas/nematostáticos, ou ainda por meio de indução de defesa nas plantas que atuarão controlando níveis de fitohormônios, regulando expressão gênica ou aumentando a produção de proteínas (Ghahremani et al., 2020; Huang et al., 2021; Tian et al., 2022). No caso das bactérias, os mecanismos associados ao antagonismo nos fitonematoides podem ser a produção de antibióticos, proteínas Cry, compostos voláteis, proteases, proteases ou toxinas que são capazes de matar o parasita (Wei et al., 2003; Niu et al., 2010; Topalovic et al., 2020)

As bactérias habitantes da rizosfera das plantas e do interior das raízes (endofíticas), conhecidas como rizobactérias, atuam na redução da população de fitonematoides e alguns isolados como promotores de crescimento vegetal (Rashad et al., 2015; Subedi et al., 2020). Dentre os diversos gêneros de rizobactérias, como *Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Bradyrhizobium*, *Flavobacterium*, *Streptomyces*, *Curtobacterium* e *Pseudomonas* entre outros (Siddiqui e Mahmood, 1999; Wani, 2015) *Bacillus* é o gênero mais relatados na literatura com efeitos antagônicos aos fitonematoides e mais utilizado para o desenvolvimento de produtos comerciais por produzir endósporos que conferem grande rusticidade e maior vida de prateleira, além de maior resistência a altas temperaturas.

Estudos relataram grande eficiência de *Bacillus* spp. no controle de nematoides dos gêneros *Meloidogyne*, *Heterodera* e *Rotylenchulus* (Siddiqui e Mahmood, 1999; Kokalis-Burelle et al., 2002; Siddiqui et al., 2005), que são os três dos quatro principais fitonematoides da cultura da soja. As rizobactérias, são, portanto, um grupo de importância significativa no manejo de fitonematoides, atuando de forma direta sobre eles, como por competição e antagonismo, como de forma indireta, através da indução de resistência na planta (Carneiro et al., 2020).

As plantas antagonistas são também bastante utilizadas para o controle de fitonematoides, visto que produzem exsudatos radiculares tóxicos (Miller e Ahrens, 1971) e/ou por mecanismos de resistência, criando condições que não permitem o desenvolvimento e reprodução do nematoide no sistema radicular (Peacock, 1959). Entre as plantas antagonistas a fitonematoides destacam-se as espécies dos gêneros *Crotalaria*, *Mucuna* e *Tagetes* (Ferraz et al., 2001)

As plantas com propriedades antagonistas são dotadas de outra característica marcante, que é possuir em sua rizosfera, maior porcentagem de bactérias antagonistas a fitonematoides do que em plantas não antagonistas, destacando-se as encontradas na rizosfera das leguminosas (Kloepper et al.,1991).

O objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos de rizobactérias isoladas de rizosfera e do interior de raízes de plantas antagonistas na mortalidade, mobilidade e eclosão dos juvenis, além da sua capacidade de promoção de crescimento das plantas, sua atividade quitinolítica e solubilizadora de fósforo e potássio.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Isolar e avaliar o potencial de rizobactérias do rizoplano e do interior das raízes para o controle de *Meloidogyne javanica* e para a promoção de crescimento de soja.

2.2 Objetivos específicos

- Isolar rizobactérias do rizoplano e do interior das raízes de plantas antagonistas a nematoides;
- Avaliar o potencial de rizobactérias para o controle de *Meloidogyne javanica* em casa de vegetação;
- Avaliar a capacidade de promoção de crescimento de soja por isolados de rizobactérias;
- Avaliar a capacidade de solubilização de fósforo e potássio dos isolados em meio de cultura;
- Avaliar a capacidade de degradação de quitina dos isolados em meio de cultura.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos *in vitro* foram conduzidos no Laboratório de Controle Biológico de Fitonematoides (BIONEMA) e os experimentos *in vivo* na casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia, ambos pertencentes à Universidade Federal de Viçosa.

3.1 Identificação de *Meloidogyne* spp.

Fêmeas extraídas de raízes de tomateiro da variedade suscetível Santa Cruz 'Kada' foram submetidas à técnica de eletroforese de isoenzimas para confirmação de espécie, conforme metodologia proposta por Carneiro e Almeida (2001).

3.2 Obtenção e multiplicação dos inóculos de *Meloidogyne javanica*

Após identificação, a população pura de *M. javanica* foi mantida em plantas de tomateiro suscetíveis da variedade Santa Cruz 'Kada' em casa de vegetação. Para obtenção de ovos e J2, a técnica de extração utilizada foi proposta por Hussey e Barker (1973), adaptada por Bonetti e Ferraz (1981).

3.3 Obtenção das plantas antagonistas

As plantas de *Mucuna pruriens* e *Crotalaria paulinia* foram coletadas na Unidade de Ensino, Pesquisa e Extensão em Manejo, Produção, Melhoramento e Conservação de Recursos Fitogenéticos de Hortaliças e Sistemas Agroecológicos (MFHA – Horta Velha) e as plantas de *Crotalaria retusa* foram coletadas na Unidade de Ensino, Pesquisa e Extensão "Vale da Agronomia", ambos setores pertencentes a Universidade Federal de Viçosa.

3.4 Isolamento de rizobactérias de plantas antagonistas

Para o isolamento das rizobactérias foram usados 10 g de segmentos de raízes de plantas de *Mucuna pruriens*, *Crotalaria paulinia* e *Crotalaria retusa*. A essas amostras foram adicionados 100 mL de solução salina (NaCl 0,85%), as quais foram mantidas sob agitação durante 30 minutos em tubos Falcon® em agitador orbital com velocidade de 170 rpm. Das suspensões obtidas, foram realizadas diluições seriadas de fator 10. Uma alíquota de 0,05mL de cada diluição foi colocada em placas de Petri contendo o meio 523 (não seletivo) (Kado e Heskett, 1970) e espalhada com o auxílio de uma alça de Drigalski. Cada tratamento foi composto por quatro repetições. As placas foram transferidas para BOD em temperatura de 28°C onde permaneceram por 48h. As colônias de morfologia diferentes foram selecionadas, repicadas e incubadas em BOD a 28°C para crescimento dos isolados.

3.5 Isolamento das bactérias endofíticas de plantas antagonistas

Para isolamento de bactérias endofíticas, foram coletadas raízes das plantas de *Mucuna pruriens*, *Crotalaria paulinia* e *Crotalaria retusa*, e essas cortadas em segmentos de aproximadamente 1 cm, lavadas com água corrente e enxugadas com papel absorvente. Em seguida, e em câmara de fluxo laminar, a superfície das raízes foi desinfestada com etanol 50% (v/v) durante 1 minuto, hipoclorito de sódio 2% por 6 minutos e lavadas três vezes com água estéril. Os segmentos foram macerados em 5 mL de água estéril com o auxílio de almofariz, e ficaram em repouso por 15 min para difusão das bactérias na solução (Romeiro, 1999b). Da solução resultante do macerado foram plaqueados 0,05 mL em meio 523 (Kado e Heskett, 1970) com o auxílio de uma alça de Drigalski. Cada tratamento foi composto por quatro repetições. As placas foram transferidas para BOD em temperatura de 28°C onde permaneceram por 48 h. As colônias de morfologia diferentes foram selecionadas, repicadas e incubadas em BOD para crescimento dos isolados.

3.6 Seleção de cepas formadoras de endósporos

Para seleção de cepas formadoras de endósporos, tubos Falcon® contendo 20 mL de meio Luria Broth (LB) (Bertani, 2004) líquido e os isolados provenientes dos processos anteriores foram aquecidos em banho-maria a 80°C durante 20 min (Bettioli, 1995). Após esse período, alíquotas de 50 µL foram adicionadas em placas de Petri sobre o meio 523 (Kado e Heskett, 1970) e espalhadas com auxílio de uma alça de Drigalski. As placas foram transferidas para BOD a 28°C, onde permaneceram por 48h. Os isolados que apresentaram crescimento foram selecionados para as próximas etapas. Para cada isolado foram feitas três repetições. Os isolados também foram submetidos ao método de coloração proposto por Schaeffer-Fulton (1933) para visualização de formação de endósporos.

3.7 Seleção de cepas quitinolíticas

Dos isolados que apresentaram crescimento após a seleção de cepas formadoras de endósporos, 5 µL de cada suspensão contendo os isolados foram adicionados sobre um disco de papel em placas de Petri contendo o meio de quitina coloidal (Gupta et al., 1995), e em seguida foram incubados a 28°C por 72h. A avaliação foi feita a partir da observação da formação de halo.

3.8 Seleção de cepas solubilizadoras de fósforo

Dos isolados que apresentaram crescimento após a seleção de cepas formadoras de endósporos, 5 μ L de uma suspensão contendo os mesmos, foram adicionados sobre um disco de papel em placas de Petri contendo o meio NBRIP (National Botanical Research Institute's Phosphato growth medium) (Nautiyal, 1999). Os isolados foram incubados a 28°C por 48h. A avaliação foi feita a partir da observação da formação de halo.

3.9 Seleção de cepas solubilizadoras de potássio

Dos isolados que apresentaram crescimento após o tratamento térmico para a seleção de cepas formadoras de endósporos, 5 μ L de uma suspensão contendo os mesmos, foram adicionados sobre um disco de papel em placas de Petri contendo o meio Aleksandrov (Hu et al., 2006), que em seguida foram incubados a 28°C por 48h. A avaliação foi feita a partir da observação da formação de halo.

3.10 Seleção massal dos isolados para o controle de *Meloidogyne javanica*

Os isolados selecionados a partir dos testes anteriores, foram usados para microbiolização de sementes de soja MONSOY 6410 IPRO utilizando o método proposto por Oostendorp e Sikora (1989) modificado para 24h. As sementes foram imersas em suspensões de solução salina (NaCl 0,85%) padronizadas contendo os isolados ($\lambda = 600\text{nm}$, OD= 0,1) e mantidas em temperatura ambiente. A testemunha foi tratada apenas com solução salina.

As sementes microbiolizadas foram semeadas em vasos de 500 mL contendo substrato composto de solo e areia (3:1) e 10 dias após o desenvolvimento das plântulas, foram inoculados 500 ovos de *M. javanica*. Decorridos 45 dias após a inoculação, as plantas foram retiradas e foram avaliados os números de ovos e de galhas por sistema radicular. Para a extração de ovos, a metodologia usada foi proposta por Hussey e Barker (1973), adaptada. A contagem das galhas foi feita de forma manual. Os tratamentos foram divididos da seguinte forma:

- Sementes não microbiolizadas + 500 ovos de *M. javanica* (controle negativo);

- Sementes microbiolizadas com *Bacillus thuringiensis* isolado M51 (controle positivo) + 500 ovos de *M. javanica*;
- Sementes microbiolizadas com os isolados de rizobactérias + 500 ovos de *M. javanica*.

O isolado de *Bacillus thuringiensis* usado no controle positivo, pertence ao laboratório e possui efeito conhecido como agente de controle de *M. javanica* (Balbino, 2022). O experimento foi conduzido em casa de vegetação, com delineamento inteiramente casualizado e seis repetições por tratamento. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), as médias foram agrupadas pelo teste F e comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Quando necessário, os dados foram transformados usando o método Box Cox, seguindo a equação $f\lambda(x) = x\lambda - 1/\lambda$ para $\lambda \neq 0$. As análises foram feitas usando o software RStudio versão 2023.06.2-561.

3.11 Avaliação em casa de vegetação das cepas para promoção de crescimento de soja e controle de *Meloidogyne javanica*

Os isolados com melhor desempenho após a seleção massal foram levados novamente para a casa de vegetação. As sementes foram novamente microbiolizadas seguindo o mesmo padrão do experimento anterior e semeadas em vasos de 2L contendo substrato composto de solo e areia (3:1).

Para avaliação do efeito de promoção de crescimento, os tratamentos foram divididos em:

- Sementes não microbiolizadas (controle negativo);
- Sementes microbiolizadas com os isolados de melhor desempenho;
- Aplicação de *Pochonia chlamydosporia* (Isolado Pc 10) no suco de plantio com calibração de $2,8 \times 10^6$ clamidósporos/mL por vaso (controle positivo).

O isolado Pc 10 usado no controle positivo, pertence à coleção de fungos do Laboratório de Controle Biológico de Fitonematoides e realiza a colonização e inativação de ovos e fêmeas de nematoides sedentários e promove o crescimento em plantas de soja. Decorridos 45 dias após o plantio, as plantas foram avaliadas quanto

à sua altura, massa fresca de parte aérea, massa seca de parte aérea, massa fresca de raiz e massa seca de raiz. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), as médias foram agrupadas pelo teste F e comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Quando necessário, os dados foram transformados usando \sqrt{x} ou $\log x$. As análises foram feitas usando o software RStudio versão 2023.06.2-561.

Para avaliação do efeito como agentes de controle de *M. javanica*, os tratamentos foram divididos em:

- Sementes não microbiolizadas + 2000 ovos de *M. javanica* (controle negativo);
- Sementes microbiolizadas com *Bacillus thuringiensis* isolado M51 + 2000 ovos de *M. javanica*
- Sementes microbiolizadas + 2000 ovos de *M. javanica*.

As plântulas foram inoculadas 10 dias após semeadura. Decorridos 48 dias após inoculação, as plantas foram retiradas e avaliadas quanto ao número de ovos e galhas por sistema radicular. Para a extração de ovos, a metodologia usada foi proposta por Hussey e Barker (1973), adaptada. A contagem das galhas foi feita de forma manual. O experimento foi conduzido em casa de vegetação, com delineamento inteiramente casualizado e oito repetições por tratamento. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), as médias foram agrupadas pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e comparadas pelo teste de Post-Hoc a 5% de probabilidade. Quando necessário, os dados foram transformados usando \sqrt{x} . As análises foram feitas usando o software RStudio versão 2023.06.2-561.

3.12 Identificação dos isolados

Os isolados com melhor desempenho foram identificados com o meio presuntivo HiCrome™ *Bacillus* Agar Base (HIMEDIA).

3.13 Monitoramento de temperatura

Durante toda a condução do experimento em casa de vegetação, a temperatura foi monitorada. A média mínima ficou em 20,8°C, a média máxima em 33,1°C e a média total em 27,0°C. A temperatura do solo também foi monitorada e a média ficou em 29,5°C.

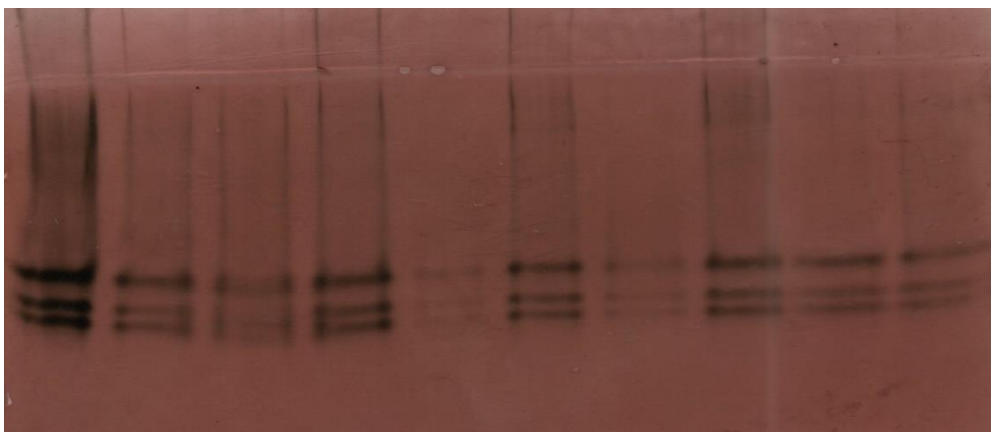
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Identificação da população de *Meloidogyne javanica*

A eletroforese de isoenzimas é baseada na migração de moléculas de acordo com sua carga elétrica e peso molecular em campo elétrico. A identificação de *Meloidogyne* spp. é feita, mais comumente, pela enzima esterase (EST), mas existem outras enzimas que podem ser utilizadas e complementam a informação fornecida pela esterase.

Para a maior parte das populações de *Meloidogyne javanica* o perfil de enzima Est J3 (Rm: 1,0; 1,25; 1,4), entretanto, algumas populações podem apresentar perfil J2 (Rm: 1,0; 1,25) e J2a (Rm: 1,0; 1,4), com a ausência de uma das bandas, presentes no perfil J3. Para a montagem desse experimento, as fêmeas foram extraídas de plantas de tomateiro suscetível e submetidas a essa técnica. Para as duas canaletas externas foram usadas fêmeas de uma população já conhecida e purificada de *Meloidogyne javanica* e para as canaletas internas as fêmeas das populações de interesse para montagem do experimento. Seguindo o padrão de bandas das canaletas externas, as canaletas contendo as fêmeas das populações de interesse também apresentaram o padrão J3 da enzima esterase (Figura 1), confirmando a espécie de *Meloidogyne javanica* e permitindo a condução do experimento com maior segurança e precisão.

Figura 1: O padrão de bandas das canaletas externas (1 e 10), comparado ao padrão de bandas das canaletas internas (2 a 9) apresentam o mesmo padrão J3 da enzima esterase para *Meloidogyne javanica*, confirmando a espécie do nematoide.



4.2 Isolamento de rizobactérias de plantas antagonistas

A partir do isolamento de rizobactérias foram obtidos 33 isolados, dos quais 12 foram provenientes da superfície de raízes de *Mucuna pruriens* (Mucuna Cinza), identificados com Mc, 10 de raízes de *Crotalaria paulinia*, identificados com Cp e 11 de *Crotalaria retusa*, identificados com Cr. Do isolamento de bactérias endofíticas foram obtidos 17 isolados, dos quais 9 provenientes do extrato de raízes de *Mucuna pruriens*, identificados com McE, 5 do extrato de raízes de *Crotalaria paulinia*, identificados com CpE e 11 de *Crotalaria retusa*, identificados com CrE.

4.3 Seleção de cepas formadoras de endósporos

Os 50 isolados obtidos tanto do rizoplano quanto do interior das raízes de soja foram submetidos a um tratamento térmico em banho-maria a 80°C durante 20 min (Bettiol, 1995), com o intuito de selecionar cepas formadoras de endósporos (Figura 2). Dos 50 isolados submetidos ao tratamento térmico, 27 isolados sobreviveram (Tabela 1).

Figura 2: Células bacterianas, do isolado CpE2 de rizobactérias, coloridas pela técnica de Schaeffer-Fulton (1933) para visualização de endósporo após o tratamento térmico. O endósporo, após coloração, assume cor verde e está presente dentro da célula bacteriana.

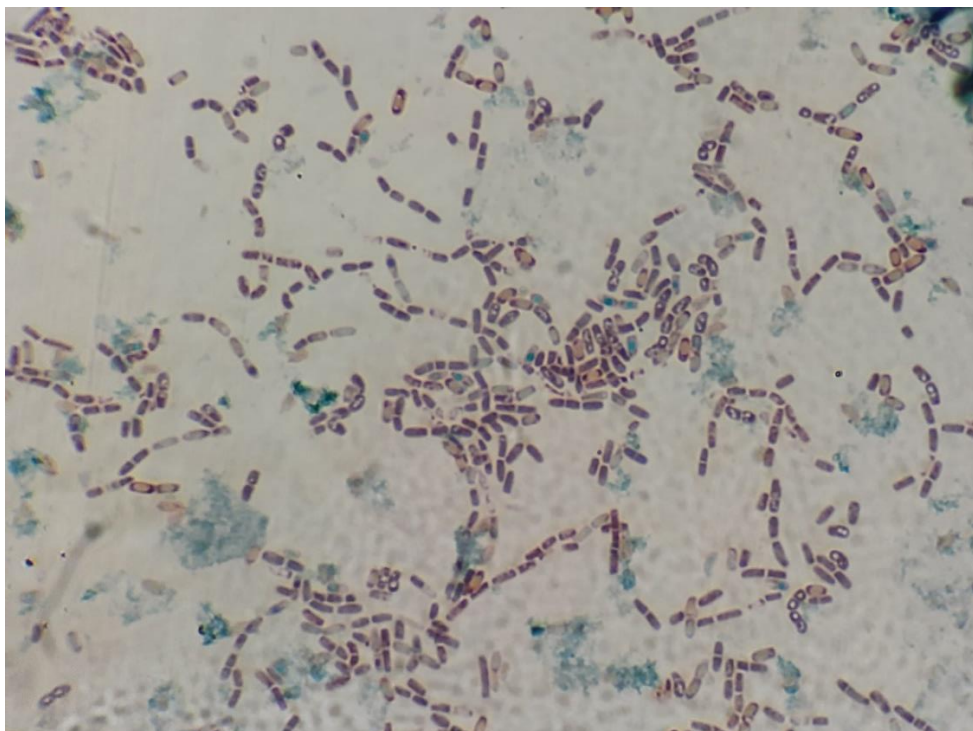


Tabela 1: Isolados de rizobactérias provenientes de plantas antagonistas que sobreviveram ao tratamento térmico.

<i>Mucuna pruriens</i>	<i>Crotalaria paulinia</i>	<i>Crotalaria retusa</i>
Mc4	Cp1	Cr1
Mc5	Cp4	Cr3
Mc6	Cp5	Cr4
Mc8	Cp10	Cr5
Mc10	CpE1	Cr6
Mc11	CpE2	Cr7
Mc12		Cr8
McE1		Cr9
McE2		Cr11
McE4		CrE4
McE5		

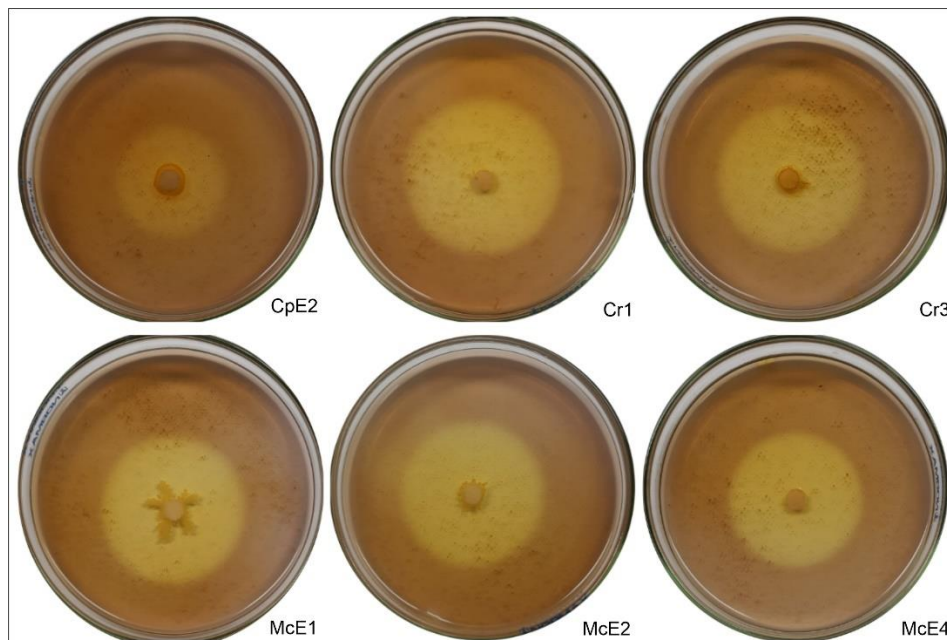
O endósporo ou esporo bacteriano, é uma estrutura de resistência que não apresenta metabolismo. Sua formação se dá pelo processo de desidratação da célula bacteriana e formação de uma parede espessa dentro da membrana celular quando a bactéria se encontra em uma condição adversa ao seu desenvolvimento (Dunlap et al., 2012). Visto que os endósporos bacterianos podem permanecer em estado de dormência por longos períodos e sobreviver em condições críticas, a presença dessa estrutura em um isolado com potencial de controle de patógenos como os fitonematoides, permite que ele seja incorporado ao solo durante o preparo pré-plantio, e assim que as condições foram favoráveis ao seu desenvolvimento, ele atue como agente de controle sobre o patógeno (Tortora et al., 2013). Bactérias do gênero *Bacillus* são as grandes representantes de agentes de biocontrole de sucesso, sendo *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) o grande destaque do controle biológico. Além da sua capacidade de fácil reprodução, *B. thuringiensis* produz proteínas denominadas Cry, das quais Cry, Cry5, Cry6, Cry12, Cry13, Cry14 e Cry21 apresentam atividade nematicida (Guo et al., 2008; Bravo, 2018; Gutiérrez et al., 2019).

4.4 Seleção de cepas quitinolíticas, solubilizadoras de fósforo e potássio

Para a seleção de cepas quitinolíticas, os 27 isolados foram plaqueados em meio contendo quitina coloidal. Após o período de incubação, 6 isolados (Figura 3) apresentaram a formação de halo no meio, indicando a degradação de quitina. As bactérias do gênero *Bacillus* são capazes de degradar uma ampla gama de substratos insolúveis através de enzimas hidrolíticas extracelulares, um exemplo desses

substratos é a quitina (Tolosa, et al., 2022). Um isolado com potencial de degradar quitina pode ser muito promissor para o controle de fitonematoídes, visto que, a casca do ovo de um nematoíde é composta por três camadas: vitelínica (mais externa), quitinosa (intermediária) e lipídica (mais interna) (Eisenback; Hunt, 2009). O principal papel da camada quitinosa é fornecer ao ovo resistência estrutural. Se removida, a camada lipídica poderia ser mais facilmente atingida, o que permitiria a entrada de compostos tóxicos que tornariam os ovos inviáveis, dessa forma, reduzindo a população do patógeno no solo (Arthur; Sanborn, 1969 *apud* Wharton, 1980).

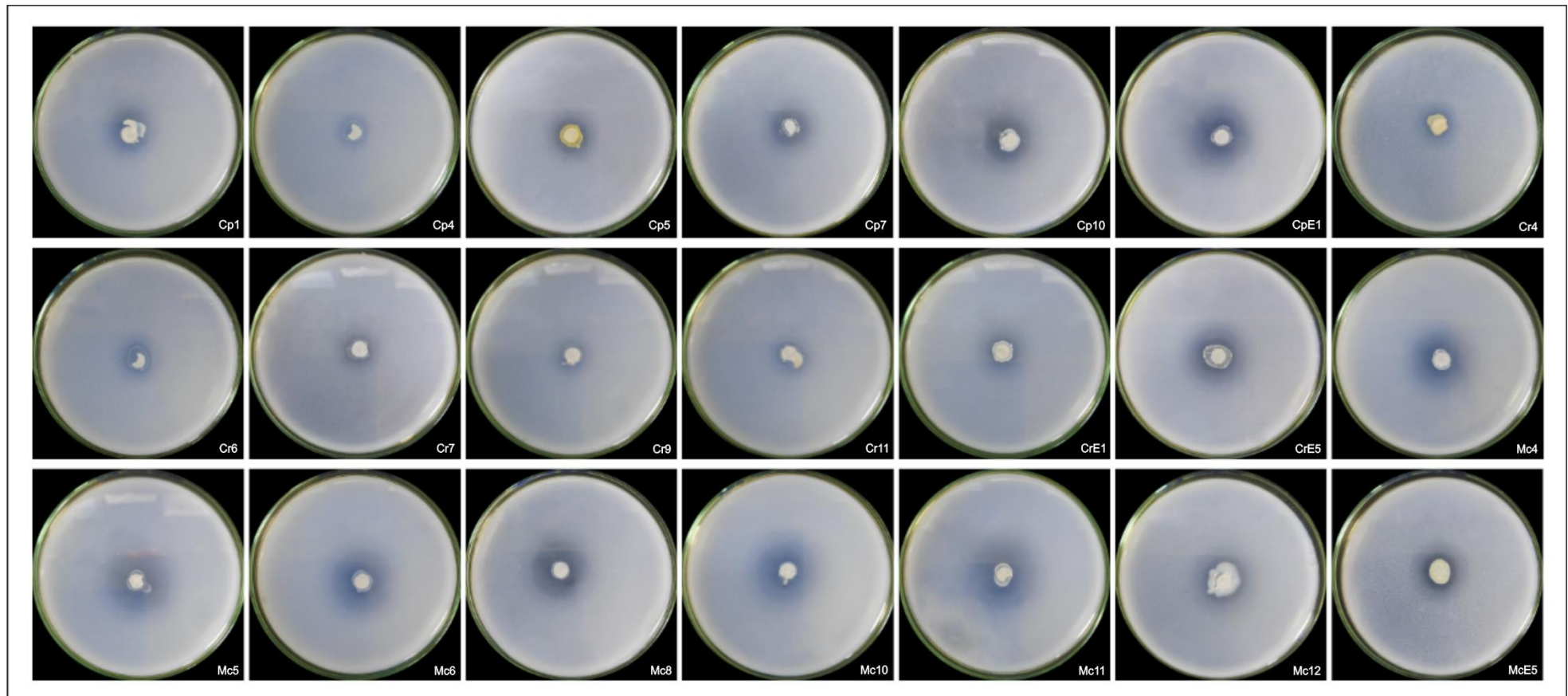
Figura 3: Isolados de rizobactérias que apresentaram formação de halo indicador de degradação de quitina *in vitro* no meio de quitina coloidal.



Os 27 isolados também foram plaqueados em meio contendo fósforo e potássio para que cepas com potencial de solubilização desses dois nutrientes fossem selecionadas. Passado período de incubação, para o meio contendo fósforo, 18 isolados (Figura 4) apresentaram a formação de halo, indicando a solubilização do nutriente presente no meio, já para o meio contendo potássio, apenas 3 isolados (Figura 5) formaram halo. Rizobactérias já são amplamente difundidas no meio agrícola como promotoras de crescimento de plantas, visto que sua utilização acarreta inúmeras vantagens, tais como: redução na utilização de fertilizantes químicos, melhores rendimentos na cultura, além de ser muito mais amigável ao meio ambiente (Romeiro, 2007; Freitas, 2007). Um mecanismo que chama bastante atenção nesses

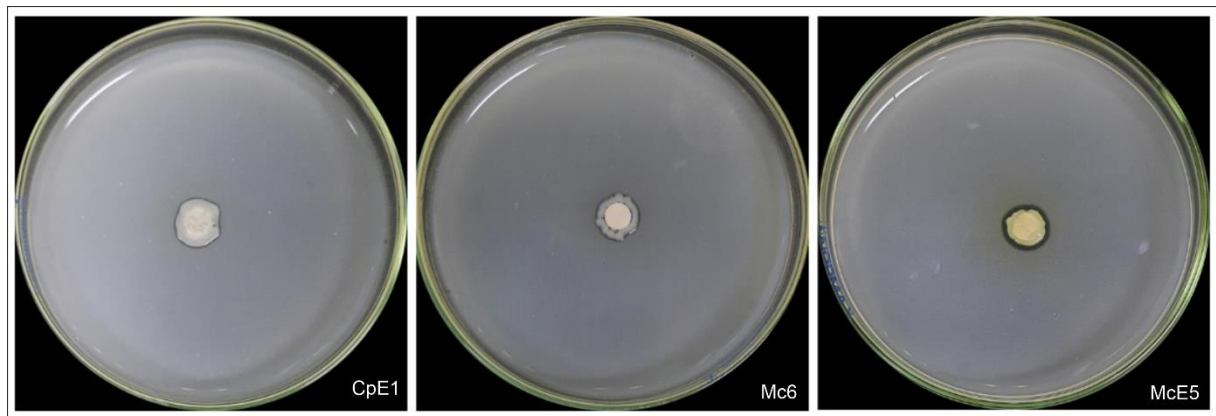
microrganismos é a capacidade de disponibilizar fósforo no solo quando ele está presente de forma não aproveitável para as plantas. Esse macronutriente que participa dos principais processos que envolvem o crescimento e produtividade das plantas, ainda é um elemento limitante nos solos do Brasil, exigindo de agricultores doses elevadas de adubação fosfatada para que obtenham resultados melhores de rendimento na produção da cultura. Dessa forma, as rizobactérias com capacidade de solubilizar fósforo se tornam uma alternativa para que se tenha uma melhora no aproveitamento da adubação fosfatada, o que também acarreta uma melhor produtividade da cultura, já que elas conseguem proporcionar formas disponíveis de fósforo para as plantas (Khan et al., 2007; Vieira Júnior et al., 2013; Velasco-Jiménez et al., 2020).

Figura 4: Isolados de rizobactérias que apresentaram formação de halo indicador de solubilização de fósforo *in vitro* no meio NBRIP (Nautiyal, 1999).



Uma outra característica interessante e atrativa em rizobactérias é a capacidade de solubilizar potássio. Esse macronutriente está envolvido em funções muito importantes para o desenvolvimento das plantas, como: fotossíntese, regulação da abertura e fechamento dos estômatos, síntese de proteínas, transporte de açúcares, entre outras. A identificação de isolados com capacidade de solubilizar esse elemento, torna a adubação muito mais eficiente e aumenta a produtividade (Parmar; Sindhu, 2013; Velasco-Jiménez et al., 2020). É importante ressaltar que dentro dos gêneros de rizobactérias já relatados como bons atuantes na solubilização desses dois macronutrientes está o gênero *Bacillus*, que é um excelente agente de controle biológico de fitonematoides (Vieira Júnior et al., 2013; Etesami et al., 2017), dessa forma, é possível pensar na possibilidade de um isolado que, além de promover crescimento nas plantas, também atue no controle de microrganismos fitopatogênicos do solo.

Figura 5: Isolados de rizobactérias que apresentaram formação de halo indicador de solubilização de potássio *in vitro* no meio Aleksandrov (Hu et al., 2006).

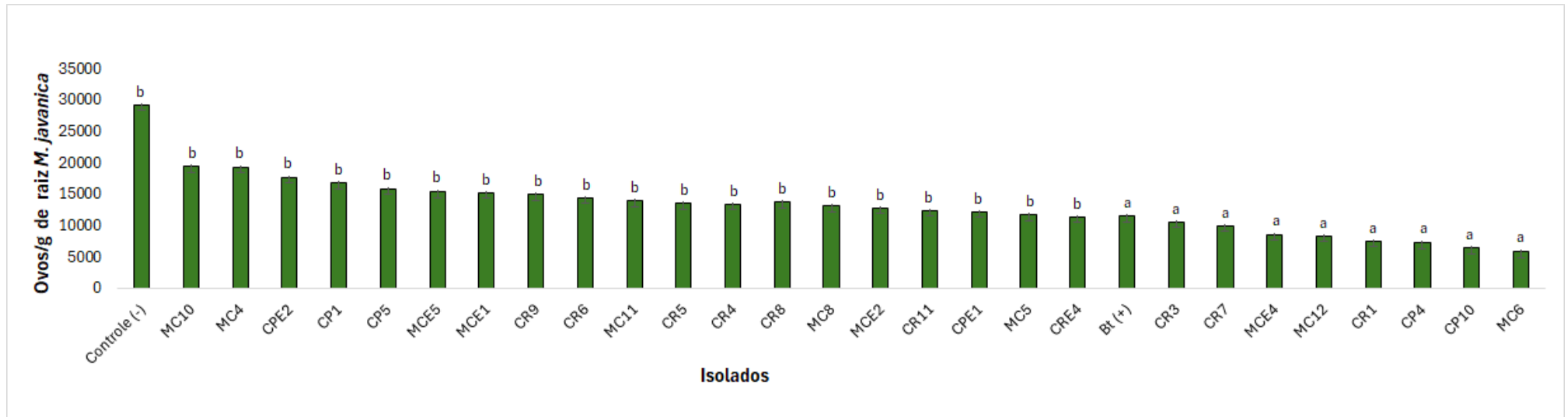


A etapa de seleção massal em casa de vegetação, para identificação de possíveis agentes de biocontrole para *Meloidogyne javanica*, identificou 8 dos 27 isolados com capacidade de reduzir de 63,9 a 80,4% a quantidade de ovos por grama de raiz em relação ao controle (Figura 6) e 16 dos 27 isolados com capacidade de reduzir 59,3 a 90,4% a quantidade galhas por grama de raiz em relação ao controle (Figura 7). Para confirmação dos resultados, 8 isolados foram novamente levados para a casa de vegetação. O critério para seleção dos isolados nessa etapa foi a junção das duas variáveis analisadas. Os isolados que tiveram tanto redução no número de ovos quanto no número de galhas, foram novamente avaliados. O isolado

identificado como Cp4 obteve o melhor resultado dentre os 8 tratamentos, com redução de 65,8% na quantidade de ovos por grama de raiz (Figura 8) e 70,6% no número de galhas por grama de raiz (Figura 9) em relação ao controle, confirmando seu desempenho nos dois ensaios.

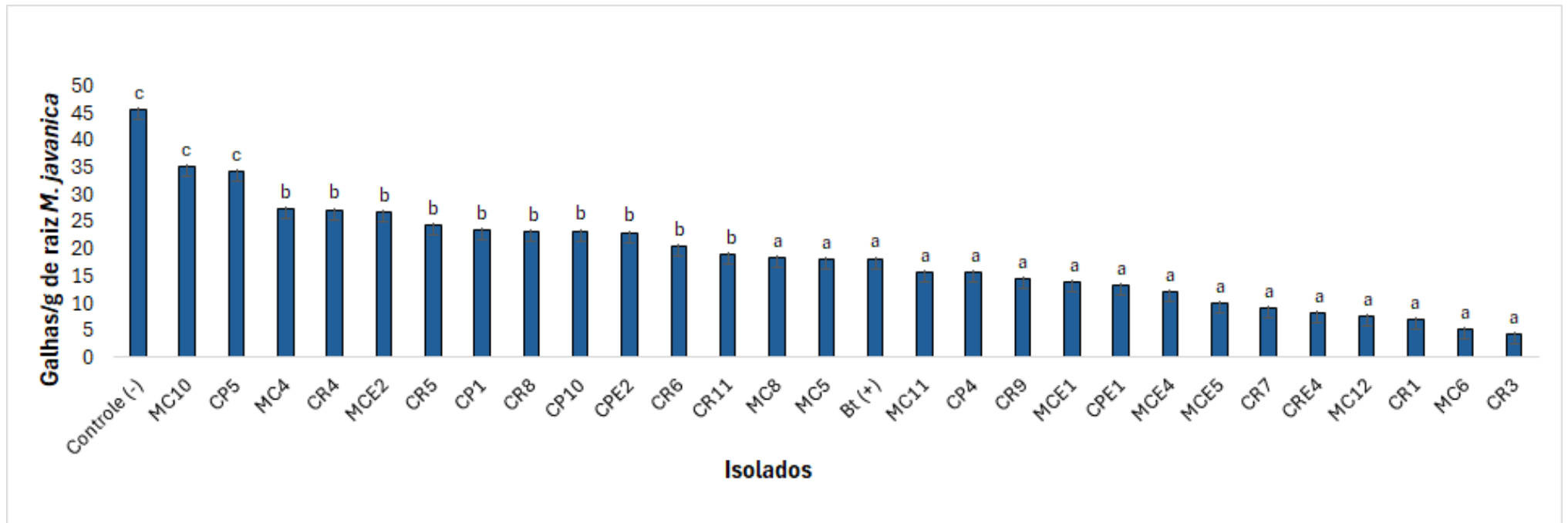
A redução no número de ovos e galhas observada nesses ensaios pode ser explicada por alguns mecanismos antagonistas utilizados por rizobactérias. O controle de nematoides usando esses microrganismos pode estar relacionado com diversos processos, como: produção de toxinas que podem acarretar a morte do nematoide e/ou afetar sua movimentação, inibição da eclosão de juvenis dos ovos ou ainda interferência no processo de interação planta-patógeno que pode afetar a penetração dos juvenis nas raízes (Siddiqui; Mahmood, 1999; Pires et al., 2022). Wille, et al. (2018) identificou uma redução de 49% no fator de reprodução de *Meloidogyne incognita* em mudas de figueira tratadas com rizobactérias. Resultados similares foram encontrados por Ribeiro et al. (2012), que verificou 23 isolados de rizobactérias causam mortalidade acima de 70% em populações de *Meloidogyne javanica*, dos quais 6 tiveram índices de mortalidade acima de 80%. Outros pesquisadores colaboram para que esses resultados sejam justificados. Siddiqui et al. (2001) e Siddiqui e Shaukat (2004), observaram por meio de teste *in vitro* que isolados de *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa* possuem efeito nematocida sobre juvenis de *M. javanica*. Siddiqui e Shaukat (2003), observaram que *Pseudomonas fluorescens* é capaz de produzir metabólitos que atuam como inibidores da eclosão de ovos. A redução no número de ovos pode estar associada com a possível produção desses metabólitos nos isolados selecionados. Um menor número de ovos eclodindo também implica em menos juvenis penetrando o sistema radicular da planta, formando menos sítios de alimentação, logo, reduzindo o número de galhas presentes nas raízes.

Figura 6: Médias da contagem do número de ovos por grama de raiz relativas aos tratamentos com rizobactérias para o controle de *Meloidogyne javanica* e aos controles utilizados em plantas de soja MONSOY 6410 IPRO na etapa de seleção massal dos isolados.



Valores identificados com a mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

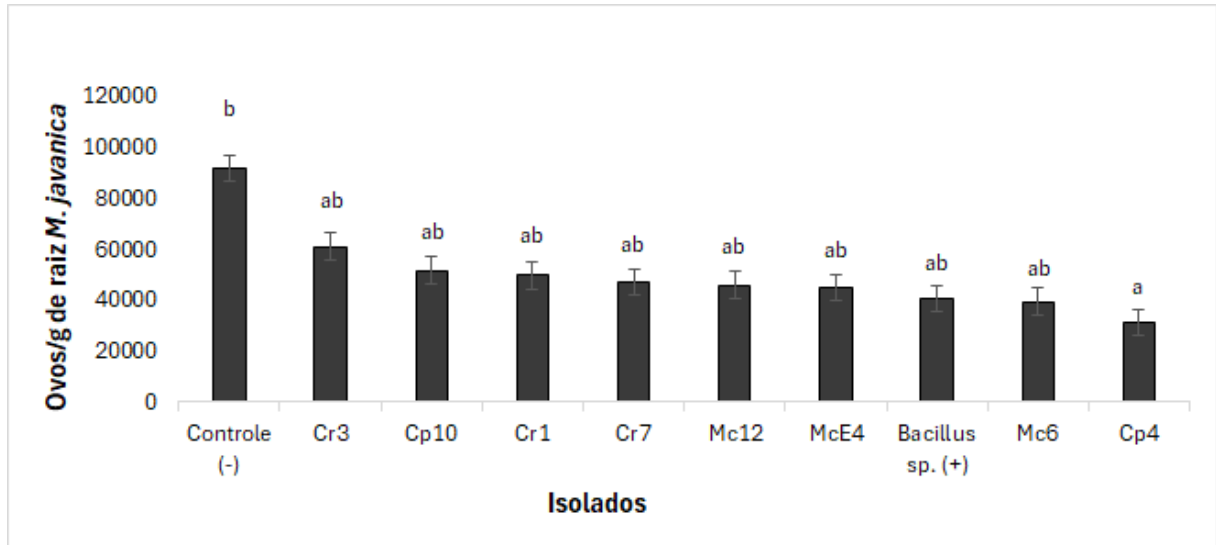
Figura 7: Médias da contagem do número de galhas por grama de raiz relativas aos tratamentos com rizobactérias para o controle de *Meloidogyne javanica* e aos controles utilizados em plantas de soja MONSOY 6410 IPRO na etapa de seleção massal dos isolados.



Valores identificados com a mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

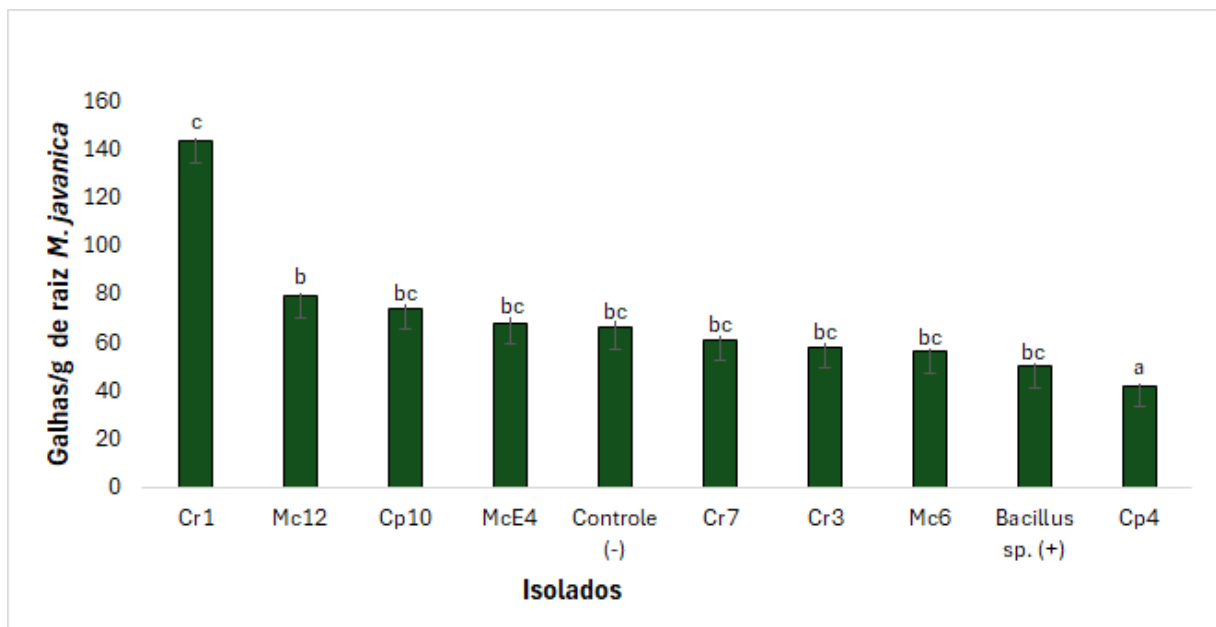
Um outro mecanismo interessante associado a rizobactérias é a indução de resistência. Algumas rizobactérias possuem a capacidade de aumentar o sistema de defesa das plantas, tal mecanismo é conhecido como Resistência Sistêmica Induzida, ou ISR (do inglês Induced Systemic Resistance). Ao colonizar o sistema radicular de uma planta, algumas moléculas que estão presentes na célula bacteriana, que também são sintetizadas por ela, vão atuar como eliciadores. Os eliciadores funcionarão como promotores de ativação de mecanismos de defesa, ocorrendo, dessa forma, a ISR. A resposta de resistência na planta vai depender do ácido jasmônico e etileno, visto que é a acumulação dessas moléculas que coordena a nível sistêmico a capacidade de defesa (Van Loon et al., 1998; Barbosa, 2009; Lucas et al., 2013; Sunar et al., 2015). Nos gráficos 3 e 4, é possível observar que, mesmo os isolados que tiveram desempenho inferior ao isolado Cp4, apresentaram uma redução considerável no número de ovos por grama de raiz em relação ao controle, variando entre 33,4 e 57%, como é o caso do isolado Cr1, que apresentou 143 galhas por grama de raiz, mas uma redução de 45,7% no número de ovos. Tal fato pode estar associado a possível indução de resistência desses isolados nas plantas de soja, onde o nematoide consegue penetrar, o que explica o valor elevado no número de galhas, mas não consegue se reproduzir, reduzindo o número de ovos presentes no sistema radicular. Tais resultados são similares aos encontrados por Fabry (2006), onde um isolado de *Rhizobium etli* apresentou redução de 35,3% no número de galhas e 38,8% no número de ovos de *Meloidogyne javanica* por sistema radicular de plantas de tomateiro. O mesmo autor também observou outros três isolados de rizobactérias atuando na indução de resistência e reduzindo significativamente o número de galhas e massas de ovos de *Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne incognita* aplicados em microbiolização de sementes. Hackenberg e Sikora (1994) também observaram que ao tratar tubérculos de batata com *Agrobacterium radiobacter* houve uma redução na penetração de juvenis de *Globodera pallida* e redução de eclosão de juvenis *in vitro*.

Figura 8: Redução do número de ovos de *Meloidogyne javanica* em raízes de soja por rizobactérias pré-selecionadas.



Valores identificados com a mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Post-Hoc a 5% de probabilidade.

Figura 9: Redução do número de galhas de *Meloidogyne javanica* em raízes de soja por rizobactérias pré-selecionadas.

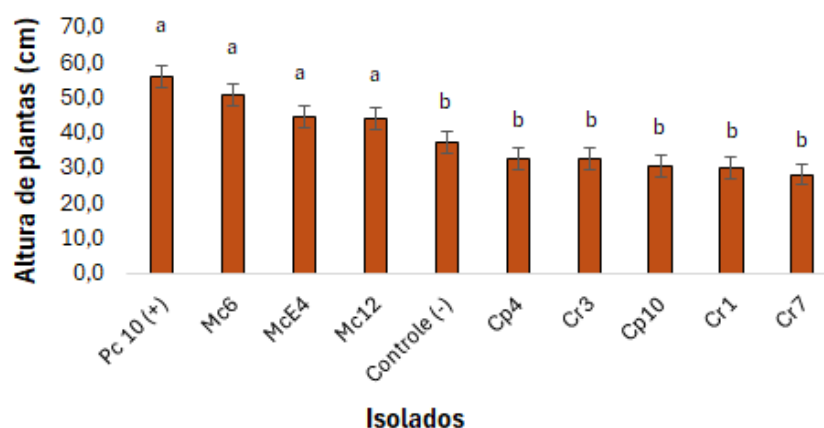


Valores identificados com a mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Post-Hoc a 5% de probabilidade.

Apesar de nem sempre conhecidos, o efeito de toxinas ou a produção de antibióticos são os mecanismos mais comumente associados ao biocontrole usando bactérias. É importante que se considere alguns critérios para que se diferencie ISR de outros mecanismos que reduzem as doenças de plantas (Fabry, 2006). É importante considerar que se a bactéria está em uma parte da planta e o nematoide em outra (método de raiz bipartida), se houver redução no número de ovos, galhas, juvenis, então fica claro o efeito indireto, sendo translocado pela planta de forma sistêmica. A ausência de efeitos tóxicos da bactéria como agente indutor sobre o nematoide, só pode ser percebida se eles estiverem separados (Steiner; Schönbeck, 1995). Seja por ISR ou qualquer outro mecanismo, o que se tem é a comprovação de que rizobactérias são bons agentes de biocontrole.

O interesse por rizobactérias que atuem como promotoras de crescimento de plantas tem aumentado nos últimos anos, visto que elas podem ser uma alternativa ao uso de fertilizantes químicos (Chagas Júnior et al., 2021). Os 8 isolados com melhor desempenho no controle de *M. javanica* também foram levados para ensaio em casa de vegetação para identificar possíveis agentes de promoção de crescimento em plantas de soja (Figura 10).

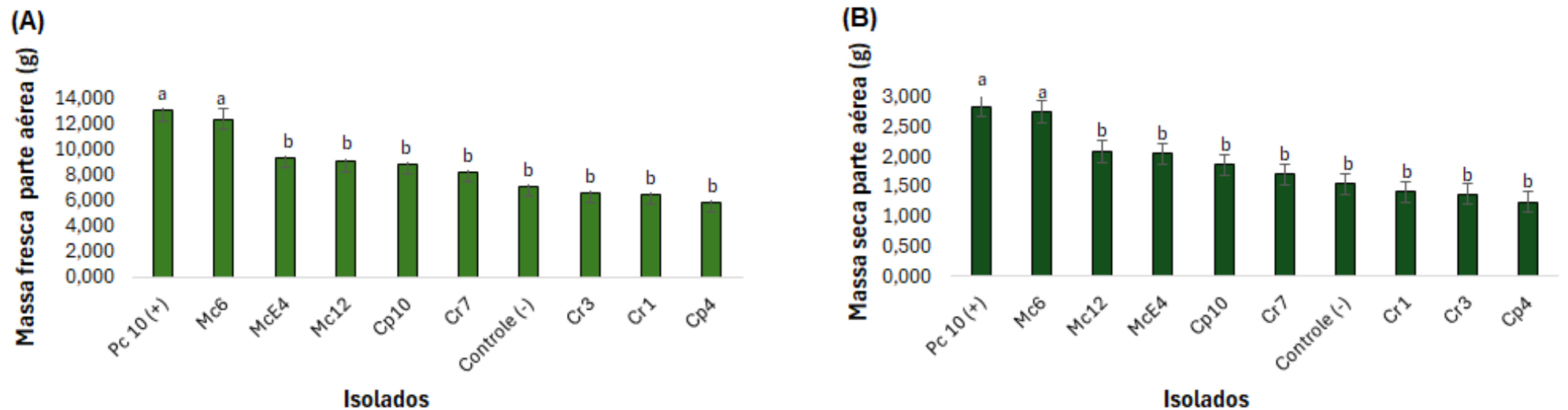
Figura 10: Médias da altura de parte aérea de plantas de soja tratadas com rizobactérias pré-selecionadas.



Valores identificados com a mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Contudo, em relação a massa de parte aérea, tanto fresca quanto seca, o isolado identificado com Mc6, mostrou um excelente desempenho em relação ao tratamento controle negativo e teve média muito próxima do isolado de *Pc 10*, que é um fungo já mundialmente conhecido pelo seu efeito de promoção de crescimento nas plantas (Figura 11).

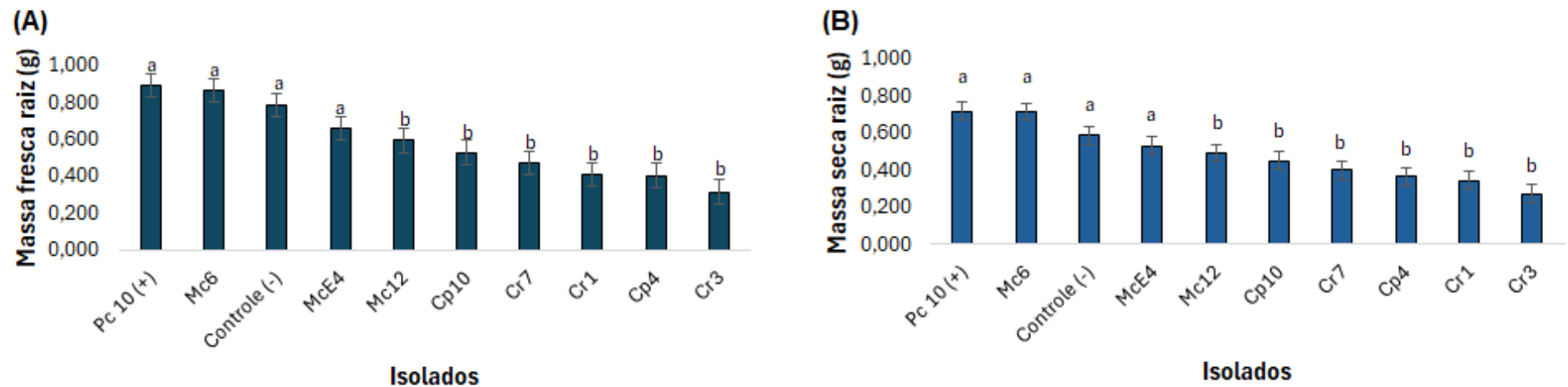
Figura 11: Médias da massa fresca (A) e da massa seca (B) da parte aérea relativas aos oito tratamentos com rizobactérias para promoção de crescimento



Valores identificados com a mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Em relação a massa de raiz, tanto fresca quando seca, um outro isolado aparece junto ao Mc6, o isolado identificado com McE4. Entretanto, para essa variável, eles se igualaram ao controle negativo, o que pode inferir que, talvez eles não sejam tão bons, já que suas médias se compararam com um tratamento que não possuía sementes microbiolizadas com nenhum isolado, mas que os outros isolados não possuem um efeito positivo no sistema radicular das plantas, já que suas médias foram inferiores ao tratamento controle negativo (Figura 12).

Figura 12: Médias da massa fresca (A) e da massa seca (B) de raiz relativas aos oito tratamentos com rizobactérias.



Valores identificados com a mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Chagas Júnior et al. (2021), ao tratar sementes de soja com *Bacillus* sp. em diferentes doses, notou médias superiores para a altura de planta, comprimento radicular, massa seca de parte aérea, massa seca radicular e massa seca total para todas as doses de inoculante que foram aplicadas, quando comparadas à testemunha. Fabry (2006), em contrapartida, não notou nenhum efeito significativo de *Rhizobium etli* no crescimento de plantas de tomateiro. Geralmente rizobactérias atuam como promotoras de crescimento, mas isso não é uma regra. Vonderwell et al. (2001) observaram um aumento de concentração de ácido indol-acético (IAA) após a inoculação de um isolado de *Bacillus subtilis* em plântulas de *Pinus taeda* L. Sikora (1998) que inoculou plantas de algodão, amendoim e beterraba açucareira com um isolado de *Bacillus subtilis* não observou alteração significativa de peso de raízes e parte aérea. Outro exemplo de rizobactéria é *Pseudomonas fluorescens* que atua na produção de auxina, mas não teve efeito significativo de promoção de crescimento quando inoculada (Boronin et al., 1993). O que talvez seja uma grande questão nesse aspecto é entender como a bactéria atua, qual a melhor forma de aplicação, qual a melhor dose, já que cada microrganismo possui sua particularidade e uma forma de se relacionar com seu hospedeiro.

A identificação dos isolados com maior efeito no controle de *M. javanica* e na promoção de crescimento foi feita através do uso do meio presuntivo HiCrome™ *Bacillus* Agar Base (HIMEDIA). O meio funciona a partir do princípio da metabolização, por reações enzimáticas específicas, sobre os substratos cromogênicos, resultando em um componente visível na forma de cores. Cada microrganismo reage com o meio de forma simples e específica de acordo com sua espécie, o que produz cores visualmente distintas (Figura 13; Tabela 2) (Alipi; Abrahamovich, 2019).

Figura 13: Identificação das espécies dos isolados de rizobactérias com o meio HiCrome™ *Bacillus* Agar Base (HIMEDIA). A coloração do meio indica a espécie de *Bacillus* isolada.

*Bacillus megaterium**Bacillus subtilis**Bacillus thuringiensis*

Tabela 2: Identificação de espécies de isolados de rizobactérias, por código da planta do qual foi isolado, com maior eficiência no controle de *M. javanica* e na promoção de crescimento da soja.

Isolado	Identificação
Cp4	<i>Bacillus megaterium</i>
Mc6	<i>Bacillus thuringiensis</i>
McE4	<i>Bacillus subtilis</i>

Esses isolados ainda serão submetidos aos métodos de análise tradicionais de biologia molecular, contudo, o meio se mostrou uma ferramenta útil para esse processo de pré-identificação presuntiva.

Alippi e Abrahamovich (2019) e Alippi (2019) usaram o meio HiCrome™ *Bacillus* Agar Base (HIMEDIA) para identificação de 197 isolados de *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacillus*, *Lysinibacillus* e *Rummeliibacillus*. Os 197 isolados de 24 espécies diferentes foram identificados usando métodos tradicionais de biologia molecular e depois plaqueados em meio contendo HiCrome para teste de confiabilidade do meio. As colônias coloriram de acordo com a espécie do isolado e o meio se mostrou uma alternativa rápida e confiável para identificação de *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacillus* e *Lysinibacillus*.

O isolado Cp4, proveniente de *Crotalaria paulinia*, promoveu uma redução no número de ovos de *M. javanica* de 74,5% na primeira seleção e de 65,8% no número de ovos por grama de raiz e de 70,6% de redução no número de galhas por grama de raiz, na segunda seleção em casa de vegetação, porém não promoveu o desenvolvimento vegetal, chegando a reduzir a massa de raiz da soja em relação ao

tratamento controle. Já o isolado Mc6, proveniente de *Mucuna pruriens*, resultou em uma redução do número de ovos por grama de raiz de 80% na primeira seleção (seleção massal) quando comparado ao tratamento testemunha e de 57% o número de ovos por grama de raiz de soja na segunda seleção. Entretanto, este isolado, além de controlar a reprodução do nematoide, promoveu um aumento de 22% de massa seca de raiz e de 79% de massa seca de parte aérea das plantas quando comparado ao tratamento testemunha, não diferindo-se do observado com o uso do Pc 10, controle positivo. McE4 também se mostrou capaz de controlar o nematoide e promover o crescimento da soja, porém em nível um pouco inferior ao da Mc6.

5 CONCLUSÃO

O isolado Mc6, proveniente da planta de mucuna cinza e identificado como *Bacillus thuringiensis*, é a rizobactéria com maior potencial para mais estudos e desenvolvimento de um produto de controle biológico para o mercado agrícola. Além de controlar *M. javanica*, o isolado também se mostrou eficiente na promoção de crescimento de soja.

REFERÊNCIAS

- Adam, M.; Westphal, A.; Hallmann, J.; Heuer, H.; Specific microbial attachment to root-knot nematodes in suppressive soil. **Appl. Environ. Microbiol.** 80, 2679-2686. 2014.
- Ahmad, G., Khan, A., Khan, A.A. *et al.* Biological control: a novel strategy for the control of the plant parasitic nematodes. **Antonie van Leeuwenhoek** 114, 885–912. 2021.
- Al-Ani, L.K.T.; Soares, F.E.D.F.; Sharma, A.; Santos-Villalobos, S.D.L.; Valdivia-Padilla, A.V.; Aguilar-Marcelino, L. Strategy of Nematophagous Fungi in Determining the Activity of Plant Parasitic Nematodes and Their Prospective Role in Sustainable Agriculture. **Front. Fungal Biol.**, 3, 1–9. 2022.
- Alippi, A. M. Data associated with the characterization and presumptive identification of *Bacillus* and related species isolated from honey samples by using HiCrome *Bacillus* agar. **Data in brief**, v. 25, n. 104206, 2019.
- Alippi, A. M.; Abrahamovich, E. HiCrome *Bacillus* agar for presumptive identification of *Bacillus* and related species isolated from honey samples. **International journal of food microbiology**, v. 305, n. 108245, 2019.
- Asmus, G. L. Danos causados à cultura da soja por nematóides do gênero *Meloidogyne*. In: Ferraz, L. C. B.; Asmus, G. L.; Carneiro, R. G.; Mazaferri, P.; Silva, J. F. V. Relações parasito-hopedeiro nas meloidoginoses da soja. **Embrapa Soja**, Londrina, PR, p. 39-56, 2001.
- Balbino, H. M. **Alterações no metabolismo da soja causadas pela interação de *Pochonia chlamydosporia* e *Bacillus thuringiensis* com nematoides fitoparasitas**. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2022.
- Barbosa, R. N. T. **Seleção de rizobactérias visando o controle biológico da murcha-de-esclerócio em tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.)**. 44 p. 2009. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Roraima, Boa Vista.
- Bettiol, W. Isolamento seletivo de *Bacillus* In: Melo, I.S.; Sanhueza, R.M.V. (Coord.) **Métodos de seleção de microrganismos antagônicos a fitopatógenos** Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, p.35-36.1995
- Blyuss K. B.; Fatehi F.; Tsygankova V. A.; Biliavska L. O.; Iutynska G. O.; Yemets A. I.; Blume Y. B. RNAi-based biocontrol of wheat nematodes using natural poly-component biostimulants. **Front Plant Sci**: 10. 2019.
- Boneti, J. I. S.; Ferraz, S. Modificação do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 6, n. 3, 1981.
- Bravo, A. Biodiversity of cry toxins produced by *Bacillus thuringiensis* and evolution of resistance to these toxins in different insect pests. **Toxicon**, v. 149, e98, 2018.

Bueno, A. F.; Panizzi, A. R.; Hunt, T. E.; Dourado, P. M.; Pitta, R. M.; Gonçalves, J. Challenges for adoption of integrated pest management (IPM): the soybean example. **Neotrop. Entomol.** 50, 5–20. 2021.

Carneiro, R.M.D.G.; Almeida, A. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematóides das galhas para identificação de espécies. **Nematologia Brasileira.** v. 25, p.35–44. 2001.

Carneiro, R. M. D. G.; Monteiro, T. S. A.; Eckstein, B.; Freitas L. G. Controle de nematoides fitoparasitas. In: FONTES, E. M. G.; VALADARES-INGLIS, M. C. Controle biológicos de pragas na agricultura, Brasília, **Embrapa.** Cap. 12, p. 371-411, 2020.

Chagas Junior, A. F.; Borba, E.; Martins, A. L. L.; Souza, M. C.; Gomes, F. L.; Oliveira, R. S.; Chagas, L. F. B. *Bacillus sp.* como promotor de crescimento em soja. Sociedade de Ciências Agrárias de Portugal. **Revista de Ciências Agrárias**, 44 (2-3): 170-179. 2021.

CONAB. Boletim da safra de grãos: 12º levantamento - safra 2021/22, set 2022. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/infoagro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos>. Acesso em: 28 nov. 2023.

Cook, R.J.; Baker, K.F. The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens. **American Phytopathological Society**: St. Paul, MN, USA, 1983; ISBN 978-0-89054-053-4.

Dias, W. P.; Garcia, A.; Silva, J. F. V.; Carneiro, G. E. S.. Nematoides em Soja: Identificação e Controle. Circular Técnica 76. Embrapa. Londrina, PR. 8 pag. 2010.

Dunlap, P. V.; Madigan, M. T.; Martinko, J. M. **Microbiologia de Brock.** 12 ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

EMBRAPA. Nematóide das galhas (*Meloidogyne* spp.). Londrina, PR: Embrapa Soja, 2021. Disponível em: <https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/cultivos/soja/pre-producao/biotecnologia/nematóide-de-galhas-meloidogyne-spp>. Acesso em: 28 nov. 2023.

El-Eslamboly A. A. S. A.; Abd El-Wanis M.M.; Amin A. W. Algal application as a biological control method of rootknot nematode *Meloidogyne incognita* on cucumber under protected culture conditions and its impact on yield and fruit quality. **Egypt J Biol Pest Control** 29:18. 2019.

Estados Unidos. United States Department of Agriculture. Economy Research Service. See the latest soybeans & oil crops outlook report. 2022. Disponível em: <https://www.ers.usda.gov/topics/crops/soybeans-and-oil-crops>. Acesso em: 28 nov. 2023.

Etesami, H., Emami, S.; Alikhani, H. A. Potassium solubilizing bacteria (KSB): Mechanisms, promotion of plant growth, and future prospects - A review. **J. Soil Sci. Plant Nutr.** 17: 897-911. 2017. doi: <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162017000400005>

- Ferraz, L. C. C. B. As meloidoginose da soja: passado, presente e futuro. *In: SILVA, J.F.V. (Org.). Relações parasito-hospedeiro nas meloidoginose da soja.* Londrina: Embrapa Soja/Sociedade Brasileira de Nematologia, p. 15-38, 2001.
- Ferraz, L. C. C. B.; Monteiro, A. R. Nematoides. *In: Amorim, L.; Rezende, J. A. M.; Bergamin Filho, A. Manual de Fitopatologia: volume 1 - Princípios e conceitos.* 5ed. Ouro Fino: **Agronômica Ceres.** cap. 7, p. 261-274, 2018.
- Freitas, S. S. Rizobactérias promotoras do crescimento de plantas. *In: Silveira, A. P. D.; Freitas, S. S. Microbiologia do solo e qualidade ambiental.* Campinas: Instituto Agronômico. p. 1-20. 2007.
- Ghahremani, Z.; Escudero, N.; Beltrán-Anadón, D.; Saus, E.; Cunqueiro, M.; Andilla, J.; Loza-Alvarez, P.; Gabaldón, T.; Sorribas, F.J. *Bacillus firmus* Strain I-1582, a Nematode Antagonist by Itself and Through the Plant. **Front. Plant Sci.** 11, 796. 2020.
- Gonzaga, V.; Moura, R. M. A agricultura brasileira e a ameaça dos nematoides quarentenários. **Anais Da Academia Pernambucana De Ciência Agronômica**, 16(2), 15–23. 2019.
- Guo, S.; Liu, M.; Peng, D.; Ji, S.; Wang, P.; Yu, Z.; Sun, M. New strategy for isolating novel nematocidal crystal protein genes from *Bacillus thuringiensis* strain YBT-1518. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 74, n. 22, p. 6997-7001, 2008.
- Gupta, R.; Saxena, R. K.; Chaturvedi, P.; Viridi, J. S. Chitinase production by *Streptomyces viridificans*: its potential in fungal cell wall lysis. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 78, n. 4, p. 378–383, abr. 1995.
- Gutierrez, M. E. M.; Capalbo, D. M. F.; Arruda, R. O.; Moraes, R. O. *Bacillus thuringiensis* *In: Souza, B.; Vázquez, L.; Marucci, R. (ed.). Natural enemies of insect pests in neotropical agroecosystems* Cham: Springer, 2019.
- Hackenberg, C.; Sikora, R.A. Influence of temperature and soil moisture on the biological control of the potato-cyst nematode *Globodera pallida* using the plant-health-promoting rhizobacteria *Agrobacterium radiobacter*. **Journal of Phytopathology**, 142:338-344, 1994.
- Hu, X.; Chen, J.; & Guo, J. Two phosphate- and potassium-solubilizing bacteria isolated from Tianmu Mountain, Zhejiang, China. **World journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 9, p. 983-990, 2006.
- Huang, M.; Bulut, A.; Shrestha, B.; Matera, C.; Grundler, F.M.W.; Schleker, A. S. S. *Bacillus firmus* I-1582 promotes plant growth and impairs infection and development of the cyst nematode *Heterodera schachtii* over two generations. **Sci. Rep.** 11, 1–15. 2021.
- Jiang, X.; Xiang, M.; Liu, X. Nematode-Trapping Fungi. **Microbiol. Spectr.** 5, 963–974. 2017.
- Kado, C.I.; Reskett, M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v.60 p.969-979, 1970.
- Karsen, G.; Moens, M. Root-knot nematodes. *In: Perry, R. N.; Moens, M. (Ed.). Plant nematology.* Harpenden, CABI. p. 5990., 2006.

- Keçici, A. I.; Bozbuga, R.; Ocal, A.; Yuksel, E. Ozer, G.; Yildiz, S.; Lahlali, R.; Slaats, B.; Dababat, A. A.; Imren, M. Diversity and identification of plant-parasitic nematodes in wheat-growing ecosystems. **Microorganisms**. 10 (8) 1534. 2022.
- Khan, M. S.; Zaidi, A.; Wani, P. A. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture - A review. **Agron. Sustain. Dev.** 27: 29-43. 2007. doi: <https://doi.org/10.1051/agro:2006011>
- Kloepper, J. W.; Rodriguez-Kábana, R.; McInroy, J. A.; COLLINS, D. J. Analyses of populations and physiological characterization of microorganisms. **Plant and Soil**, v. 136, p. 95-102, 1991.
- Kokalis-Burelle N.; Mahaffee W. F.; Rodriguez-Kabana R.; Kloepper J. W.; Bowen K. L. Effects of switchgrass (*Panicum virgatum*) rotations with peanut (*Arachis hypogaea* L.) on nematode populations and soil microflora. **J Nematol** 34(2):98. 2002.
- Lucas, J. A.; García-Villaraco, A.; Ramos, B.; García-Cristobal, J.; Algar, E.; Gutierrez-Mañero, J. Structural and functional study in the rhizosphere of *Oryza sativa* L. plants growing under biotic and abiotic stress. **J. Appl. Microbiol.** 115: 218-235. 2013. doi: <https://doi.org/10.1111/jam.12225>.
- Machado, A. C. Z.; Amaro, P. M.; Da Silva, S. A. Two novel potential pathogens for soybean. **PLoS One** 14, 1–13. 2019.
- Machado, A. C. Z.; Da Silva, S. A.; Ferraz, L. C. B.. **Métodos em nematologia agrícola**. Piracicaba: Sociedade Brasileira de Nematologia, 2019. 184 p.
- Manzanilla-López, R. H.; Costilla, M.; Doucet, M.; Franco, J.; Insera, R. N.; Lehman, P. S.; Cid del Prado-Vera, I.; Souza, R. M.; Evans, K. The genus *Nacobbus* Thorne and Allen, 1944 (Nematoda: Pratylenchidae): Systematics, distribution, biology and management. **Nematropica** 32, 149-227. 2002.
- Martínez-Medina, A.; Fernandez, I.; Lok, G. B.; Pozo, M. J.; Pieterse, C. M.; Van Wees, S. C. Shifting from priming of salicylic acid-to jasmonic acid-regulated defences by *Trichoderma* protects tomato against the root knot nematode *Meloidogyne incognita*. **New phytologist**, v. 213, n. 3, p. 1363-1377, 2017.
- Mesa-Valle, C. M.; Garrido-Cardenas, J. A.; Cebrian-Carmona, J.; Talavera, M.; Manzano-Agugliaro, F. Global Research on Plant Nematodes. **Agronomy**. 10, 1148. 2020.
- Miller, P. M.; Ahrens, J. F. Influence of growing marigolds, weeds, two cover crops and fumigation on subsequent populations of parasitic nematodes and plant growth. **Plant Disease Reporter**, v. 56(8), p. 642-646, 1971.
- Moslehi, S., Pourmehr, S., Shirzad, A., & Khakvar, R. Potential of some endophytic bacteria in biological control of root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 31, p. 1-11, 2021.
- Nautiyal, C. S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS microbiology Letters**, v. 170, n. 1, p. 265-270, 1999.

Niu, Q.; Huang, X.; Zhang, L.; Xu, J.; Yang, D.; Wei, K.; Niu, X.; An, Z.; Bennett, J.W.; Zou, C.; et al. A Trojan horse mechanism of bacterial pathogenesis against nematodes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 107, 16631–16636. 2010.

Norling, J. W. Nematode management in tomatoes, peppers and eggplant. ENY-032, Entomology and Nematology Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, pp. 1-15. 2012.

Oostendorp, M.; Sikora, R.A., Seed treatment with antagonistic rhizobacteria for the suppression of *Heterodera schachtii* early root infection of sugar beet Review Nematology, v.12(1), p.77-83, 1989.

Parmar, P.; Sindhu, S. S. Potassium solubilisation by Rhizosphere Bacteria: influence of nutritional and environmental conditions. **J. Microbiol. Res.** 3: 25-31. 2013. doi: <https://doi.org/10.5923/j.microbiology.20130301.04>

Peacock, F.C. The development of technique for studying the host/parasite relationship of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* under controlled conditions. **Nematologica**, v. 4, p. 43-55, 1959.

Pires, R. D. L.; Gonçalves, D. N.; Orue, J. P. M.; Kanashiro, W. E. S; Rodrigues, J. F.; Machado, B. B.; Gonçalves, W. N. Descritores locais para reconhecimento de doenças da soja. **Computação. Elétron. Agrícola**. 125, 48–55. 2016.

Pires, D.; Vicente, C.S.L.; Menéndez, E.; Faria, J.M.S.; Rusinque, L.; Camacho, M.J.; Inácio, M.L. The Fight Against Plant-Parasitic Nematodes: Current Status of Bacterial and Fungal Biocontrol Agents. **Pathogens**, 11, 1178. 2022. Doi: <https://doi.org/10.3390/pathogens11101178>

Rashad F. M.; Fathy H. M.; El-Zayat A. S.; Elghonaimy A.M. Isolation and characterization of multifunctional *Streptomyces* species with antimicrobial, nematicidal and phytohormone activities from marine environments in **Egypt**. **Microbiol Res** 175:34–47. 2015.

Ribeiro, R. C. F.; Campos, V. P.; Xavier, A. A.; Rocha, L.S.; Souza, H. B.; Aguiar, F.M.; Souza, R. M.; Mizobutsi, E. H.; Dias-Arieira, C. R. Control of *Meloidogyne javanica* and Panama disease with rhizobacteria. **Nematropica** 42:218-226. 2012.

Romeiro, R. S. **Métodos de bacteriologia de plantas**. Viçosa: UFV, 166p. (Caderno Didático). 1999b.

Romeiro, R. S. **Controle biológico de doenças de plantas: fundamentos**. Viçosa - MG: UFV, 2007. 296 p.

Savary, S.; Willocquet, L.; Pethybridge, S. J.; Esker, P.; McRoberts, N.; Nelson, A. The global burden of pathogens and pests on major food crops. **Nat. Ecol. Evol.** 3, 430–438. 2019.

Schaeffer, A. B.; Fulton, M. D. A simplified method of staining endospores. **Science**, v. 77, n. 1990, p. 194–194, 1933.

Siddiqui Z. A.; Mahmood I. Role of bacteria in the management of plant parasitic nematodes: a review. **Bioresource Technol** 69 (2):167–179. 1999.

- Siddiqui, S.; Ehetshamul-Haque, S.; Shaukat, S.S. Use of rhizobacteria in the control of root rot-root knot disease complex of mungbean. **Journal of Phytopathology** 149:3337. 2001.
- Siddiqui, I. A.; Shaukat, S. Suppression of root-knot disease by *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in tomato: importance of bacterial secondary metabolites 2,4-diacetylphloroglucinol. **Soil Biology and Biochemistry** 35:1616-1623. 2003.
- Siddiqui, I. A.; Shaukat, S. S. Systemic resistance in tomato induced by biocontrol bacteria against the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* is independent of salicylic acid production. **Journal of Phytopathology** 152:48-54. 2004.
- Siddiqui I. A.; Haas D., Heeb S. Extracellular protease of *Pseudomonas fluorescens* CHA0, a biocontrol factor with activity against the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. **Appl Environ Microbiol** 71:5646–5649. 2005.
- Sikora, R. A. Interrelationship between plant health promoting rhizobacteria, plant parasitic nematodes and soil microorganisms. **Med. Fac. Landbouwwer. Rijksuniv. Gent.** 53(2b): 867-878. 1998.
- Steiner, U.; Schönbeck, F. Induced disease in monocots. In: Hammerschmidt, R.; Kuc, J. (Eds.). Induced resistance to disease in plants. In: Development in Plant Pathology, vol. 4. **Kluwer Academic Pub.**, Dordrech. p. 86 – 110. 1995.
- Stirling, G. R. Biological control of plant-parasitic nematodes: an ecological perspective, a review of progress and opportunities for further research. In: Biological control of plant-parasitic nematodes: building coherence between microbial ecology and molecular mechanisms; Davies, K.G., Spiegel, Y., Eds.; Springer: Berlin, Germany, pp. 1–38. 2011.
- Subedi P.; Gattoni K.; Liu W.; Lawrence K. S.; Park S. W. Current utility of plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents towards plant-parasitic nematodes. **Plants** 9:1167. 2020.
- Sunar, K.; Dey, P.; Chakraborty, U.; Chakraborty, B. Biocontrol efficacy and plant growth promoting activity of *Bacillus altitudinis* isolated from Darjeeling hills. **J. Basic Microbiol.** 55: 91-104. 2015. doi: <https://doi.org/10.1002/jobm.201300227>.
- Tian, X. L.; Zhao, X. M.; Zhao, S. Y.; Zhao, J. L.; Mao, Z. C. The Biocontrol Functions of *Bacillus velezensis* Strain Bv-25 Against *Meloidogyne incognita*. **Front. Microbiol.** 13, 1–11. 2022.
- Tolosa, R. S.; Da Silva, I. J. S.; De Souza, T. M.; Da Cruz, J. C.; Da Silva, G. F. Seleção e identificação de bactérias quitinolíticas isoladas dos rios amazônicos: diversidade e perspectivas. In: Simpósio de Biotecnologia UFAM, 1, 2022, Manaus. **Anais eletrônicos** [...] Amazonas: Manaus, 2022. p. 1-4. Disponível em < <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1140988/1/Anais-SBUFAM-p19.pdf> > Acesso em: 13 ago. 2024.
- Topalovic, O.; Hussain, M.; Heuer, H. Plants and Associated Soil Microbiota Cooperatively Suppress Plant-Parasitic Nematodes. **Front. Microbiol.** 11, 313. 2020.

Torres-Acosta, J. F. J.; Mendoza-de-Gives, P.; Aguillar Caballero, A. J., Cuéllar-Ordaz, J. A. Anthelmintic resistance in sheep farms: update of the situation in the american continente. **Vet Parasitol.** 189, 89-96. 2012.

Tortora, G. J.; Funke, B. R.; Case, C. L. **Microbiologia.** 12 ed. Porto Alegre: Artmed. 2013.

Van Loon, L. C.; Bakker, P.; Pieterse, C. M. J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 36, p. 453-483, 1998.

Velasco-Jiménez, A.; Castellanos-Hernández, O, Acevedo-Hernández, G.; Aarland, R. C.; Rodríguez-Sahagún, A. Bacterias rizosféricas con beneficios potenciales en la agricultura. **Terra Latinoamericana** 38: 333-345. 2020. doi: <https://doi.org/10.28940/terra.v38i2.470>

Vieira Junior, J. R.; Fernandes, C. F.; Antunes Júnior, H.; Silva, M. S.; Silva, D. S. G.; Silva, U. O. **Rizobactérias como agentes de controle biológico e promotores de crescimento de plantas.** Embrapa Rondônia. Documentos, 155. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2013. 15 p. Disponível em < <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1018841> > Acesso em: 13 ago. 2024.

Vonderwell, J. D.; Enebak, S. A.; Samuelson, L. J. Influence of two growth-promoting rhizobacteria on loblolly pine root respiration and IAA activity. **Forest Science**, 47 (2): 197-202. 2001.

Wani A. H. Plant growth-promoting rhizobacteria as biocontrol agents of phytonematodes. **Biocontrol Agents Phytonematodes**, p 339. 2015.

Wei, J. Z.; Hale, K.; Carta, L.; Platzer, E.; Wong, C.; Fang, S. C.; Aroian, R.V. *Bacillus thuringiensis* crystal proteins that target nematodes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 100, 2760–2765. 2003.