

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO E CONTROLE DE
NEMATÓIDES DA SOJA POR ISOLADOS DE *Bacillus* spp.**

Daniel Dalvan do Nascimento

Engenheiro Agrônomo

2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO E CONTROLE DE
NEMATÓIDES DA SOJA POR ISOLADOS DE *Bacillus* spp.**

Daniel Dalvan do Nascimento

Orientador: Prof. Dr. Pedro Luiz Martins Soares

Coorientadora: Profa. Dra. Kátia Cristina Kupper

**Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp,
Câmpus de Jaboticabal, como parte das
exigências para a obtenção do título de
Mestre em Agronomia (Produção Vegetal)**

2019

N244p

Nascimento, Daniel Dalvan

Promoção de crescimento e controle de nematoides da soja por isolados de *Bacillus* spp. / Daniel Dalvan Nascimento. -- Jaboticabal, 2019

72 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Pedro Luiz Martins Soares

Coorientadora: Katia Cristina Kupper

1. Fitopatologia. 2. Doenças de plantas. 3. Controle biológico. 4. Nematoda. 5. Bactérias. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO E CONTROLE DE NEMATÓIDES DA SOJA POR ISOLADOS DE *Bacillus spp.*

AUTOR: DANIEL DALVAN DO NASCIMENTO

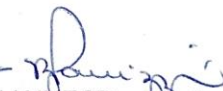
ORIENTADOR: PEDRO LUIZ MARTINS SOARES

COORIENTADORA: KÁTIA CRISTINA KUPPER

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em AGRONOMIA (PRODUÇÃO VEGETAL), pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. PEDRO LUIZ MARTINS SOARES
Departamento de Fitossanidade / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Profa. Dra. RITA DE CÁSSIA PANIZZI - 
Departamento de Fitossanidade / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Pesquisador Dr. BRUNO FLÁVIO FIGUEIREDO BARBOSA - 
Consultor Autônomo em Nematologia / Jaboticabal/SP

Jaboticabal, 27 de fevereiro de 2019

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Daniel Dalvan do Nascimento, natural de Vianópolis - GO, nascido em 16 de fevereiro de 1994, completou o curso Técnico em Agropecuária em 2011 e formou-se em Agronomia em 2016 pelo Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí. Durante esse período participou de quatro projetos de iniciação científica, todos direcionados ao estudo do controle de fitonematoides. Em março de 2017 ingressou no mestrado em Agronomia (Produção Vegetal) na Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal, em que deu continuidade aos estudos direcionados aos nematoides, dessa vez, com foco no controle biológico de nematoides na cultura de soja.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

(Arthur Schopenhauer)

Dedico aos meus pais,

Joval e Nicolina.

AGRADECIMENTOS

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

Agradeço primeiramente a Deus por todas as bênçãos concedidas em minha pequena jornada.

Aos meus pais, Joval Sebastião do Nascimento e Nicolina Maria de Souza Nascimento, por sempre apoiarem e incentivarem a busca pelos meus sonhos, serei eternamente grato.

Aos meus irmãos, Saulo e Marcos, sou grato pela força, exemplo e inspiração.

À minha companheira, amiga e namorada, Jéssica Caixeta, que mesmo distante fisicamente foi fundamental, compreendendo meus sonhos, estando ao meu lado e me amparando, sempre me fortalecendo para a concretização desse projeto.

Aos amigos, Vinícius, Aline, Edicleide, Renata, Mariane, Hugo, Marcelo e demais, que de alguma forma contribuíram para essa conquista, seja no trabalho ou nos momentos de lazer.

Ao professor Dr. Pedro Luiz Martins Soares, pelo ensino e orientação, pela amizade e a paciência a mim concedida.

À professora Dra. Katia Cristina Kupper, pela coorientação e colaboração no projeto.

À equipe do LabNema (Rivanildo, Valmir, Herick, André, Ilana, Suelen) e cia, pela amizade e apoio na realização das atividades.

E por fim, deixo meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas que imerecidamente não foram citadas aqui, mas que foram importantes para a realização e sucesso deste trabalho.

SUMÁRIO

Página

PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO E CONTROLE DE NEMATOIDES DA SOJA POR ISOLADOS DE <i>Bacillus</i> spp.....	iv
CAPÍTULO 1 - Considerações Gerais	1
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO.....	2
3. REVISÃO DE LITERATURA	3
3.1. A cultura da soja	3
3.2. Nematoides na cultura da soja.....	5
3.3. Nematoides de galha	6
3.4. Nematóide de cisto da soja	7
3.5. Manejo de Nematoides na soja.....	10
3.5.1. Controle biológico	12
4. REFERÊNCIAS.....	15
CAPÍTULO 2 – Espécies de <i>Bacillus</i> aplicados via tratamento de sementes e sulco de semeadura no controle de <i>Heterodera glycines</i> e promoção de crescimento de soja.....	22
1. INTRODUÇÃO	24
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
2.1. Delineamento experimental.....	26
2.2. Preparo do substrato e semeadura.....	28
2.3. Origem, preparo e inoculação de <i>Heterodera glycines</i>	28
2.4. Origem, preparo e inoculação dos isolados de <i>Bacillus</i> spp.	29
2.5. Avaliações.....	29
2.6. Análise dos dados.....	30
3. RESULTADOS	31
3.1. Emergência das plântulas de soja	31

3.2. Fator de reprodução.....	32
3.3. Análise de Componentes Principais para os tratamentos sem inoculação de <i>Heterodera glycines</i>	32
3.4. Análise de componentes principais para os tratamentos com inoculação de <i>Heterodera glycines</i>	34
4. DISCUSSÃO	37
4.1. Emergência das plântulas de soja	37
4.2. Multiplicação dos nematoides	37
4.3. Análise de Componentes Principais para os tratamentos sem inoculação de <i>Heterodera glycines</i>	38
4.4. Análise de Componentes Principais para os tratamentos com inoculação de <i>Heterodera glycines</i>	39
6. CONCLUSÃO.....	41
7. AGRADECIMENTO.....	41
8. REFERÊNCIAS.....	42
CAPÍTULO 3 – Controle de <i>Meloidogyne incognita</i> e <i>M. javanica</i> e promoção de crescimento de soja com isolados de <i>Bacillus</i> spp. via tratamento de sementes e sulco de semeadura	46
1. INTRODUÇÃO	48
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	49
2.1. Delineamento experimental.....	50
2.2. Preparo do substrato e semeadura.....	52
2.3. Origem, preparo e inoculação de <i>Meloidogyne</i> spp.	52
2.4. Origem, preparo e inoculação dos isolados de <i>Bacillus</i> spp.	53
2.5. Avaliações.....	53
2.6. Análise dos dados.....	54
3. RESULTADOS	55
3.1. Emergência das plântulas de soja	55

3.2. Fator de Reprodução	56
3.3. Análise de componentes principais para tratamentos inoculados com <i>Meloidogyne javanica</i>	56
3.4. Análise de componentes principais para tratamentos inoculados com <i>Meloidogyne incognita</i>	60
4. DISCUSSÃO	63
4.1. Emergência das plântulas de soja	63
4.2. Fator de reprodução.....	64
4.3. Análise de componentes principais para tratamentos inoculados com <i>Meloidogyne javanica</i>	64
4.4. Análise de componentes principais para tratamentos inoculados com <i>Meloidogyne incognita</i>	65
5. CONCLUSÕES	67
6. AGRADECIMENTOS	68
7. REFERÊNCIAS	68
CAPÍTULO 4 - Considerações finais.....	72

PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO E CONTROLE DE NEMATOIDES DA SOJA POR ISOLADOS DE *Bacillus* spp.

RESUMO – O Brasil, segundo maior produtor e também maior exportador de soja, tem grande parte da produção comprometida devido aos danos causados por nematoides. Para tanto, vários estudos têm relatado a eficiência de bactérias promotoras de crescimento no controle de nematoides nas mais diversas culturas. Diante do exposto, o objetivo desse trabalho foi selecionar isolados de três espécies de *Bacillus* eficientes no controle dos nematoides, *Heterodera glycines*, *Meloidogyne incognita* e *M. javanica*, e também, na promoção de crescimento da soja, sob diferentes formas de aplicação. Foram testados 19 isolados de *Bacillus subtilis*, *B. velezensis* (syn. *B. amyloliquefaciens*) e *B. methylotrophicus*, aplicados via Tratamento de sementes (TS) e Sulco de semeadura (SS), mais testemunhas (com e sem nematoides) e comerciais [*Bacillus subtilis* UFPEDA 764 (TS); *B. subtilis* UFPEDA 764 (SS); Abamectina (TS); Cadusafós (SS)]. Avaliou-se a emergência das plântulas, altura da planta, massa fresca e seca das partes aéreas, massa fresca das raízes, número de vagens, índice de clorofila, nematoide total, nematoide por grama de raízes e fator de reprodução. Devido a existência de uma estrutura de dependência contida nas variáveis originais, realizou-se análise exploratória dos dados, via Análise de Componentes Principais (ACP), as variáveis independentes foram testadas via análise de Modelo Linear Geral (GLM). Os resultados mostraram que para as três espécies de nematoides, o método de aplicação via SS favoreceu a emergência das plântulas de soja, sendo mais eficiente que o método de aplicação via TS, ambos os métodos foram melhores que a testemunha não tratada com *Bacillus* spp.. Entretanto, o método de aplicação via TS foi superior comparado ao SS para as variáveis, altura da planta, massa fresca e seca das partes aéreas, massa fresca das raízes, número de vagens e índice de clorofila, bem como foi melhor para a supressão dos nematoides. Dos isolados de *Bacillus* spp. testados, ACB-01, ACB-08, ACB-22 e ACB-AP3 foram eficientes para promoção de crescimento da soja e supressão de *H. glycines*, *M. incognita* e *M. javanica*.

Palavras chave: fitopatologia, doenças de plantas, controle biológico, nematoda, bactérias

GROWTH PROMOTION AND CONTROL OF SOYBEAN NEMATODES BY *Bacillus* spp. ISOLATES

ABSTRACT- Brazil, the second largest producer and also the largest exporter of soybeans, has a large part of the production compromised due to damage caused by nematodes. For this, several studies have reported the efficiency of growth-promoting bacteria in the control of nematodes in the most diverse cultures. In view of the above, the objective of this work was to select isolates of three species of *Bacillus* spp. efficient in the control of nematodes, *Heterodera glycines*, *Meloidogyne incognita* and *M. javanica* and also in the promotion of soybean growth under different forms of application. Nineteen isolates of *Bacillus subtilis*, *B. velezensis* (syn. *B. amyloliquefaciens*) and *B. methylotrophicus* were tested on application by seed treatment (ST) and sowing furrow (SF), plus controls (with and without nematodes) and commercial [*Bacillus subtilis* UFPEDA 764 (ST); *B. subtilis* UFPEDA 764 (SF); Abamectin (ST); Cadusafós (SF)]. Seed emergence, plant height, fresh and dry mass of aerial parts, fresh root mass, number of pods, total chlorophyll content, total nematode, nematode per gram of roots and reproductive factor were evaluated. Due to the existence of a dependency structure contained in the original variables, an exploratory analysis of the data was carried out, via Principal Component Analysis (PCA), the independent variables were tested through GLM analysis. The results showed that for the three nematode species, the SF application method favored the emergence of soybean seedlings, being more efficient than the ST application method, both methods were better than the control not treated with *Bacillus* spp. However, the ST application method was superior, compared to SF, for the variables, plant height, fresh and dry mass of the aerial parts, fresh root mass, number of pods and chlorophyll content, and was better for the suppression of nematodes. Among the isolates of *Bacillus* spp, tested, ACB-01, ACB-08, ACB-22 and ACB-AP3 were efficient for promoting soybean growth and suppression of *H. glycines*, *M. incognita* and *M. javanica*.

Keywords: fitopatología, plant disease, biological control, nematoda, bacteria

CAPÍTULO 1 - Considerações Gerais

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui uma área semeada total estimada em 35,2 milhões de hectares de soja, o que corresponde a cerca de 57% da área total de grãos cultivados no país. Essa área confere ao Brasil o posto de segundo maior produtor e maior exportador de soja do mundo (CONAB 2018). Entretanto, mesmo com o desenvolvimento tecnológico e o aumento crescente da produtividade no decorrer dos anos, as perdas por doenças, em especial as ocasionadas por nematoides, são cada vez maiores, devido principalmente ao monocultivo da soja (Ferraz e Brown 2016; CONAB 2018).

Os nematoides parasitos de plantas são considerados inimigos ocultos dos agricultores, pois são organismos microscópicos e habitantes do solo, o que dificulta o seu diagnóstico, conseqüentemente, o conhecimento das perdas causadas por eles. Grande parte do dano causado por nematoides não é relatado ou é frequentemente confundido com outras causas, tais como, ocorrência de pragas e outras doenças, estresse hídrico ou outros distúrbios fisiológicos, retardando o diagnóstico do problema e levando a perdas ainda maiores na produção (Abd-Elgawad e Askary 2018).

Perdas médias devido à ocorrência de nematoides são estimadas em 12,6% (equivalentes a US \$ 215,77 bilhões) apenas para as 20 principais culturas consideradas básicas na alimentação mundial, baseado nos números e preços da produção do período 2010–2013. Ademais, 14,45% (US \$ 142,47 bilhões) são relacionadas às demais plantas cultivadas, destinadas à alimentação ou à exportação (Askary e Martinelli 2015). Na soja esses danos podem ser ainda maiores, sendo os nematoides responsáveis por uma fração de 31% das perdas relacionadas a doenças na cultura (Allen et al., 2017). O nematoide de cisto da soja (*Heterodera glycines* Ichinohe) e os nematoides de galha [*Meloidogyne incognita* (Kofoid e White) Chitwood e *M. javanica* (Treub) Chitwood] são considerados os principais nematoides causadores de danos na cultura da soja no mundo (Kim et al., 2016).

Dentre os métodos disponíveis para o controle desses fitoparasitos, o controle biológico por meio do uso de microrganismos antagônicos tem se tornado uma técnica promissora. Diferentes trabalhos têm mostrado a eficiência de espécies de *Bacillus* no controle de nematoides, bem como na promoção de crescimento de plantas de diversas espécies, incluindo a soja. Características como, formação de endósporos, antagonismo, produção de enzimas líticas, produção de sideróforos, solubilização de fósforo e fixação de nutrientes, tornam essas bactérias excelentes candidatas para a formulação de bioprodutos (Castillo et al., 2013; Xiang et al., 2017a; Zhou et al., 2017; Luo et al., 2018).

Nos últimos anos, os contínuos problemas ambientais associados ao uso de nematicidas introduziram um senso de urgência na busca por métodos alternativos no manejo de nematoides. Vários métodos de controle já foram testados, entretanto, muitos deles são limitados, hora por condições do próprio método, hora pela compatibilidade e aceitação do produtor. O controle biológico surge como uma ferramenta para suprir essa demanda, e promete, à medida que se tem avanço nas tecnologias, tornar-se o principal método de controle, não só de nematoides, mas também de outros problemas fitossanitários.

2. OBJETIVO

O objetivo desse trabalho foi selecionar isolados de três espécies de *Bacillus* eficientes no controle dos nematoides *Heterodera glycines*, *Meloidogyne incognita* e *M. javanica*, e também, na promoção de crescimento da soja, sob aplicação via tratamento de sementes e sulco de semeadura.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. A cultura da soja

A soja é uma leguminosa pertencente à família Fabaceae, subfamília Papilionoideae, tribo Phaeseoleae, gênero *Glycine* e a espécie *G. max* (L.) Merrill. Essa espécie é originária da Manchúria, região localizada no nordeste da China, e foi oficialmente introduzida no Brasil no ano de 1914, na região de Santa Rosa – RS. Entretanto, há relatos de tentativas de adaptação da cultura no Brasil já em 1882, na Bahia. O início da expansão da cultura se deu em meados de 1970, graças ao programa de melhoramento iniciado anos antes pela Secretaria de Agricultura do Estado do Rio Grande do Sul e o Instituto de Pesquisa Agropecuária do Sul (IPEAS) (Mandarino, 2018).

A partir de 1970, o cultivo da soja se expandiu, do sul ao norte do Brasil, principalmente nas regiões com predominância do bioma cerrado, ocupando atualmente áreas que percorrem todo o país. O melhoramento genético é fator principal do sucesso e na expansão da soja no Brasil, possibilitando o desenvolvimento de cultivares mais produtivas, adaptadas e resistentes a diversas doenças (Silva et al., 2017).

Devido ao alto teor de proteína (40%) e de óleo (20%), e do custo de produção relativamente baixo, a soja tornou-se uma das principais fontes de suplementação proteica, em especial nos países em desenvolvimento (Silva et al., 2017). Ademais, o aumento da população mundial, a necessidade de ração animal e mais de 300 diferentes subprodutos da soja, contribuem para a forte demanda dessa cultura nos mercados mundiais (Cober et al., 2009). A soja é a principal fonte de farinha de proteína no mundo. Mais de 188 milhões de toneladas são produzidas, o equivalente a 67% do total fornecido mundialmente. Entre as fontes de óleos vegetais disponíveis, o óleo de soja responde por 56% da oferta total, o que corresponde a 281 milhões de toneladas (Bezerra et al., 2015).

A soja é a oleaginosa mais plantada no mundo. Só no Brasil foram produzidos na última safra (2017/2018) cerca de 119 milhões de toneladas de grãos, o que equivale a um aumento de 4,3% com relação à safra anterior (CONAB, 2018). Essa produção confere ao Brasil o posto de segundo maior produtor e maior exportador de soja do mundo. Segundo dados da CONAB (2018), na safra 2017/2018 foram 35,2 milhões de hectares de área semeada, 3,7% superior a safra 2016/2017 e 70% a mais que na safra 2006/2007. A soja corresponde a aproximadamente 52,3% do total da área de grãos semeada no Brasil (CONAB, 2018).

Os estados do MT, PR, RS, GO e MS são os maiores produtores, sendo o Centro-Oeste a região que mais concentra essa produção. Entretanto, essa produção está evoluindo também para outros estados, principalmente a região conhecida como Matopiba, equivalente aos estados do Maranhão, Tocantins, Piauí e Bahia (MAPA, 2015). A produção da região do Matopiba, contribui em 12,3% para a produção brasileira de soja, que corresponde a uma produção de 14,6 milhões de toneladas do grão (CONAB, 2018). Mesmo essa região enfrentando graves problemas de infraestrutura e logística, isso se deve ao fato de haver preços de terras atrativos, clima favorável, possibilidade de implantação de grandes áreas e relevo adequado, motivando o investimento nessas áreas (MAPA, 2015).

O avanço da soja para as novas fronteiras agrícolas, ainda enfrenta alguns desafios, tais como a disponibilidade de cultivares adaptadas e resistentes às principais doenças que acometem a cultura. O desenvolvimento de novas tecnologias e produtos fitossanitários que auxiliem no manejo fitossanitário dessa cultura também são necessários, de forma a buscar a proteção da planta para que atinja o máximo potencial produtivo das cultivares utilizadas. Dentre os principais fatores que limitam a produtividade da soja, destacam-se os abióticos, tais como variações no clima e fatores ligados a qualidade do solo, bem como os bióticos, ocasionados pela ação de pragas, plantas daninhas e doenças (Strange e Scott 2005; Lal 2009; Hartman et al., 2011).

A expansão das áreas produtivas, bem como os cultivos extensivos sobre as mesmas áreas no decorrer dos anos têm contribuído para o surgimento expressivo de novas doenças de considerável importância. Nas áreas produtivas onde a soja é

cultivada anualmente ou mesmo a cada dois anos, os propágulos produzidos por vários tipos de patógenos aumentaram a ocorrência, causando vários danos na produtividade e consequentes perdas econômicas. Microrganismos parasitas, como bactérias, fungos, vírus e nematoides, contribuem para os danos ocasionados à soja a cada ano (Hartman et al., 2011).

Os nematoides representam um importante grupo dentre os microrganismos causadores de perdas na cultura da soja. Em um estudo realizado por Allen et al., (2017) ao longo de 5 anos nos EUA, foi estimado 12,5% de perdas devido a doenças, sendo os nematoides, responsáveis por 31% do total de perdas ocasionadas por doenças que acometem a soja. No Brasil, esses danos podem ser ainda maiores, devido à grande pluralidade de doenças e às condições ambientais favoráveis para a infecção ao longo de todo ano e aos cultivos sucessivos nas mesmas áreas.

3.2. Nematoides na cultura da soja

Os fitonematoides são frequentes e causam grandes problemas às culturas. No mundo, mais de 100 espécies de nematoides de 50 diferentes gêneros já foram relatados na cultura da soja (Brida et al., 2016). No Brasil, os nematoides mais prejudiciais à cultura têm sido os formadores de galhas (*Meloidogyne javanica* e *M. incognita*), o de cisto (*Heterodera glycines*), o das lesões radiculares (*Pratylenchus brachyurus* Godfrey Filipjev e *Schuermans Stekhoven*), o reniforme (*Rotylenchulus reniformis* Linford & Oliveira) e o da soja louca II (*Aphelenchoides besseyi* Christie) (Dias et al., 2010; Meyer et al., 2017).

Dentre esses, o *H. glycines* é o mais agressivo, e também, o de mais difícil controle devido à formação do cisto, uma estrutura de resistência que envolve os ovos, formada a partir da morte da fêmea, podendo mantê-los viáveis por anos no solo (Dias et al., 2009). Por outro lado, *Meloidogyne* spp. apesar de não apresentar estrutura de resistência, também são agressivas e ao contrário de *H. glycines*, são altamente polípagas, o que dificulta o encontro de plantas não hospedeiras para utilização na rotação de culturas em áreas infestadas (Ferraz e Brown 2016).

3.3. Nematoides de galha

As espécies de *Meloidogyne* estão amplamente distribuídos no mundo e representam um dos principais problemas para as plantas cultivadas, incluindo a soja (Nunes et al., 2010). Particularmente, *M. javanica* e *M. incognita*, representam um sério problema em regiões produtoras de soja (Dias et al., 2010). Os dados sobre as perdas de rendimento específicas causadas por essas duas espécies são comuns e variam entre as diferentes áreas de cultivo ou regiões, chegando a 40% em solos arenosos de baixa fertilidade (Fontana et al., 2018). A elevada disseminação ao longo do território nacional, bem como a ampla gama de plantas hospedeiras suscetíveis, torna essas espécies as mais importantes no cenário nacional.

Os nematoides do gênero *Meloidogyne* formam estruturas típicas no sistema radicular da planta, denominadas galhas, que são protuberâncias nas raízes, que ocorrem devido à hipertrofia e hiperplasia de células (Pinheiro et al., 2010). O processo de infecção do nematoide nas raízes acontece enquanto está no estágio juvenil infectivo móvel (J2). Nessa fase, o nematoide migra para as raízes das plantas e penetra na ponta da raiz logo atrás da coifa, destruindo as células epidérmicas. Os juvenis movem-se intercelularmente ao longo do cilindro vascular em direção à área de alongamento da raiz. Neste momento, os juvenis selecionam um conjunto de células (futuras células gigantes) como um local de alimentação especializado, induzidas e mantidas por secreções liberadas pelo juvenil (Baldacci-Cresp et al., 2015).

Com o início da alimentação, a fêmea se torna sedentária, passando por três estádios, até se tornar adulta e obesa (Caillaud et al., 2008; Pinheiro et al., 2010). A maioria dos nematoides de galha se reproduz por partenogênese. Os machos migram da planta e não desempenham nenhum papel, exceto na reprodução. Após o desenvolvimento da fêmea em forma de pera, os ovos são liberados na superfície da raiz e envolvidos por uma substância gelatinosa e protetora (Caillaud et al., 2008). Essa massa pode conter entre 500 a 1.000 ovos (Pinheiro et al., 2010).

A embriogênese dentro do ovo é seguida pela primeira ecdise, levando ao segundo estágio juvenil (Caillaud et al., 2008). Os ovos são formas de sobrevivência

dessas espécies, podendo permanecer no solo, mesmo na ausência de plantas hospedeiras, por até 12 meses, devido à capacidade de entrar em um estado de dormência, principalmente em situações de solo seco e sem a presença de plantas hospedeiras (Ferraz e Brown 2016). Variando de acordo com as condições climáticas, o ciclo de vida desses nematoides pode durar entre 21 a 45 dias (Pinheiro et al., 2010).

O local de alimentação é formado por células gigantes e células vizinhas. A proliferação de células vizinhas, por sucessivas divisões celulares, resulta na formação da típica deformação das raízes, o sintoma de galha (Abad et al., 2003). As células gigantes desenvolvem-se a partir do tecido vascular, tornam-se hipertrofiadas por meio da divisão nuclear sucessiva sem divisão celular completa em vários ciclos de reduplicação (Caillaud et al., 2008). As células gigantes constituem a fonte exclusiva de nutrientes para o desenvolvimento para as espécies de *Meloidogyne* (Baldacci-Cresp et al., 2015).

O surgimento das galhas, devido à formação de células gigantes, pode atrapalhar a respiração, a fotossíntese, o fluxo de seivas, e o balanço hormonal, prejudicando assim o desenvolvimento da planta. O xilema e o floema ficam obstruídos em decorrência dessas modificações celulares, comprometendo o fluxo normal de fotoassimilados, água e nutrientes da planta (Siddiqui et al., 2014). Ademais, isso reflete na planta, ocasionando murcha durante os períodos mais quentes do dia, nanismo, queda prematura das folhas, sintomas de deficiência mineral, clorose, redução e deformação do sistema radicular, decréscimo da eficiência das raízes em absorver e translocar água e nutrientes, resultando em uma menor produção e comprometendo ou até inviabilizando o cultivo em situações de elevada infestação (Tihohod 2000). Na lavoura, esses sintomas se manifestam em reboleiras, devido à baixa mobilidade do nematoide no solo (Brida et al., 2016).

3.4. Nematóide de cisto da soja

Em um levantamento realizado ao longo de cinco anos em 28 estados produtores de soja nos EUA e numa província do Canadá, foi observado perdas

médias de 31% relacionadas a danos ocasionados por nematoides, e desses, 28% dos danos são causados exclusivamente pelo Nematóide de Cisto da Soja (NCS) (Allen et al., 2017). Esse fato torna essa espécie o principal problema fitossanitário da soja atualmente nos EUA. Ademais, muitos dos seus danos ainda passam despercebidos pelos produtores, visto que mais de 30% das perdas devido ao NCS podem ocorrer sem sintomas visíveis na superfície (Mueller et al., 2016).

No Brasil, o NCS foi detectado pela primeira vez na safra de 1991/1992 (Lordello et al., 1992). Não há dados atuais sobre o nível de danos ocasionados por NCS no Brasil, entretanto, em 2004 já estava presente em 150 municípios ao longo dos 10 principais estados brasileiros produtores de soja, equivalente a uma área de 2.500.000 ha (Dias et al., 2004). Já foram relatadas no Brasil 11 raças (1, 2, 3, 4, 4+, 5, 6, 9, 10, 14, 14+) de NCS, sendo distribuídas ao longo de todos os estados produtores de soja (Dias et al., 2009). Na região central do Brasil, as perdas por esse nematóide podem chegar a 100% em locais com alta incidência de NCS, especialmente em áreas com excesso de calagem (Dias et al., 2009). Entretanto, esses danos podem variar devido a outros fatores, tais como o grau de suscetibilidade das cultivares, condições de fertilidade e de manejo do solo, déficit hídrico, raça, dentre outros (Dias et al., 2007).

O ciclo de vida de *H. glycines* tem entre 21 a 30 dias de duração, variando de acordo com condições de temperatura e umidade (Jung e Wyss 1999). Os ovos, dentro dos cistos, podem permanecer latentes no solo por anos. Isso ocorre pois eles são resistentes às condições desfavoráveis, tais como temperatura, umidade, aeração do solo, ausência de planta hospedeira, podendo viabilizar os ovos/J2 por até 8 anos (Inagaki e Tsutsumi 1971). Os ovos contêm os juvenis do primeiro estágio (J1), sendo que a primeira ecdise sofrida entre J1 e J2 ocorre ainda dentro do ovo (Jenkins e Taylor 1967).

Os ovos do NCS eclodem como juvenis pré-infectivos em estágio J2, que migram em direção as raízes, atraídos pelos exsudados radiculares. Os nematoides J2, penetram na região anterior da coifa da raiz, tornando-se infecciosos e se alojam na região de alongamento das raízes. O J2 migra em seguida na direção do tecido vascular, seleciona uma célula adjacente ao tecido vascular e perfura-o com o estilete

para iniciar o desenvolvimento de um local de alimentação. Esse local é formado por meio da injeção de substâncias nas células pelo estilete do nematoide, causando alterações fisiológicas e anatômicas nas células (Gipson 1971; Jones e Dropkin 1975; Endo 1991; Klink et al., 2009).

Durante os estádios iniciais de infecção, as células adjacentes ao local de alimentação tornam-se metabolicamente hiperativas (Endo 1991). Então, as paredes das células adjacentes à célula selecionada começam a se dissolver. Estas células são incorporadas no local de alimentação por fusão para formar um sincício. A formação do sincício é caracterizada por vários eventos celulares que são visíveis ao nível anatômico. Essas alterações incluem hipertrofia dos núcleos e nucléolos, proliferação de organelas citoplasmáticas, redução ou dissolução do vacúolo e expansão da célula à medida que incorpora células adjacentes (Jones e Dropkin 1975; Endo 1991; Klink et al., 2009). Estas células altamente especializadas funcionam como um depósito de nutrientes, do qual o nematoide pode alimentar-se durante o resto do seu ciclo de vida (Klink et al., 2009).

Após o estabelecimento no sincício, os machos de NCS se alimentam por vários dias até o final do estágio J3, e então tornam-se sedentários. Subsequentemente, os machos descontinuam a alimentação e mudam para J4 vermiforme. Os machos J4 são retidos dentro de sua cutícula J3 e após aproximadamente 3 semanas, já em J5, saem da raiz (Jenkins e Taylor 1967). Em contrapartida, a fêmea torna-se sedentária após o estabelecimento de seu local de alimentação. As fêmeas expandem-se enquanto passam pelos estádios J3 e J4. Ao atingirem o estágio J5 se tornam obesas, com aparência limoniforme. No estágio J5, a região posterior da fêmea se torna exposta, fora da epiderme da raiz da soja, proporcionando aos machos, vermiformes maduros, que estão agora no solo, terem acesso à fêmea para a cópula. A fêmea cheia de ovos, após morrer, torna-se o cisto, envolvendo e protegendo os ovos (Klink et al., 2009).

A infecção de NCS pode ocasionar sintomas típicos, como nanismo e amarelecimentos das plantas, refletindo diretamente na queda da produtividade. Esses sintomas estão diretamente ligados ao comprometimento do crescimento das raízes e a redução da nodulação (Caixeta et al., 2016). Perda prematura das folhas,

redução e abortamento de flores e vagens, também são sintomas comuns em áreas infestadas, bem como a visualização das fêmeas nas raízes, que apresentam uma coloração que varia de branco leitoso, passando por amarela a marrom. Muitas vezes esses sintomas se manifestam em reboleiras, porém nem sempre elas são visíveis, o que dificulta a identificação do problema na área. Esses sintomas são agravados quando associados a déficit hídrico e condições deficientes de fertilidade e manejo inadequado do solo (Dias et al., 2009).

3.5. Manejo de Nematoides na soja

Devido às características específicas dos nematoides, tais como suas estruturas de resistência e o fato de ser um habitante do solo, impossibilitam métodos de controle eficientes quanto à sua erradicação. Entretanto, a utilização de medidas adequadas, bem como a integralização de diferentes formas de controle, possibilitam ao agricultor a redução da população ou até mesmo o controle do nematoide a níveis populacionais que permitam a convivência, fitoparasito e hospedeiro, sem que haja perda na produtividade (Ferraz et al., 2010). Portanto, o controle preventivo é o método mais importante e mais eficiente a ser utilizado pelo agricultor, uma vez constatada a presença de nematoides, bem como o impacto, o produtor terá que conviver com o fitoparasito na área.

O controle preventivo, visa impedir a disseminação dos nematoides de um local infestado para outro isento do patógeno (Ferraz et al., 2010). Algumas simples práticas, como, iniciar o plantio sempre em áreas onde não ocorram o patógeno, deixando os talhões contaminados por último e, lavar os pneus e implementos, retirando a terra aderida com jato de pressão, possuem grande eficiência na prevenção de nematoides (Soares et al., 2018). Para áreas de soja já infestadas, tem-se outros métodos de controle disponíveis, sendo os mais utilizados: alqueive, uso de cultivares resistentes, rotação com culturas não hospedeiras e/ou resistentes, controle químico e biológico.

A consolidação do uso de plantio direto nos atuais sistemas de produção de soja, tem reduzido cada vez mais a utilização do alqueive, devido aos malefícios desse método às características biológicas, químicas e estruturais do solo (Inomoto 2016). Entretanto, esse método ainda é recomendado em situações onde outros métodos de controle não têm alcançado eficiência, principalmente em áreas com altíssimas populações de nematoides (Soares et al., 2018).

A utilização de cultivares resistentes é o método mais indicado para o controle de NCS (Mitchum 2016; Tylka e Mullaney 2018), bem como para outras espécies, quando há disponibilidade de materiais resistentes. Entretanto, o uso demasiado de cultivares com fontes comuns de resistência causam grandes mudanças nas populações de nematoides, selecionando espécimes ou raças, que agora estão adaptadas para se reproduzir em cultivares resistentes (Mitchum 2016). Um aumento no número de populações de NCS adaptadas às cultivares com resistência vem sendo relatado há mais de 10 anos (Mitchum et al., 2007; Niblack et al., 2008).

No Brasil, são poucas as cultivares de soja resistentes ao NCS e, mesmos as cultivares disponíveis, são em sua maioria resistentes apenas as raças 1 e 3, ademais, são poucos os materiais adaptados para as diferentes regiões do país (Dias et al., 2010). Para os nematoides de galha isso não é diferente, além de serem poucas, as cultivares resistentes disponíveis podem apresentar níveis variados de hospedabilidade, dependendo da raça e população de *Meloidogyne* sp., e condições do solo (Mendes e Rodriguez 2000). É importante destacar que cultivares resistentes normalmente apresentam menores tetos produtivos que cultivares suscetíveis, o que desestimula ainda mais sua utilização pelo agricultor.

O controle cultural é outro método considerado de grande importância no manejo dos nematoides da cultura da soja. Esse método baseia-se no cultivo de plantas não hospedeiras ou que possuam baixo fator de reprodução, como forma de supressão das populações dos nematoides, podendo ser por rotação ou sucessão de culturas (Ferraz et al., 2010).

A rotação de culturas pode ser definida como a alternância regular do cultivo de diferentes espécies vegetais, numa sequência temporal em determinada área agrícola (Prestes et al., 1999). Já a sucessão de culturas é definida como o

ordenamento de duas culturas na mesma área agrícola por tempo indeterminado, cada qual cultivada em uma estação do ano (Franchini et al., 2011). Os dois métodos objetivam manter ou reestabelecer o equilíbrio biológico do solo e a ciclagem de nutrientes, além disso, ambos podem ser eficientes no manejo de nematoides, desde que sejam utilizadas plantas não hospedeiras e/ou resistentes, uma vez que a maioria das espécies cultivadas, podem multiplicar os nematoides, principalmente os de galha, além de outras espécies (Dias et al., 2010).

O controle de nematoides por meio da utilização de moléculas químicas é um método que já foi bastante empregado na agricultura mundial (Dong e Zhang 2006). Embora seja eficiente, é altamente tóxico ao ambiente e ao ser humano, além de causar desequilíbrio à biota do solo, devido à baixa seletividade (Oka et al., 2000). Por esse fato, somado à pressão mundial por utilização de tecnologias mais limpas e menos poluentes, muitos produtos químicos considerados eficientes foram retirados do mercado e os restantes serão cada vez menos utilizados (Dong e Zhang 2006). Ademais, os nematicidas químicos disponíveis são onerosos e apresentam baixo período residual no solo, podendo causar um aumento populacional do nematoide após o término do período de ação do produto.

Nesse contexto, a utilização de produtos biológicos entra como uma alternativa interessante, visto que ao contrário dos produtos químicos, apresenta maior persistência no solo, não é tóxico e contribui para um solo mais supressivo. Outro benefício é apresentar um custo relativamente baixo, além de ter, em alguns casos, eficiência superior aos produtos químicos disponíveis no mercado, ainda mais se combinado com boas práticas de manejo do solo (Soares et al., 2017).

3.5.1. Controle biológico

O controle biológico de nematoides pode ser definido como a redução da densidade populacional dos nematoides por meio da ação de organismos vivos, exceto plantas resistentes, que ocorrem naturalmente ou através da manipulação do ambiente ou da introdução de antagonistas (Stirling 1991). A utilização de organismos

vivos como bioprodutos vem ganhando cada vez mais destaque na agricultura mundial. Os bioprodutos representam uma gama de substâncias de base biológica que atuam no controle de pragas e doenças, por meio de diferentes mecanismos de ação (Ruiu 2018).

Nas últimas décadas, vários projetos de pesquisa foram conduzidos em meios acadêmicos e industriais, que levaram à descoberta, desenvolvimento e lançamento de vários bioprodutos microbianos no mercado mundial (Marrone 2014). O mercado de bioprodutos tem crescido significativamente nos últimos anos, como resultado de uma maior consciência do seu potencial e uma crescente atenção aos riscos ambientais e à saúde associados aos produtos químicos convencionais (Lacey et al., 2001; Glare et al., 2012). Esta tendência está alinhada com a implementação de leis que promovem o registro e uso de produtos ambientalmente corretos em diferentes regiões do mundo (Ruiu, 2018).

Como os bionematicidas são compostos por organismos vivos, sua formulação se torna bastante complexa. Portanto, são necessários estudos detalhados de vários processos, desde a formulação inicial, meio de cultura mais adequado, testes de compatibilidade, compreensão de diferentes progressos em testes em laboratório e a campo, conservação e tempo de prateleira, ação sobre organismos não alvo, busca por uma eficiência superior aos produtos que já são comercializados e metodologia de aplicação (Abd-Elgawad e Askary 2018).

O método de aplicação no campo e as características da formulação desempenham um papel fundamental no desempenho de qualquer bioprotudo. Com o objetivo de melhorar a eficácia, diferentes tecnologias foram desenvolvidas pela indústria, maximizando os efeitos sobre o alvo e melhorando as características da aplicação do produto (por exemplo, adesão, dispersão, distribuição) (Brar et al., 2006). A eficiência no processo de colonização e distribuição dos microrganismos na rizosfera está diretamente ligada à forma de inoculação das mesmas, refletindo na eficiência do controle dos nematoides (Araújo et al., 2002).

Nos grupos mais estudados, promissores e utilizados, entre os organismos antagônicos a nematoides, estão os fungos e bactérias (Askary e Martinelli 2015). Vários desses organismos já foram relatados como eficientes no controle de

nematoide (Askary e Martinelli 2015), entretanto poucos deram origem a bioprodutos no Brasil. Até o momento, somente os fungos *Pochonia chlamydosporia*, *Purpureocillium lilacinum* e *Trichoderma* sp., e as bactérias *Bacillus* spp. e *Pasteuria nishizawae*, detêm registro para controle de alguma espécie de nematoide em culturas específicas (MAPA, 2019). Dentre esses organismos, as bactérias do gênero *Bacillus* merecem destaque por apresentar características distintas, tanto no ponto de vista antagônico, como na promoção de crescimento vegetal, além de apresentarem pouca complexidade no processo de multiplicação em larga escala (Xiang et al., 2018; Mhatre et al., 2019).

Outro fator importante a ser considerado sobre *Bacillus* spp. é a capacidade dessas bactérias formarem endósporos. Endósporos são estruturas de resistência, formadas a partir da célula bacteriana, que conferem proteção das bactérias às condições extremas, tais como, temperatura elevada, dessecação e contato com moléculas químicas. A formação de endósporos permite a sobrevivência da bactéria por vários meses, até que encontre condições ambientais favoráveis (Lanna-Filho et al., 2010; Abd-Elgawad e Askary 2018). Pensando na formulação de bioprodutos, essa é uma característica de grande relevância, já que esses produtos são normalmente utilizados em conjunto com outros defensivos químicos, bem como expostos ao sol durante longos períodos até sua aplicação.

As espécies de *Bacillus* são um importante grupo dentre as rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP). As RPCP estão entre os vários grupos de microrganismos associados a vegetais que podem induzir atividades de defesa nas plantas. Isolados específicos de *Bacillus* spp. podem provocar indução de resistência sistêmica, resultando na redução da gravidade da doença por uma ampla gama de patógenos (Kloepper et al., 2004). Além disso, outros mecanismos como a produção de fitormônios, solubilização de fosfato, fixação de nitrogênio, produção de sideróforos e amônia são frequentemente associados a essas bactérias e estão diretamente ligados à capacidade dessas bactérias de promoverem o crescimento de plantas (Xiang et al., 2018).

A utilização de *Bacillus* spp. para controle de doenças causadas por nematoides e promoção de crescimento de plantas já foi bastante estudada (Askary e

Martinelli, 2015; Xiang, Lawrence e Donald, 2018). Diferentes modos de ação de *Bacillus* spp. já foram relacionados à supressão de nematoides, podendo se destacar o antagonismo por meio da produção de enzimas líticas, indução de resistência sistêmica, antibiose e redução de estresse oxidativo (Kloepper et al., 2004; Liu et al., 2016; Xiang et al., 2017b, 2018; Zhou et al., 2017).

O avanço nos estudos da utilização de espécies de *Bacillus* é necessário, visto o grande potencial dessas bactérias, tanto no controle de nematoides parasitos de plantas, quanto na promoção de crescimento vegetal. Ademais, a facilidade de produção em larga escala, bem como as características de resistência, faz de *Bacillus* spp. organismos potenciais para desenvolvimento de bioprodutos. Mas para isso, são necessários estudos preliminares, visando a seleção de isolados com características específicas, bem como estudos voltados às formas de aplicação do formulado na cultura em questão.

4. REFERÊNCIAS

Abad P, Favery B, Rosso M-N, Castagnone-Sereno P (2003) Root-knot nematode parasitism and host response: molecular basis of a sophisticated interaction. **Molecular Plant Pathology** 4:217–224. doi: 10.1046/j.1364-3703.2003.00170.x

Abd-Elgawad MMM, Askary TH (2018) Fungal and bacterial nematicides in integrated nematode management strategies. **Egyptian Journal of Biological Pest Control** 28:74. doi: 10.1186/s41938-018-0080-x

Allen TW, Bradley CA, Sisson AJ, Byamukama E, Chilvers MI, Coker CM, Collins AA, Damicone JP, Dorrance AE, Dufault NS, Esker PD, Faske TR, Giesler LJ, Grybauskas AP, Hershman DE, Hollier CA, Isakeit T, Jardine DJ, Kelly HM, Kemerait RC, Kleczewski NM, Koening SR, Kurlle JE, Malvick DK, Markell SG, Mehl HL, Mueller DS, Mueller JD, Mulrooney RP, Nelson BD, Newman MA, Osborne L, Overstreet C, Padgett GB, Phipps PM, Price PP, Sikora EJ, Smith DL, Spurlock TN, Tande CA, Tenuta AU, Wise KA, Wrather, JA (2017) Soybean Yield Loss Estimates Due to Diseases in the United States and Ontario, Canada, from 2010 to 2014. **Plant Health Progress** 18:19–27. doi: 10.1094/PHP-RS-16-0066

Araújo FF de, Silva JFV, Araújo ASF de (2002) Influência de *Bacillus subtilis* na Eclosão, Orientação e Infecção de *Heterodera glycines* em Soja. **Ciência Rural** 32:197–203. doi: 10.1590/S0103-84782002000200003

Askary TH, Martinelli PP (2015) Biocontrol Agents of Phytonematodes. London: CAB International. 469p.

Baldacci-Cresp F, Maucourt M, Deborde C, et al (2015) Maturation of nematode-induced galls in *Medicago truncatula* is related to water status and primary metabolism modifications. **Plant Science** 232:77–85. doi: 10.1016/J.PLANTSCI.2014.12.019

Bezerra AR, Sedyama T, Borém A, Soares MM (2015) Importância econômica. In: Sedyama T, Silva F, Borém A (eds) **Soja: do plantio à colheita**. Viçosa: UFV, pp 9–26.

Brar SK, Verma M, Tyagi RD, Valéro JR (2006) Recent advances in downstream processing and formulations of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. **Process Biochemistry** 41:323–342. doi: 10.1016/J.PROCBIO.2005.07.015

Brida AL de, Gabia AA, Pezzoni Filho JC, et al (2016) Variabilidade espacial de *Meloidogyne javanica* em soja. **Summa Phytopathologica** 42:175–179. doi: 10.1590/0100-5405/2140

Caillaud M-C, Dubreuil G, Quentin M, et al (2008) Root-knot nematodes manipulate plant cell functions during a compatible interaction. **Journal of Plant Physiology** 165:104–113. doi: 10.1016/j.jplph.2007.05.007

Caixeta L de B, Furlanetto C, Cares JE (2016) Gênero *Heterodera*. In: OLIVEIRA CMG, SANTOS MA, CASTRO LHS (eds) **Diagnose de Fitonematoides**. Campinas: Millennium Editora, p. 149–162.

Castillo J, Lawrence K, Kloepper J (2013) Biocontrol of the reniform nematode by *Bacillus firmus* GB-126 and *Paecilomyces lilacinus* 251 on cotton. **Plant Disease** 97:7.

Cober ER, Cianzio SR, Pantalone VR, Rajcan I (2009) Soybean. In: **Oil Crops.**, New York: Springer New York, p. 57–90.

CONAB (2018) Acompanhamento da safra brasileira: grãos. **Cia Nacional Abastacimento 5-SAFRA:145**. ISSN 2318-6852.

Dias WP, Silva J, Garcia A, Carneiro G (2004) Biologia e controle do nematoide de cisto da soja (*Heterodera glycines* Ichinohe). In: **Resultados de Pesquisa da Embrapa Soja-2003: Ecofisiologia, biologia molecular e nematoides**. Londrina: Embrapa Soja, p. 48.

Dias WP, Garcia A, Silva JFV, Carneiro GES (2010) Nematóides em Soja: Identificação e Controle, Londrina: Embrapa Soja. p. 7.

Dias WP, Silva JF V, Carneiro GES, et al (2009) Nematóide de Cisto da Soja: Biologia e Manejo Pelo Uso da Resistência Genética. **Nematologia Brasileira** 33:16.

Dias WP, Silva JF V, Garcia A, Carneiro GES (2007) Nematóides de importância para a soja no Brasil. In: **Boletim de Pesquisa de Soja**, 11th edn. Rondonópolis: Fundação MT, p. 173–184.

Dong LQ, Zhang KQ (2006) Microbial control of plant-parasitic nematodes: a five-party interaction. **Plant and Soil** 288:31–45. doi: 10.1007/s11104-006-9009-3

Endo B (1991) Ultrastructure of initial responses of resistant and susceptible soybean roots to infection by *Heterodera glycines*. **Revue de Nematologie** 14:73–94

Ferraz LCCB, Brown DJF (2016) Nematologia de plantas: fundamentos e importância, Manaus: Norma Edit. p. 251.

Ferraz S, Freitas LD, Lopes EA, Dias-Arieira CR (2010) Manejo sustentável de fitonematóides. Viçosa: UFV, p. 306.

Fontana LF, Dias Arieira CR, Hicaro V, et al (2018) Interference of *Meloidogyne javanica* in the reproduction of *Pratylenchus brachyurus* in soybean cultivar BRS/MT pintado. **Summa Phytopathologica** 44:143–147. doi: 10.1590/0100-5405/177037

Franchini JC, Costa JM da, Debiasi H, Torres E (2011) Importância da rotação de culturas para a produção agrícola sustentável no Paraná. Londrina: **Embrapa Soja**, Doc 327 50.

Gipson I (1971) An Ultrastructural Study of Syncytium Development In Soybean Roots Infected with *Heterodera glycines*. **Phytopathology** 61:347. doi: 10.1094/Phyto-61-347

Glare T, Caradus J, Gelernter W, et al (2012) Have biopesticides come of age? **Trends in Biotechnology** 30:250–258. doi: 10.1016/j.tibtech.2012.01.003

Hartman GL, West ED, Herman TK (2011) Crops that feed the World 2. Soybean—worldwide production, use, and constraints caused by pathogens and pests. **Food Secur** 3:5–17. doi: 10.1007/s12571-010-0108-x

Inagaki H, Tsutsumi M (1971) Survival of the Soybean Cyst Nematode, *Heterodera glycines* ICHINOHE (Tylenchida: Heteroderidae) under Certain String Conditions. **Applied Entomology and Zoology** 6:156–162. doi: 10.1303/aez.6.156

Inomoto MM (2016) Manejo cultural de nematoides. In: Galbieri R, Belot JL (eds) Nematoides fitoparasitas do algodoeiro nos cerrados brasileiros: Biologia e medidas de controle, 3rd edn. Cuiabá: IMAmt, p. 257–286.

Jenkins WR, Taylor DP (1967) Plant nematology. New York and London: Reinhold Publishing Corporation.

Jones MGK, Dropkin VH (1975) Scanning electron microscopy of syncytial transfer cells induced in roots by cyst-nematodes. **Physiological Plant Pathology** 7:259–263. doi: 10.1016/0048-4059(75)90030-2

Jung C, Wyss U (1999) New approaches to control plant parasitic nematodes. **Applied Microbiology and Biotechnology** 51:439–446. doi: 10.1007/s002530051414

Kim K-S, Vuong TD, Qiu D, et al (2016) Advancements in breeding, genetics, and genomics for resistance to three nematode species in soybean. **Theoretical and Applied Genetics**,129:2295–2311. doi: 10.1007/s00122-016-2816-x

Klink VP, Kim K-H, Martins V, et al (2009) A correlation between host-mediated expression of parasite genes as tandem inverted repeats and abrogation of development of female *Heterodera glycines* cyst formation during infection of *Glycine max*. **Planta** 230:53–71. doi: 10.1007/s00425-009-0926-2

Kloepper JW, Ryu C-M, Zhang S (2004) Induced Systemic Resistance and Promotion of Plant Growth by *Bacillus* spp. **Phytopathology** 94:1259–1266. doi: 10.1094/PHYTO.2004.94.11.1259

Lacey L., Frutos R, Kaya H., Vail P (2001) Insect Pathogens as Biological Control Agents: Do They Have a Future? **Biological Control** 21:230–248. doi: 10.1006/bcon.2001.0938

Lal R (2009) Soil degradation as a reason for inadequate human nutrition. **Food Security** 1:45–57. doi: 10.1007/s12571-009-0009-z

Lanna-Filho R, Ferro HM, Silva R, De Pinho C (2010) Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas** 4:12

Liu K, Garrett C, Fadamiro H, Kloepper J (2016) Induction of systemic resistance in Chinese cabbage against black rot by plant growth-promoting rhizobacteria. **Biological Control** 99:8-13.

Lordello AIL, Lordello RRA, Quaggio JA (1992) *Heterodera* sp. reduz a produção de soja no Brasil. **Nematologia Brasileira** 16:81.

Luo T, Hou S, Yang L, et al (2018) Nematodes avoid and are killed by *Bacillus mycooides*-produced styrene. **Journal of Invertebrate Pathology** 159:129–136. doi: 10.1016/J.JIP.2018.09.006

Mandarino JMG (2018) Origem e história da soja no Brasil. Londrina: Embrapa - Radar da Tecnologia. 2.

MAPA (2015) Projeções do Agronegócio Brasil 2014/15 a 2024/25 - Projeções de Longo Prazo, Brasília: 6.

MAPA (2019) Agrofit - Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. In: Ministério da Agric. Pecuária e Abast. http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Accessed 23 Jan 2019

Marrone PG (2014) The market and potential for biopesticides. In: Gross AD, Coats JR, Duke SO, Seiber JN (eds) Biopesticides: **State of the Art and Future Opportunities**. Washington: American Chemical Society, p. 245–258.

Mendes ML., Rodriguez PBN (2000) Reação de cultivares de soja [*Glycine max* (L.) Merrill] aos nematóides de galhas *Meloidogyne javanica* e *M. incognita* raças 1, 2, 3 e 4. **Nematologia Brasileira** 24:211–217.

Meyer MC, Favoreto L, Klepker D, Marcelino-Guimarães FC (2017) Soybean green stem and foliar retention syndrome caused by *Aphelenchoides besseyi*. **Tropical Plant Pathology** 42:403–409. doi: 10.1007/s40858-017-0167-z

Mhatre PH, Karthik C, Kadirvelu K, et al (2019) Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A potential alternative tool for nematodes bio-control. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology** 17:119–128. doi: 10.1016/J.BCAB.2018.11.009

Mitchum MG (2016) Soybean resistance to the Soybean Cyst Nematode *Heterodera glycines*: An Update. **Phytopathology** 106:1444–1450. doi: 10.1094/PHYTO-06-16-0227-RVW

Mitchum MG, Wrather JA, Heinz RD, et al (2007) Variability in distribution and virulence phenotypes of *Heterodera glycines* in Missouri during 2005. **Plant Disease** 91:1473–1476. doi: 10.1094/PDIS-91-11-1473

Mueller DS, Wise KA, Sisson AJ, et al (2016) A Farmer's Guide to Soybean Diseases. **American Phytopathological Society**. 18:19-27.

Niblack TL, Colgrove AL, Colgrove K, Bond JP (2008) Shift in virulence of soybean Cyst Nematode is associated with use of resistance from PI 88788. **Plant Health Progress** 9:29. doi: 10.1094/PHP-2008-0118-01-RS

Nunes HT, Carlos Monteiro A, William A, Pomela V (2010) Uso de agentes microbianos e químico para o controle de *Meloidogyne incognita* em soja. **Acta Scientiarum**. 403–409. doi: 10.4025/actasciagron.v32i3.2166

Oka Y, Nacar S, Putievsky E, et al (2000) Nematicidal Activity of Essential Oils and Their Components Against the Root-Knot Nematode. **Phytopathology** 90:710–715. doi: 10.1094/PHYTO.2000.90.7.710

Pinheiro JB, Carvalho ADF, Vieira JV (2010) Manejo do nematoide-das-galhas (*Meloidogyne* spp.) em cultivos de cenoura na região de Irecê-BA. Comunicado Técnico 77 - EMBRAPA 1:7.

Prestes AR, Vale FXR, Zambolim L, et al (1999) Rotação de culturas no manejo de doenças de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas** 7:369–405

Ruiu L (2018) Microbial Biopesticides in Agroecosystems. **Agronomy** 8:235. doi: 10.3390/agronomy8110235

Siddiqui Y, Ali A, Naidu Y (2014) Histopathological changes induced by *Meloidogyne incognita* in some ornamental plants. **Crop Protection** 65:216–220. doi: 10.1016/J.CROPRO.2014.08.001

Silva FC dos S, Sedyama T, Oliveira R de CT, et al (2017) Economic Importance and Evolution of Breeding. In: Silva FL da, Sedyama ABT, Ludke WH (eds) **Soybean Breeding**. Springer International Publishing, p. 1–17.

Soares PLM, Nascimento DD, Vidal RL, Vizentini LR (2017) Controle biológico de nematoides. In: Baldin EL, Kronka AZ, Silva IF da (eds) **Inovações em manejo fitossanitário**, 1st edn. Botucatu: Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas e Florestais, p. 167–189

Soares PLM, Vidal RL, Nascimento DD, et al (2018) Os Nematoides de Galha (*Meloidogyne* spp.) nas culturas de milho e sorgo. In: Paes MCD, Pinho RG Von, Moreira SG (eds) **Soluções integradas para os sistemas de produção de milho e sorgo no Brasil**. ABMS, Sete Lagoas, pp 66–105.

Stirling GR (1991) Biological Control of Plant-Parasitic Nematodes. In: Poinar GO (ed) **Diseases Of Nematodes**. Boca Raton: CRC Press, p. 103–150.

Strange RN, Scott PR (2005) Plant Disease: A Threat to Global Food Security. **Annual Review of Phytopathology** 43:83–116. doi: 10.1146/annurev.phyto.43.113004.133839

Tihohod D (2000) Nematologia agrícola aplicada, 2nd edn. Jaboticabal: Funep.

Tylka GL, Mullaney MP (2018) Soybean cyst nematode-resistant soybean varieties for Iowa. p. 27.

Xiang N, Lawrence KS, Donald PA (2018) Biological control potential of plant growth-promoting rhizobacteria suppression of *Meloidogyne incognita* on cotton and *Heterodera glycines* on soybean: A review. **Journal of Phytopathology** 166:449–458. doi: 10.1111/jph.12712

Xiang N, Lawrence KS, Kloepper JW, et al (2017a) Biological Control of *Meloidogyne incognita* by Spore-forming Plant Growth-promoting Rhizobacteria on Cotton. **Plant Disease** 101:774–784. doi: 10.1094/PDIS-09-16-1369-RE

Xiang N, Lawrence KS, Kloepper JW, et al (2017b) Biological control of *Heterodera glycines* by spore-forming plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) on soybean. **PLoS One** 12:e0181201. doi: 10.1371/journal.pone.0181201

Zhou Y, Wang Y, Zhu X, et al (2017) Management of the soybean cyst nematode *Heterodera glycines* with combinations of different rhizobacterial strains on soybean. **PLoS One** 12:e0182654. doi: 10.1371/journal.pone.0182654

CAPÍTULO 2 – Espécies de *Bacillus* aplicados via tratamento de sementes e sulco de semeadura no controle de *Heterodera glycines* e promoção de crescimento de soja

RESUMO: A crescente demanda por alternativas mais sustentáveis no manejo de nematoides torna necessária a busca por isolados mais eficientes, tanto para o aumento da produtividade quanto para o controle de fitopatógenos tais como o nematoide de cisto da soja (NCS). Para tanto, o objetivo deste estudo foi avaliar diferentes isolados de *Bacillus* spp., aplicados via tratamento de sementes (TS) e sulco de semeadura (SS) na promoção de crescimento de soja infectada ou não com *Heterodera glycines*, bem como sua eficiência na supressão desse nematoide. Foram testados 19 isolados de *Bacillus subtilis*, *B. velezensis* (syn. *B. amyloliquefaciens*) e *B. methylotrophicus*, aplicados via TS e SS, mais testemunhas (com e sem nematoides) e produtos comerciais [*Bacillus subtilis* UFPEDA 764 (TS); *B. subtilis* UFPEDA 764 (SS); Abamectina (TS); Cadusafós (SS)]. Foram avaliados a emergência das plântulas, altura da planta, massa fresca e seca das partes aéreas, massa fresca das raízes, número de vagens, índice de clorofila, total de nematoides, e determinou-se: nematoide por grama de raízes e fator de reprodução. Devido a existência de uma estrutura de dependência contidas nas variáveis originais, realizou-se análise exploratória dos dados, via Análise de Componentes Principais (ACP), as variáveis independentes foram testadas via análise de Modelo linear geral (GLM). A ACP expressou o poder das variáveis frente a cada tratamento testado, e os mesmos foram classificados frente às variáveis referentes ao desenvolvimento vegetal e multiplicação de nematoides. A aplicação de isolados de *Bacillus* spp., via sulco de semeadura favoreceu a emergência das plantas de soja quando comparado a aplicação via tratamento de sementes. Entretanto, pela ACP, observou-se que os tratamentos feitos via TS se destacaram quanto a promoção do crescimento da planta e controle da população de nematoides. Dentre os dezenove isolados de *Bacillus* spp., dez foram eficientes para promoção do crescimento da soja e supressão de NCS.

Palavras chave: bactérias promotoras de crescimento de plantas; nematoide de cisto da soja; controle biológico; método de aplicação.

Application of *Bacillus* spp. by seed treatment and sowing furrow in the control of *Heterodera glycines* and soybean growth promotion

ABSTRACT: The growing demand for more sustainable alternatives in the management of nematodes makes it necessary to search for more efficient isolates, both to increase productivity and to control diseases such as the soybean cyst nematode (SCN). The objective of this study was to test different *Bacillus* spp isolates, applied through seed treatment (ST) and sowing furrow (SF) in the growth promotion of infected or non-infected soybean with *Heterodera glycines*, as well as its efficiency in nematode suppressing. Nineteen isolates of *Bacillus subtilis*, *B. velezensis* (syn. *B. amyloliquefaciens*) and *B. methylotrophicus* were tested on application by ST and SF, plus controls (with and without nematodes) and commercial products [*Bacillus subtilis* UFPEDA 764 (ST); *B. subtilis* UFPEDA 764 (SF); Abamectin (ST); Cadusafós (SF)]. Seed emergence, plant height, fresh and dry mass of aerial parts, fresh root mass, number of pods, total chlorophyll content, total nematode, nematode per gram of roots and reproductive factor were evaluated. Due to the existence of a dependency structure contained in the original variables, an exploratory analysis of the data was carried out, via Principal Component Analysis (PCA), the independent variables were tested through GLM analysis. The PCA expressed the power of the variables against each treatment tested and they were classified in relation to the variables related to plant growth and nematodes multiplication. The application of *Bacillus* spp. isolates by sowing furrow favored the emergence of soybean plants when compared to the application of seed treatment. However, by the PCA, it was observed that the treatments made by ST stood out for the promotion of plant growth and control of the nematode population. Among the 19 isolates of *Bacillus* spp., 10 were efficient for promoting soybean growth and suppression of NCS.

Key-words: plant growth-promoting bacteria, soybean cyst nematode, biological control, method of application.

1. INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma das leguminosas mais importantes no mundo, especialmente para o Brasil, maior exportador e segundo maior produtor mundial, devido a toda uma cadeia produtiva e tecnológica desenvolvida em torno dessa cultura (Silva et al., 2017). Com uma área semeada de 35,2 milhões de hectares, a soja corresponde a cerca de 57% da área total de grãos cultivados no país (CONAB, 2018). Segundo a mesma fonte, a produtividade média foi de 3.382 kg/ha na última safra (2017/2018). Embora seja uma produtividade recorde, entre as safras brasileiras, ainda está distante do real potencial produtivo da cultura.

Condições edafoclimáticas desfavoráveis e as perdas decorrentes de problemas fitossanitários são os principais fatores que limitam a produtividades da soja. Perdas médias, ocasionadas por doenças, são estimadas em 12,5% em estudo feito ao longo de 5 anos por Allen et al., (2017) nos EUA. Os mesmos autores destacam os nematoides como os responsáveis por 31% do total de perdas por doenças, e ainda que o nematoide de cisto da soja (NCS) (*Heterodera glycines* Ichinohe) é o mais agressivo (29%) dentre as doenças que acometem a cultura.

No Brasil, esses danos podem ser potencializados devido as condições de temperatura e umidade favorável ao longo de todo ano (Ferraz e Brown, 2016). Allen et al. (2017) ressaltam que mais de 30% das perdas de produtividade pelo NCS podem ocorrer sem sintomas visíveis nas plantas, levando a demorar mais tempo para perceber a presença do nematoide na lavoura, aumentando o seu potencial de perdas e dificultando ainda mais o controle desse fitoparasito. Dentre as alternativas de controle de nematoides, as mais usais são: cultivar resistente; sucessão ou rotação de culturas utilizando plantas não hospedeiras, resistentes e/ou antagonistas; alqueive, controle químico e biológico (Soares et al., 2018).

O uso de cultivar resistente destaca-se pela praticidade e facilidade, em geral é eficaz. Porém, a dificuldade na obtenção de genótipos resistentes às diversas raças de NCS, a outras espécies de nematoides e o menor potencial produtivo são os maiores limitantes dessa tecnologia (Klink et al., 2009; Yan et al., 2018). O revolvimento do solo é eficiente, porém, segundo Caires et al. (2006) é uma prática

desfavorável as condições estruturais e químicas do solo. O controle químico, embora eficaz, é caro e tóxico ao ambiente e ao ser humano (Joshi et al., 2018; Torres e Bueno, 2018), e também, pode não ser eficiente, devido ao seu período residual curto e o nível de infestação na área. Destarte, o controle biológico se destaca como um método potencial e promissor, pois além de eficiente, possui longo período de ação, não é tóxico e pode ser associado a outros métodos, visando o manejo integrado de nematoides (Soares et al., 2017).

A utilização de microrganismos antagonicos, além de propiciar o controle de nematoides, podem fornecer outros benefícios, tais como a promoção de crescimento de plantas. *Bacillus* spp. são um importante grupo dentre as bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP), pois além de controle biológico, viabilizam a fixação de nitrogênio (N), solubilização de nutrientes como fósforo (P), síntese de hormônios e produção de enzimas, importantes no processo de desenvolvimento vegetal (Radhakrishnan et al., 2017; Lopes et al., 2018; Xiang et al., 2018; Luo et al., 2018).

Embora seja evidente a importância das BPCP no sistema de produção de soja, não existe nenhum produto formulado a base de *Bacillus* spp. disponível atualmente no mercado brasileiro para o controle de NCS e promoção de crescimento. Desta forma, a seleção de isolados bacterianos potenciais, bem como a avaliação dos mesmos sobre diferentes formas de aplicação, é uma etapa de fundamental importância no desenvolvimento de um programa de controle biológico, visto que estes organismos podem contribuir para o controle de NCS e promoção de crescimento da soja. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes isolados de *B. subtilis*, *B. velezensis* (syn. *B. amyloliquefaciens*) e *B. methylotrophicus* aplicados via TS e SS na promoção de crescimento de soja infectada ou não com *H. glycines*, bem como sua eficiência na supressão desse nematoide.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no período de fevereiro a abril de 2018, em condições de casa de vegetação, do Laboratório de Nematologia (LabNema), no Departamento

de Fitossanidade, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV - UNESP), Câmpus de Jaboticabal, São Paulo, Brasil (21°14'27.8"S 48°17'20.1"W). A temperatura no período foi: máxima, 30,0 °C; mínima, 19,6 °C; média, 24,5 °C.

2.1. Delineamento experimental

O experimento foi dividido em duas fases, sendo avaliado na primeira fase o efeito de 19 isolados de *Bacillus* spp. no desenvolvimento de soja e no controle de NCS, sob dois métodos de aplicação [sulco de semeadura (SS) e tratamento de sementes (TS)], correspondendo a 38 tratamentos mais 6 testemunhas, sendo elas: comercial biológico via TS e SS (*B. subtilis* UFPEDA 764); comercial químico via TS (Abamectina); comercial químico via SS (Cadusafós); tratamento controle inoculado com NCS e sem tratamento com *Bacillus* spp. (T- NCS); tratamento controle sem NCS e sem *Bacillus* spp. (T- S. inoculação).

Na segunda fase, os 19 isolados de *Bacillus* spp. foram avaliados sob as mesmas formas de aplicação (SS e TS) frente ao desenvolvimento da soja, porém, sem a inoculação de NCS, correspondendo a 38 tratamentos mais a testemunha não tratada com *Bacillus* spp.. Para visualização dos gráficos, os tratamentos foram identificados de 1 a 44 e descritos na Tabela 1. Ambos os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado com 6 repetições.

Tabela 1: Identificação e descrição dos tratamentos avaliados quanto a promoção de desenvolvimento de soja (cv. M5947 IPRO) e supressão de *Heterodera glycines*.

Nº	Tratamento	Ingrediente ativo	Dosagem	Concentração
1	ACB-01/ss ⁽¹⁾	<i>Bacillus subtilis</i>	400 mL/ha	1x10 ⁸ UFC/mL
2	ACB-01/ts ⁽²⁾	<i>B. subtilis</i>	4 mL/Kg de sementes	1x10 ⁸ UFC/mL
3	ACB-08/ss	<i>B. velezensis</i>	400 mL/ha	1x10 ⁸ UFC/mL
4	ACB-08/ts	<i>B. velezensis</i>	4 mL/Kg de sementes	1x10 ⁸ UFC/mL
5	ACB-09/ss	<i>B. velezensis</i>	400 mL/ha	1x10 ⁸ UFC/mL
6	ACB-09/ts	<i>B. velezensis</i>	4 mL/Kg de sementes	1x10 ⁸ UFC/mL
7	ACB-10/ss	<i>B. velezensis</i>	400 mL/ha	1x10 ⁸ UFC/mL
8	ACB-10/ts	<i>B. velezensis</i>	4 mL/Kg de sementes	1x10 ⁸ UFC/mL
9	ACB-11/ss	<i>B. subtilis</i>	400 mL/ha	1x10 ⁸ UFC/mL
10	ACB-11/ts	<i>B. subtilis</i>	4 mL/Kg de sementes	1x10 ⁸ UFC/mL
11	ACB-13/ss	<i>B. subtilis</i>	400 mL/ha	1x10 ⁸ UFC/mL
12	ACB-13/ts	<i>B. subtilis</i>	4 mL/Kg de sementes	1x10 ⁸ UFC/mL
13	ACB-15/ss	<i>B. subtilis</i>	400 mL/ha	1x10 ⁸ UFC/mL
14	ACB-15/ts	<i>B. subtilis</i>	4 mL/Kg de sementes	1x10 ⁸ UFC/mL
15	ACB-16/ss	<i>B. methylotrophicus</i>	400 mL/ha	1x10 ⁸ UFC/mL
16	ACB-16/ts	<i>B. methylotrophicus</i>	4 mL/Kg de sementes	1x10 ⁸ UFC/mL
17	ACB-17/ss	<i>B. subtilis</i>	400 mL/ha	1x10 ⁸ UFC/mL
18	ACB-17/ts	<i>B. subtilis</i>	4 mL/Kg de sementes	1x10 ⁸ UFC/mL
19	ACB-18/ss	<i>B. subtilis</i>	400 mL/ha	1x10 ⁸ UFC/mL
20	ACB-18/ts	<i>B. subtilis</i>	4 mL/Kg de sementes	1x10 ⁸ UFC/mL
21	ACB-19/ss	<i>B. velezensis</i>	400 mL/ha	1x10 ⁸ UFC/mL
22	ACB-19/ts	<i>B. velezensis</i>	4 mL/Kg de sementes	1x10 ⁸ UFC/mL
23	ACB-20/ss	<i>B. velezensis</i>	400 mL/ha	1x10 ⁸ UFC/mL
24	ACB-20/ts	<i>B. velezensis</i>	4 mL/Kg de sementes	1x10 ⁸ UFC/mL
25	ACB-21/ss	<i>B. subtilis</i>	400 mL/ha	1x10 ⁸ UFC/mL
26	ACB-21/ts	<i>B. subtilis</i>	4 mL/Kg de sementes	1x10 ⁸ UFC/mL
27	ACB-22/ss	<i>B. subtilis</i>	400 mL/ha	1x10 ⁸ UFC/mL
28	ACB-22/ts	<i>B. subtilis</i>	4 mL/Kg de sementes	1x10 ⁸ UFC/mL
29	ACB-23/ss	<i>B. velezensis</i>	400 mL/ha	1x10 ⁸ UFC/mL
30	ACB-23/ts	<i>B. velezensis</i>	4 mL/Kg de sementes	1x10 ⁸ UFC/mL
31	ACB-24/ss	<i>B. subtilis</i>	400 mL/ha	1x10 ⁸ UFC/mL
32	ACB-24/ts	<i>B. subtilis</i>	4 mL/Kg de sementes	1x10 ⁸ UFC/mL
33	ACB-25/ss	<i>B. subtilis</i>	400 mL/ha	1x10 ⁸ UFC/mL
34	ACB-25/ts	<i>B. subtilis</i>	4 mL/Kg de sementes	1x10 ⁸ UFC/mL
35	ACB-26/ss	<i>B. velezensis</i>	400 mL/ha	1x10 ⁸ UFC/mL
36	ACB-26/ts	<i>B. velezensis</i>	4 mL/Kg de sementes	1x10 ⁸ UFC/mL
37	ACB-AP3/ss	<i>B. subtilis</i>	400 mL/ha	1x10 ⁸ UFC/mL
38	ACB-AP3/ts	<i>B. subtilis</i>	4 mL/Kg de sementes	1x10 ⁸ UFC/mL
39	T- Sem nematoide	-----	-----	-----
40	T- UFPEDA 764/ss	<i>B. subtilis</i>	4 mL/Kg de sementes	3x10 ⁹ UFC/mL
41	T- UFPEDA 764/ts	<i>B. subtilis</i>	400 mL/ha	3x10 ⁹ UFC/mL
42	T- Cadusafós	Cadusafós	4,0 L/ha	200,0 g/L
43	T- Com nematoide	-----	-----	-----
44	T- Abamectina	Abamectina	5 mL/Kg de sementes	500,0 g/L

(¹) "ss" inoculação de *Bacillus* spp. feita via sulco de semeadura; (²) "ts" inoculação de *Bacillus* spp. feita via tratamento de sementes.

2.2. Preparo do substrato e semeadura

Foram utilizados vasos de poliestireno expandido com capacidade para 1 L, preenchidos com substrato previamente autoclavado a 120 °C e 1 atm por 1 hora. O substrato foi composto por uma mistura de terra, areia e esterco bovino, na proporção 1:4:1. Após a autoclavagem, baseado na análise da terra, foi adicionado 0,7 g de adubo na formulação 4-20-20 (N-P-K) por vaso, correspondendo a 150 kg/ha dessa formulação, como adubação de manutenção.

Os vasos foram dispostos em bancada suspensa e irrigados conforme a demanda hídrica da cultura. Em cada vaso foram semeadas duas sementes de soja e 15 dias após a semeadura foi realizado o desbaste da plântula menos vigorosa, mantendo uma plântula por vaso e esta foi considerada uma unidade experimental. A cultivar de soja utilizada foi a M5947 IPRO, ciclo precoce, suscetível ao NCS. As inoculações foram realizadas no ato da semeadura e serão detalhadas posteriormente.

2.3. Origem, preparo e inoculação de *Heterodera glycines*

A população original de NCS foi obtida de raízes de soja, naturalmente infestada, no município de Guaíra – SP, nas proximidades das coordenadas 20°27'15.2"S 48°19'05.9"W. A espécie de *H. glycines*, foi identificada com base em caracteres morfológicos de fêmeas adultas e comparadas com as descrições contidas em Burrows e Stone (1985). A população foi então mantida em plantas de soja cultivadas em casa de vegetação do LabNema até a véspera da instalação do experimento. Os cistos de NCS foram extraídos conforme metodologia proposta por Shepherd (1986). A inoculação foi realizada no ato da semeadura, sendo inoculados 5 mL da suspensão, contendo 3 mil ovos e J2, próximo de cada semente.

2.4. Origem, preparo e inoculação dos isolados de *Bacillus* spp.

Os 19 isolados de *Bacillus* spp. foram obtidos a partir de folhas e flores de *Citrus sinensis* e de solo de diferentes regiões do Estado de São Paulo (Souza 2018). Todos os isolados foram obtidos da coleção de microrganismos do Laboratório de Fitopatologia e Controle Biológico do Centro de Citricultura “Sylvio Moreira”/IAC.

Os isolados foram repicados para meio BDA, em placas de Petri e mantidas em estufa incubadora B.O.D. a 27 °C com fotoperíodo de 12 h durante 72 h para crescimento. Decorrido esse período, o meio foi raspado com o auxílio de uma alça de platina e o concentrado de células dissolvido em uma suspensão contendo água autoclavada deionizada. Seguidamente, a suspensão foi calibrada com o auxílio de uma câmara de Neubauer até a obtenção da concentração final de 1×10^8 células por mL. As suspensões foram armazenadas a aproximadamente 8 °C por 24 h, até o momento da aplicação.

Os métodos de aplicação adotados nesse trabalho objetivaram a fiel reprodução do que é realizado pelo agricultor. Desta forma, as sementes tratadas via TS foram pesadas e acondicionadas em sacos plásticos, e então, inoculadas com a suspensão bacteriana conforme a dosagem especificada na Tabela 1, no período máximo de 2 h antes da semeadura. As sementes cujo o tratamento foi via SS, foram semeadas, inoculadas com nematoides e então tratadas com a suspensão bacteriana, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur estéril, conforme a dosagem especificada na Tabela 1.

2.5. Avaliações

Aos 15 dias após a semeadura foi realizada a avaliação de emergência, sendo considerada as plântulas completamente emergidas por tratamento. Já aos 70 dias após a data da semeadura (soja em estágio R6), foram medidos o índice de clorofila (Clorofila), altura da planta (Altura), número de vagens por planta (Vagens), massa fresca das partes aéreas (MFPA), massa seca das partes aéreas (MSPA). Os índices

de clorofila foram determinados com o auxílio de um clorofilômetro portátil ClorofiLOG Falker (modelo CFL 1030). Para tanto, foi calculada uma média a partir de 3 leituras realizadas por planta, sendo uma leitura por trifólio, a partir do primeiro trifólio totalmente desenvolvido.

As raízes foram separadas das partes aéreas e armazenadas em câmara fria (8-9 °C) até o momento da extração dos nematoides. Anteriormente à extração, as raízes foram lavadas em água parada, retirando-se o excesso de solo, para então ser avaliada a massa fresca das raízes (MFR). A água proveniente da lavagem das raízes foi vertida em peneira de 20 sobre 500 mesh, e o material retido foi recuperado e somado as respectivas raízes no momento da extração. Os nematoides foram extraídos das raízes, previamente trituradas em liquidificador, via flotação centrífuga em solução de sacarose com adição de caulim, conforme metodologia de (Coolen e D'Herde, 1972). A população final dos nematoides foi estimada em câmara de Peters com auxílio de um microscópio fotônico, obtendo-se a quantidade total de nematoides nas raízes por planta (NT); NT por grama de raízes (N/g.raízes); fator de reprodução (FR), esse último obtido pela relação NT e a população inicial inoculada (3.000).

2.6. Análise dos dados

Devido a existência de uma estrutura de dependência contida no conjunto de variáveis originais, realizou-se análise exploratória dos dados pelo software STATISTICA, versão 7.0 (Statistica 2004), sendo as variáveis previamente padronizadas (distribuição normal, média = 0 e variância = 1). Nesta análise considerou-se às médias dos tratamentos e as variáveis: Clorofila; Altura de plantas (cm); Número de vagens; MFPA (g); MSPA (g); MFR (g); NT; N/g.raízes. Nos tratamentos sem inoculação de *H. glycines* desconsidera-se as variáveis: NT e N/g.raízes.

A estrutura multivariada dos resultados foi avaliada pela análise de componentes principais (ACP) para condensar a quantidade de informações relevantes contidas no conjunto de dados original em um menor número de dimensões (componentes principais) resultantes de combinações lineares das variáveis originais

geradas a partir dos maiores autovalores da matriz de covariância (Hair et al., 2005). Na ACP, considerou-se como relevantes os autovalores maiores que 1, de acordo com o critério de Kaiser (1958).

As cargas fatoriais das variáveis são usados para interpretar seu significado nos componentes principais, usando o sinal e o tamanho relativo dos coeficientes como uma indicação do peso a ser colocado em cada variável (Hair et al., 2005). Foram consideradas relevantes as cargas com valores em módulo superior a 0,5.

A faixa da elipse destacada nos eixos X e Y, dos biplots, compreende valores aproximados de -2 a 2 e isso está de acordo com Dallastra et al. (2014). Os tratamentos dentro da elipse, não foram considerados relevantes, assim sendo, os que foram localizados na região externa à elipse foram considerados, justamente por possuírem características altamente específicas (Dallastra et al., 2014).

As variáveis, emergência das plântulas de soja e fator de reprodução do nematoide foram testadas via Modelo Linear Geral (GLM) usado como análise de variância (ANOVA).

3. RESULTADOS

3.1. Emergência das plântulas de soja

Observou-se na avaliação de emergências das plântulas de soja frente aos diferentes tratamentos, para os métodos de aplicação via tratamento de sementes (TS) e via sulco de semeadura (SS), maior emergência nos tratamentos onde não houve inoculação de NCS, quando comparados aos tratamentos inoculados com o nematoide ($P < 0,0001$). Para tanto, quando analisado os dois métodos de aplicação, obteve-se maior emergência nos tratamentos aplicados via SS, tanto na presença quanto na ausência de nematoides ($P = 0,0159$). Todos os tratamentos apresentaram maiores médias de emergência, em pelo menos um dos métodos de aplicação ($P = 0,0189$), quando comparados a testemunha não tratada (T- NCS). Não houve diferença entre os isolados de *Bacillus* spp. para a emergência das plântulas de soja ($P = 0,4180$).

3.2. Fator de reprodução

O fator de reprodução (FR) de NCS no tratamento T- NCS foi o maior entre todos os tratamentos (média = 20,3) ($P < 0,001$), evidenciando a viabilidade do inóculo e as condições ambientais adequadas para a multiplicação de *H. glycines*. Todos os demais tratamentos inoculados com NCS apresentaram FR que variou entre 0,8 a 14,2.

3.3. Análise de Componentes Principais para os tratamentos sem inoculação de *Heterodera glycines*

A ACP resultou em dois componentes principais (CP) para os tratamentos sem a inoculação de nematoides. Os dois CP juntos possibilitaram uma ordenação bidimensional dos tratamentos e das variáveis, o que permitiu a construção de um gráfico biplot (Figura 1). Na Tabela 2, os escores expressam a correlação entre as variáveis. A quantidade da informação total das variáveis originais, retida pelos dois componentes principais foi de 79,8% (CP1:56,26% + CP2:20,57%). Para tanto, analisando o CP1 (56,26% da variância explicada), observa-se que nos tratamentos sem inoculação de NCS (Figura 1), as variáveis clorofila, número de vagens, MFPA e MSPA atuaram de forma semelhante, enquanto que a variável MFR foi inversamente correlacionada. No CP2, as variáveis MFR, MFPA, MSPA e altura de plantas foram diretamente correlacionadas.

Pelo Biplot da Figura 1, observa-se que os tratamentos que apresentaram os maiores valores de clorofila, número de vagens, MFPA e MSPA foram 4 (ACB-08/ts), 6 (ACB-09/ts), 10 (ACB-11/ts), 12 (ACB-13/ts), 16 (ACB-16/ts), 18 (ACB-17/ts), 22 (ACB-19/ts), 24 (ACB-20/ts), 26 (ACB-21/ts), e 36 (ACB-26/ts), todos aplicados via TS. Os tratamentos 3 (ACB-08/ss), 9 (ACB-11/ss), 15 (ACB-16/ss), 17 (ACB-17/ss) e 33 (ACB-25/ss) apresentaram altos índices de altura, MFPA, MSPA e MFR, mas foram deficientes em clorofila e número de vagens. Os piores índices para todas as variáveis estudadas foram obtidos nos tratamentos 13 (ACB-15/ss), 29 (ACB-23/ss), 34 (ACB-

25/ts), 35 (ACB-26/ss). Os tratamentos no interior da elipse não foram considerados relevantes ($P > 0,05$).

Tabela 2: Correção entre as variáveis analisadas em soja (cv. M5947 IPRO) tratada com *Bacillus* spp. e não inoculada com *Heterodera glycines* nos componentes principais 1 e 2 (CP1 e CP2).

Variáveis	Correlação	
	CP1	CP2
Clorofila	-0,86	0,41
Altura da planta	0,29	-0,53
Número de vagens	-0,95	-0,05
Massa fresca das partes aéreas	-0,81	-0,51
Massa seca das partes aéreas	-0,75	-0,58
Massa fresca das raízes	0,65	-0,60
Variância explicada (%)	56,21	23,54
Autovalores	3,37	1,41

As cargas expressivas nos componentes principais (CP) estão em negrito (Carga $\geq |0,5|$).

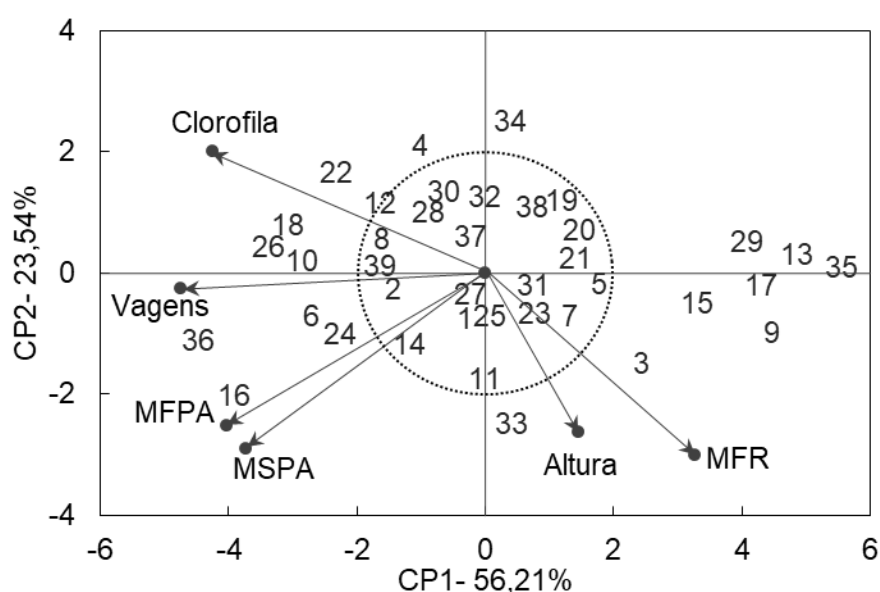


Figura 1. Biplot da Análise de Componentes Principais (CP1 x CP2) das variáveis, clorofila, altura de planta, número de vagens, massa seca das partes aéreas (MSPA), massa fresca das partes aéreas (MFPA), massa fresca das raízes (MFR) e dos tratamentos à base de *Bacillus* spp. (números: 1 a 38) e testemunha sem inoculação (número: 39), em soja (M5947 IPRO). Tratamentos dentro da elipse não foram relevantes ($P > 0,05$).

3.4. Análise de componentes principais para os tratamentos com inoculação de *Heterodera glycines*

A análise de componentes principais também foi aplicada nos tratamentos inoculados com *Bacillus* spp. e com NCS, juntamente com os comerciais e testemunhas, e foram obtidos 3 CPs, que somados [(CP1 (40,61%) + CP2(20,57%) + CP3(17,78%)] representam 78,96% da variância total retida. Para expressar os dados em uma estrutura bidimensional os componentes foram expressos em dois biplots, Figura 2 (CP1 vs CP2) e Figura 3 (CP1 vs CP3).

Tabela 3: Correção entre as variáveis analisadas em soja (cv. M5947 IPRO) tratada com *Bacillus* spp. e inoculada com *Heterodera glycines*, nos componentes principais 1, 2 e 3 (CP1, CP2 e CP3).

Variáveis	Correlação		
	CP1	CP2	CP3
Clorofila	0,11	-0,47	0,73
Altura da planta	0,14	-0,06	0,38
Número de vagens	0,77	-0,32	0,00
Massa fresca das partes aéreas	0,91	-0,29	0,17
Massa seca das partes aéreas	0,87	-0,32	-0,16
Massa fresca das raízes	0,54	-0,13	-0,68
Nematoide total	-0,57	-0,78	-0,23
Nematoide por grama de raízes	-0,66	-0,72	-0,13
Variância explicada (%)	40,61	20,57	15,78
Autovalores	3,25	1,65	1,26

As cargas expressivas nos componentes principais (CP) estão em negrito (Carga $\geq |0,5|$).

Observa-se no CP1 (Tabela 3) que as variáveis número de vagens, MFPA, MSPA, MFR, nematoide total e nematoide por grama de raízes, foram correlacionadas, entretanto, as variáveis nematológicas (Nematoide total e Nematoide por grama de raízes) atuaram de forma contrária, ou seja, à medida que os tratamentos apresentavam menor quantidade de nematoides, maiores foram os índices de MFPA, MSPA, MFR e número de vagens. Analisando o CP2, observa-se uma direta correlação entre as variáveis nematoide por grama de raízes e nematoide total. No CP3, as variáveis clorofila e massa fresca das raízes, embora correlacionadas, atuaram de forma inversa.

Analisando o biplot da Figura 2, observa-se que os tratamentos 4 (ACB-08/ts), 18 (ACB-17/ts), 28 (ACB-22/ts), 30 (ACB-23/ts), 38 (ACB-AP3/ts) e 39 (T- S. inoculação), foram os que apresentaram maiores índices de MFPA, MSPA, MFR e número de vagens, e ao mesmo tempo foram os que menos multiplicaram NCS. Desses tratamentos, com exceção da testemunha (T- S. inoculação), todos foram tratados via TS. De forma contrária, os tratamentos 1 (ACB-01/ss), 3 (ACB-08/ss), 13 (ACB-15/ss), 23 (ACB-20/ss), 29 (ACB-23/ss), 33 (ACB-25/ss), 40 (T- UFPEDA 764/ss), e 44 (T- Abamectina) (tratados via SS, exceto T- Abamectina) permitiram alta multiplicação de nematoides e apresentaram os menores índices de MFPA, MSPA, MFR e número de vagens. Os tratamentos, 15 (ACB-16/ss), 17 (ACB-17/ss), 41 (T- UFPEDA 764/ts) e 43 (T- NCS) foram os que mais multiplicaram NCS.

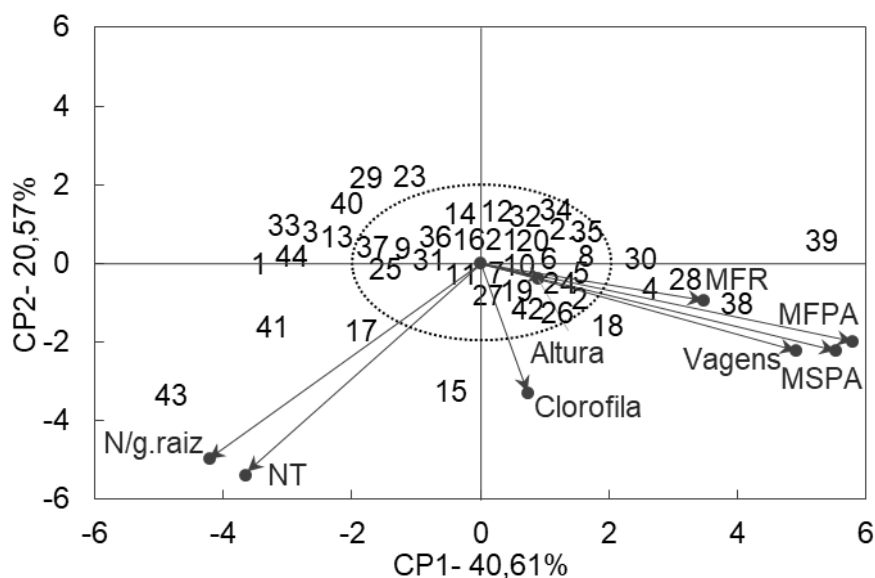


Figura 2. Biplot da Análise de Componentes Principais (CP1 x CP2) das variáveis, nematoide por grama de raízes (N/g.raízes), nematoide total (NT), clorofila, altura de planta, número de vagens, massa seca das partes aéreas (MSPA), massa fresca das partes aéreas (MFPA), massa fresca das raízes (MFR) e dos tratamentos à base de *Bacillus* spp. (números: 1 a 38), testemunha com e sem inoculação (números: 43 e 39, respectivamente) e comerciais (números: 40, 41, 42 e 44), em soja (M5947 IPRO) infectada com *Heterodera glycines*. Tratamentos dentro da elipse não foram relevantes ($P > 0,05$).

No biplot CP1(40,61%) vs CP3(15,78%) (Figura 3), observa-se uma melhor identificação das variáveis que correspondem às características de crescimento da planta, e as variáveis que correspondem à multiplicação dos nematoides. Por tanto, pelo CP1, os tratamentos 2 (ACB-01/ts), 4 (ACB-08/ts), 18 (ACB-17/ts), 28 (ACB-22/ts), 30 (ACB-23/ts), 38 (ACB-AP3/ts) e 39 (T- S. inoculação) foram os que apresentaram os maiores índices de MFPA, MSPA, MFR e número de vagens, e os que menos multiplicaram NCS. Em contrapartida, os tratamentos 1 (ACB-01/ss), 3 (ACB-08/ss), 25 (ACB-21/ss), 33 (ACB-25/ss), 40 (T- UFPEDA 764/ss), 41 (T- UFPEDA 764/ts), 43 (T- NCS), 44 (T- Abamectina) foram inferiores nos parâmetros de MFPA, MSPA, MFR e número de vagens e apresentaram maior multiplicação de NCS.

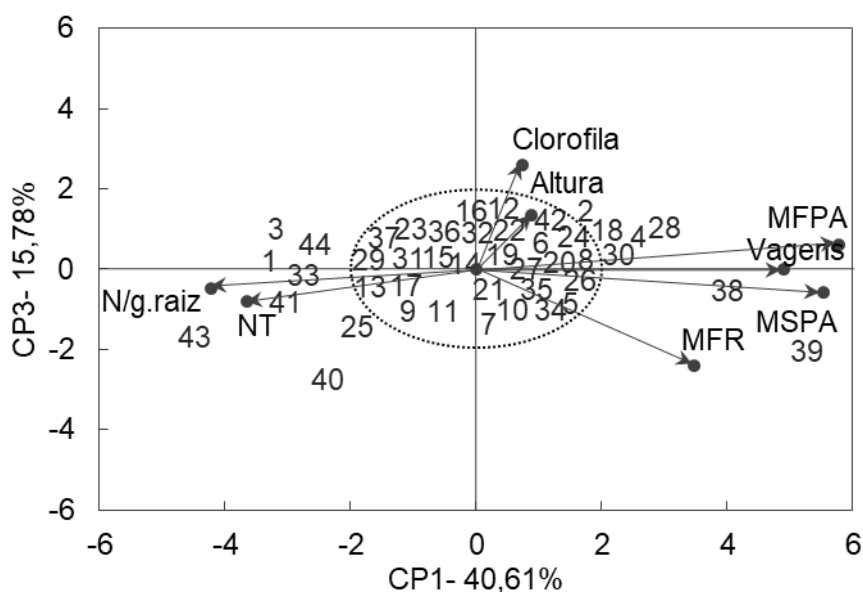


Figura 3. Biplot da Análise de Componentes Principais (CP1 x CP3) das variáveis, nematoide por grama de raízes (N/g.raízes), nematoide total (NT), clorofila, altura de planta, número de vagens, massa seca das partes aéreas (MSPA), massa fresca das partes aéreas (MFPA), massa fresca das raízes (MFR) e dos tratamentos à base de *Bacillus* spp. (números: 1 a 38), testemunha com e sem inoculação (números: 43 e 39, respectivamente) e comerciais (números: 40, 41, 42 e 44), em soja (M5947 IPRO) infectada com *Heterodera glycines*. Tratamentos dentro da elipse não foram relevantes ($P > 0,05$).

4. DISCUSSÃO

4.1. Emergência das plântulas de soja

Os resultados obtidos mostram que NCS prejudicaram em 11,4% a emergências das plântulas de soja, quando comparado com as plantas não inoculadas. Esse efeito pode ser ocasionado devido ao nível populacional de nematoides sobre a radícula em desenvolvimento. Zhou et al. (2017), também observaram influência negativa de NCS sobre a germinação de sementes e vigor de soja inoculadas com NCS. Já os maiores índices de emergência das plântulas, especialmente onde foram utilizados os tratamentos à base de *Bacillus* spp., evidenciam o benefício dessas bactérias na proteção da soja logo nas suas fases iniciais de desenvolvimento. Esses resultados corroboram os encontrados por Zhou et al. (2017) ao testar formulações de *Bacillus* spp. na germinação de sementes e vigor de plântulas de soja inoculada com NCS. Os mesmos autores também observaram maiores comprimentos da parte aérea e da raiz principal, nos tratamentos feitos com essas bactérias. Entretanto, o melhor desempenho dos tratamentos aplicados via SS (6,3%) quando comparado ao TS pode ser explicado pela maior umidade proporcionada pelo método de aplicação, fato que de acordo com Costa et al. (2017) pode favorecer a germinação das sementes e vigor das plantas.

4.2. Multiplicação dos nematoides

O maior FR encontrado na testemunha, não tratada, e o fato de todos os tratamentos terem apresentado FR superior a 1, inclusive os comerciais, permite aferir o parasitismo e multiplicação do NCS, na cultivar M5947 IPRO. Kandel et al. (2017) observaram que a produtividade foi negativamente correlacionada com nível da população final de NCS, sendo ainda pior quando associada a outras doenças. Portanto, mesmo que os tratamentos avaliados não tenham reduzido a população do nematoide, comparado a população inicial ($FR < 1$), todos os tratamentos avaliados,

via TS e S, apresentaram menor população final ($P < 0,01$), em relação a T- NCS, evidenciando a importância da utilização dos tratamentos testados em um sistema de manejo de NCS.

4.3. Análise de Componentes Principais para os tratamentos sem inoculação de *Heterodera glycines*

Observou-se nos tratamentos não inoculados com nematoide, melhor desenvolvimento da planta, para a maioria das variáveis medidas, quando as sementes foram tratadas via TS. O tratamento TS possibilita uma maior concentração de células bacterianas diretamente no tegumento da semente, já que o volume de calda é menor, quando comparado ao método via SS. Desse modo, as células bacterianas aderidas diretamente no tegumento, se tornam mais próximas à radícula, elevando as chances de sucesso na colonização da rizosfera. Além disso, na inoculação via SS perde-se para o substrato parte das células inoculadas, isso devido ao maior volume de calda, não capaz de ser adsorvido totalmente pela semente. De acordo com Mhatre et al. (2019), o sucesso no uso de rizobactérias para fins benéficos, como a fitoestimulação, biofertilização, fitorremediação e biocontrole dependem de sua colonização da rizosfera.

O fato de alguns isolados terem favorecido o desenvolvimento das plantas, quando comparadas a testemunha não tratada (T- S. inoculação), indicam que essas bactérias também podem ser utilizadas em áreas com baixos níveis de infestação de nematoides, atuando como promotoras de crescimento, já que promovem características interessantes ao desenvolvimento vegetal, podendo resultar em ganhos de produtividade.

4.4. Análise de Componentes Principais para os tratamentos com inoculação de *Heterodera glycines*

A maior eficiência da aplicação via TS na promoção de crescimento das plantas de soja também foi observada nos tratamentos inoculados com NCS. Pensando no controle de nematoides, o encontro tardio, da radícula com as células bacterianas disponíveis no substrato (tratamento via SS), pode prejudicar sua eficiência em uma pré-imunização das raízes ao ataque dos nematoides, isso mostra que a forma de aplicação via TS é mais eficiente tanto na promoção de crescimento da soja, quanto na supressão de NCS. Este é o primeiro trabalho que evidencia esse efeito.

A presença dos nematoides, possibilitou melhor separação dos tratamentos frente as variáveis analisadas. A eficiência de *Bacillus* spp. na promoção de crescimento já foi relatada. Elkoca et al. (2007) observaram incremento na massa seca das raízes, massa seca da parte aérea, altura de planta e clorofila em grão de bico inoculado com *Rhizobium* sp., *B. subtilis* e *B. megaterium*, esse efeito foi devido à capacidade de solubilização de P e fixação de N dessas bactérias. Além da disponibilização de nutrientes, estudos têm mostrado diversos mecanismos que viabilizam a utilização dessas bactérias. Mecanismos como, produção de sideróforos, indução de resistência sistêmica a doenças, produção de fitormônios e competição por nutrientes já foram relatados (Liu et al., 2016).

A eficiência de *Bacillus* spp. para controle de nematoides como *Pratylenchus brachyurus*, *Meloidogyne incognita* e *H. glycines*, considerados de grande importância para a agricultura mundial, também já foram relatadas (Harni et al., 2007; Xiang et al., 2017a; Xiang et al., 2017b). Xiang et al. (2017a) observaram mortalidade superior a 50% de J2 de *H. glycines*, pelo antagonismo de 13 espécies de *Bacillus*, dentre elas, *B. methylotrophicus*, *B. subtilis*, *B. velezensis* (syn. *B. amyloliquefaciens*) em teste realizado *in vitro*. Grande parte do efeito desse controle de nematoides é devido a produção de metabólitos secundários, tais como enzimas e toxinas, que podem inibir a reprodução de nematoides, a eclosão e a sobrevivência de juvenis de *H. glycines* (Xiang et al., 2018).

Pela ACP, observou-se a alta correlação entre as variáveis. Por exemplo, à medida que os tratamentos promoveram incremento na variável MSPA, conseqüentemente, elevou-se os índices de altura de planta, número de vagens, MFPA e MFR, em contrapartida, esses índices eram prejudicados à medida que havia o aumento da população de nematoides. Esta correlação, permitiu classificar os tratamentos que menos multiplicaram os nematoides e que mais promoveram o crescimento vegetal. Entretanto, novos estudos a nível de campo utilizando os melhores isolados observados neste trabalho, serão necessários para confirmação da eficiência desses organismos em ambiente não controlado.

Levando em consideração o método de aplicação via TS como o mais eficiente, foi possível observar que os melhores isolados visando o crescimento da soja e a supressão de NCS, foram: ACB-01, ACB-08, ACB-17, ACB-22, ACB-23 e ACB-AP3. Resultados promissores sobre esses isolados já haviam sido relatados anteriormente no controle de outras doenças, mas não para nematoides. Kupper et al. (2003), observou sucesso na utilização desses isolados no controle de *Colletotrichum acutatum* (Simmonds) agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. Esse efeito de controle, foi devido ao antagonismo, ocasionado pela produção de metabólitos tóxicos. Souza (2018) relatou o antagonismo dos mesmos isolados para *Alternaria alternata* f.sp. citri, agente causal da mancha marrom de alternaria em citros. Fujimoto e Kupper (2016), relataram de 42,3% a 90,0% de inibição do crescimento micelial de *Phyllosticta citricarpa* (McAlpine) Petrak (teleomorfo: *Guignardia citricarpa* Kiely) utilizando os isolados ACB-01, ACB-08, ACB-13, ACB-17, ACB-19, ACB-15, ACB-22, ACB-23, ACB-16, ACB-20 e ACB-18, sendo que todos exibiram atividade β -1,3-glucanase e produção de compostos antifúngicos termoestáveis.

As espécies de *Bacillus*, pertencem ao grupo bacteriano aeróbico formador de endósporos (Mhatre et al., 2019), que ajudam as bactérias a sobreviver em uma ampla gama de condições ambientais e ter vida útil longa, dando-lhes uma vantagem como produto comercial. Segundo Kupper et al. (2003) o fato dessas bactérias produzirem compostos tóxicos e resistentes a altas temperaturas, viabiliza ainda mais sua formulação como um bioproduto. A utilização desses isolados como bioprodutos, pode minimizar ou até mesmo eliminar a utilização de determinados produtos químicos, que

em geral são altamente tóxicos, se tratando de controle de nematoides. Além disso, o uso indiscriminado de produtos químicos prejudica a biota do solo (Joshi et al., 2018).

A utilização de técnicas estatísticas exploratórias na seleção de isolados pode ser indicada, principalmente em situações como as desse estudo, em que as variáveis apresentam estruturas de dependência, permitindo explorá-las por diversas perspectivas e assim melhor compreendê-las, bem como seu poder na classificação dos isolados utilizados. Desta forma, os critérios no momento da seleção se tornam mais confiáveis, visto que o isolado é selecionado por meio de um processo multivariado.

6. CONCLUSÕES

- A aplicação de isolados de *Bacillus* spp., via sulco de semeadura favorece à emergência das plântulas de soja quando comparado a aplicação via tratamento de sementes.
- A aplicação via tratamento de sementes é melhor para promoção de crescimento e supressão de *Heterodera glycines* em soja.
- Os melhores isolados para promoção de crescimento da soja e supressão de *H. glycines* foram: ACB-01 (*B. subtilis*), ACB-08 (*B. velezensis*), ACB-17 (*B. subtilis*), ACB-22 (*B. subtilis*), ACB-23 (*B. velezensis*), ACB-AP3 (*B. subtilis*).

7. AGRADECIMENTO

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

8. REFERÊNCIAS

Allen TW, Bradley CA, Sisson AJ, Byamukama E, Chilvers MI, Coker CM, Collins AA, Damicone JP, Dorrance AE, Dufault NS, Esker PD, Faske TR, Giesler LJ, Grybauskas AP, Hershman DE, Hollier CA, Isakeit T, Jardine DJ, Kelly HM, Kemerait RC, Kleczewski NM, Koenning SR, Kurle JE, Malvick DK, Markell SG, Mehl HL, Mueller DS, Mueller JD, Mulrooney RP, Nelson BD, Newman MA, Osborne L, Overstreet C, Padgett GB, Phipps PM, Price PP, Sikora EJ, Smith DL, Spurlock TN, Tande CA, Tenuta AU, Wise KA, Wrather, JA (2017) Soybean Yield Loss Estimates Due to Diseases in the United States and Ontario, Canada, from 2010 to 2014. **Plant Health Progress** 18:19–27. doi: 10.1094/PHP-RS-16-0066

Burrows PR, Stone AR (1985) *Heterodera glycines*. CIH Descriptions of plant parasitic nematodes. **Commonwealth Agricultural Bureaux** 8:4.

Caires EF, Barth G, Garbuió FJ (2006) Lime application in the establishment of a no-till system for grain crop production in Southern Brazil. **Soil and Tillage Research** 89:3–12. doi: 10.1016/J.STILL.2005.06.006

CONAB (2018) Acompanhamento da safra brasileira: grãos. **Cia Nacional Abastecimento 5-SAFRA:145**. ISSN 2318-6852.

Coolen WA, D'Herde CJ (1972) A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue. **Agricultural Research Administration** 77.

Costa DS da, Rocha CR de M, Yagushi JT, et al (2017) Hidratação controlada de sementes de soja: potencial fisiológico e emergência em solo com *Rhizoctonia solani*. **Journal of Neotropical Agriculture** 4:27–34.

Dallastra A, Unêda-Trevisoli SH, Ferraudo AS, Di Mauro AO (2014) Multivariate approach in the selection of superior soybean progeny which carry the RR gene. **Revista Ciência Agronômica** 45:588–597. doi: 10.1590/S1806-66902014000300021

Elkoca E, Kantar F, Sahin F (2007) Influence of nitrogen fixing and phosphorus solubilizing bacteria on the nodulation, plant growth, and yield of chickpea. **Faik Kantar Fikrettin Sahin** 31:157–171. doi: 10.1080/01904160701742097

- Ferraz LCCB, Brown DJF (2016) Nematologia de plantas: fundamentos e importância, Manaus: Norma Edit. p. 251.
- Fujimoto A, Kupper KC (2016) Production of Antifungal Compounds and Hydrolytic Enzymes by *Bacillus* spp. as mechanisms of action against *Phyllosticta citricarpa*. **Journal of Agriculture and Veterinary Science**. 9:19–27. doi: 10.9790/2380-0911021927
- Harni R, Munif A, Supramana, Mustika I (2007) Potensi Bakteri Endofit Pengendali Nematoda Peluka Akar (*Pratylenchus brachyurus*) pada Nilam. HAYATI **Journal of Bioscience** 14:7–12. doi: 10.4308/HJB.14.1.7
- Hu H, Wang C, Li X, et al (2018) RNA-Seq identification of candidate defense genes targeted by endophytic *Bacillus cereus* -mediated induced systemic resistance against *Meloidogyne incognita* in tomato. **Pest Management Science**, 74:2793–2805. doi: 10.1002/ps.5066
- Joshi J, Tomar DS, Titov (2018) Seed Quality Parameters of Peanut and Soybean as Influenced by Seed Treatment with different Microbial Inoculants. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, 7:2660–2668. doi: 10.20546/ijcmas.2018.701.318
- Kaiser HF (1958) The varimax criterion for analytic rotation in factor analysis. **Psychometrika** 23:187–200. doi: 10.1007/BF02289233
- Kandel YR, Wise KA, Bradley CA, et al (2017) Effect of Soybean Cyst Nematode Resistance Source and Seed Treatment on Population Densities of *Heterodera glycines*, Sudden Death Syndrome, and Yield of Soybean. **Plant Disease** 101:2137–2143. doi: 10.1094/PDIS-12-16-1832-RE
- Klink VP, Kim K-H, Martins V, et al (2009) A correlation between host-mediated expression of parasite genes as tandem inverted repeats and abrogation of development of female *Heterodera glycines* cyst formation during infection of *Glycine max*. **Planta** 230:53–71. doi: 10.1007/s00425-009-0926-2

Kupper KC, Gimenes-Fernandes N, Goes A (2003) Controle Biológico de *Colletotrichum acutatum*, Agente Causal da Queda Prematura dos Frutos Cítricos. **Fitopatologia Brasileira**, 28:251–257

Liu K, Garrett C, Fadamiro H, Kloepper J (2016) Induction of systemic resistance in Chinese cabbage against black rot by plant growth-promoting rhizobacteria. **Biological Control** 99:8-13.

Lopes R, Tsui S, Gonçalves PJRO, de Queiroz MV (2018) A look into a multifunctional toolbox: endophytic *Bacillus species* provide broad and underexploited benefits for plants. **World Journal of Microbiology Biotechnology** 34:94. doi: 10.1007/s11274-018-2479-7

Luo T, Hou S, Yang L, et al (2018) Nematodes avoid and are killed by *Bacillus mycoides*-produced styrene. **Journal of Invertebrate Pathology** 159:129–136. doi: 10.1016/J.JIP.2018.09.006

Mhatre PH, Karthik C, Kadirvelu K, et al (2019) Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A potential alternative tool for nematodes bio-control. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology** 17:119–128. doi: 10.1016/J.BCAB.2018.11.009

Radhakrishnan R, Hashem A, Abd_Allah EF (2017) *Bacillus*: A Biological Tool for Crop Improvement through Bio-Molecular Changes in Adverse Environments. **Frontiers in Physiology** 8:667. doi: 10.3389/fphys.2017.00667

Shepherd AM (1986) Extraction and estimation of cyst nematodes. In: Southey JF (ed) **Laboratory Methods for Work with Plant and Soil Nematodes**, MAFF Refer. London: HMSO, p. 31–49.

Silva FC dos S, Sedyama T, Oliveira R de CT, et al (2017) Economic Importance and Evolution of Breeding. In: Silva FL da, Sedyama ABT, Ludke WH (eds) **Soybean Breeding**. Springer International Publishing, p. 1–17.

Soares PLM, Nascimento DD, Vidal RL, Vizentini LR (2017) Controle biológico de nematoides. In: Baldin EL, Kronka AZ, Silva IF da (eds) **Inovações em manejo fitossanitário**, 1st edn. Botucatu: Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas e Florestais, p. 167–189

Soares PLM, Vidal RL, Nascimento DD, et al (2018) Os Nematoides de Galha (*Meloidogyne* spp.) nas culturas de milho e sorgo. In: Paes MCD, Pinho RG Von, Moreira SG (eds) **Soluções integradas para os sistemas de produção de milho e sorgo no Brasil**. ABMS, Sete Lagoas, pp 66–105.

Souza ADC (2018) **Controle biológico de alternaria alternata, agente causal da mancha marrom de alternaria, por *Bacillus* spp.** 61 f. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de São Carlos.

Statistica (2004) Statistica: data analysis software system. Version 7. <www.statsoft.com>.

Torres JB, Bueno A de F (2018) Conservation biological control using selective insecticides – A valuable tool for IPM. **Biological Control** 126:53–64. doi: 10.1016/J.BIOCONTROL.2018.07.012

Xiang N, Lawrence KS, Donald PA (2018) Biological control potential of plant growth-promoting rhizobacteria suppression of *Meloidogyne incognita* on cotton and *Heterodera glycines* on soybean: A review. **Journal of Phytopathology** 166:449–458. doi: 10.1111/jph.12712

Xiang N, Lawrence KS, Kloepper JW, et al (2017a) Biological Control of *Meloidogyne incognita* by Spore-forming Plant Growth-promoting Rhizobacteria on Cotton. **Plant Disease** 101:774–784. doi: 10.1094/PDIS-09-16-1369-RE

Xiang N, Lawrence KS, Kloepper JW, et al (2017b) Biological control of *Heterodera glycines* by spore-forming plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) on soybean. **PLoS One** 12:e0181201. doi: 10.1371/journal.pone.0181201

Yan G, Baidoo R, Yan G, Baidoo R (2018) Current Research Status of *Heterodera glycines* Resistance and Its Implication on Soybean Breeding. **Engineering** 4:534–541. doi: 10.1016/j.eng.2018.07.009

Zhou Y, Wang Y, Zhu X, et al (2017) Management of the soybean cyst nematode *Heterodera glycines* with combinations of different rhizobacterial strains on soybean. **PLoS One** 12:e0182654. doi: 10.1371/journal.pone.0182654

CAPÍTULO 3 – Controle de *Meloidogyne incognita* e *M. javanica* e promoção de crescimento de soja com isolados de *Bacillus* spp. via tratamento de sementes e sulco de semeadura

RESUMO: A soja é umas das culturas mais plantadas no mundo, e o Brasil é o atual maior exportador dessa oleaginosa. Os nematoides de galha são um dos principais problemas fitossanitários da cultura. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes isolados de *B. subtilis*, *B. velezensis* (syn. *B. amyloliquefaciens*) e *B. methylotrophicus* aplicados via tratamento de sementes (TS) e sulco de semeadura (SS) na promoção de crescimento de soja e supressão de *Meloidogyne javanica* e *M. incognita*. Foram testados 19 isolados de *Bacillus subtilis*, *B. velezensis* (syn. *B. amyloliquefaciens*) e *B. methylotrophicus*, aplicados via TS e SS, mais testemunhas (com e sem nematoides) e padrões comerciais [*Bacillus subtilis* UFPEDA 764 (TS); *B. subtilis* UFPEDA 764 (SS); Abamectina (TS) e Cadusafós (SS)]. Foram avaliadas a emergência das plântulas, altura da planta, massa fresca e seca das partes aéreas (MFPA e MSPA), massa fresca das raízes (MFR), número de vagens, índice de clorofila, nematoide total, nematoide por grama de raízes e fator de reprodução. Devido a existência de uma estrutura de dependência contidas nas variáveis originais, realizou-se análise exploratória dos dados, via Análise de componentes principais (ACP). As variáveis independentes foram testadas via análise de Modelo linear geral (GLM). Pela ACP foi possível identificar a efeito negativo dos nematoides, *M. javanica* e *M. incognita*, no desenvolvimento da soja. Ao analisar a emergência das plantas, identificou-se que os isolados aplicados via SS apresentaram maior eficiência na emergência, comparado aos mesmos isolados aplicados via TS. Entretanto, os tratamentos aplicados via TS foram melhores para os índices de altura, MFPA, MSPA, MFR, vagens e clorofila, assim como foram superiores na supressão dos nematoides. Os isolados mais eficientes para promoção de crescimento de soja e supressão de *M. incognita* e *M. javanica* foram: ACB-01, ACB-08, ACB-11, ACB-15, ACB-17, ACB-21, ACB-22, ACB-AP3, ACB-09 e ACB-16.

Palavras chave: Bactérias promotoras de crescimento de plantas; nematoides de galha; controle biológico; método de aplicação.

***Bacillus* spp isolates by seed treatment and sowing furrow in the control of *Meloidogyne incognita* e *M. javanica* and soybean growth promotion**

ABSTRACT: Soy is one of the most planted crops in the world, and Brazil is the current largest exporter of this oilseed. Root-Knot nematodes are one of the main phytosanitary problems of the crop. Therefore, the objective of this work was to evaluate different isolates of *B. subtilis*, *B. velezensis* (syn. *B. amyloliquefaciens*) and *B. methylotrophicus* applied by seed treatment (TS) and sowing furrow (SS) in soybean growth promotion, and suppression of *Meloidogyne javanica* and *M. incognita*. Nineteen isolates of *Bacillus subtilis*, *B. velezensis* (syn. *B. amyloliquefaciens*) and *B. methylotrophicus* were tested on application by ST and SF, plus controls (with and without nematodes) and commercial standards [*Bacillus subtilis* UFPEDA 764 (ST); *B. subtilis* UFPEDA 764 (SF); Abamectin (ST) and Cadusafós (SF)]. Seed emergence, plant height, fresh and dry mass of aerial parts, fresh root mass, number of pods, total chlorophyll content, total nematode, nematode per gram of roots and reproductive factor were evaluated. Due to the existence of a dependency structure contained in the original variables, an exploratory analysis of the data was carried out, via Principal Component Analysis (PCA). The independent variables were tested through GLM analysis. From the ACP it was possible to identify the negative effect of nematodes, *M. javanica* and *M. incognita*, on the development of soybean. When analyzing the emergence of the plants, it was identified that the isolates applied by SS presented greater efficiency in the emergency, compared to the same isolates applied by TS. However, the treatments applied by TS were better for the indexes of height, MFPA, MSPA, MFR, pods and chlorophyll, as well as were superior in the suppression of the nematodes. The most efficient isolates for, soybean growth promotion, and suppression of *M. incognita* and *M. javanica* were: ACB-01, ACB-08, ACB-11, ACB-15, ACB-17, ACB-21, ACB-22, ACB-AP3, ACB-09 e ACB-16.

Key-words: plant growth-promoting bacteria; root-knot nematode; biological control; method of application.

1. INTRODUÇÃO

A soja é a leguminosa mais plantada no mundo, e o Brasil, maior exportador e segundo maior produtor mundial, desempenha grande papel na produção dessa comódite (Silva et al., 2017). O Brasil bateu o recorde de produção de soja na safra 2017/2018, atingindo a marca de 118 milhões de toneladas, um crescimento de 3,5%, com relação à safra anterior (CONAB, 2018). Entretanto, esse crescimento poderia ser ainda maior se houvesse melhor eficiência no manejo e controle de doenças importantes no sistema produtivo dessa cultura.

Dentre as doenças consideradas de importância para a cultura de soja, destacam-se as que são ocasionadas por nematoides, vermes microscópicos, habitantes do solo e parasitas do sistema radicular de plantas (Ferraz e Brown, 2016). Os principais nematoides causadores de danos na soja são, *Meloidogyne javanica*, *M. incognita*, *Heterodera glycines*, *Pratylenchus brachyurus* e *Rotylenchulus reniformes* (Ferraz e Brown, 2016; Allen et al., 2017). Os nematoides de galha (*Meloidogyne* spp.), merecem destaque, pois pertencem ao grupo de maior importância mundial, por serem altamente polípagos, além de se multiplicarem muito e apresentarem ciclo curto. Também podem causar danos às demais culturas utilizadas no sistema de rotação/sucessão de soja, tais como milho, feijão e algodão.

Dentre os métodos de controle de nematoides mais utilizados pelos produtores de soja, destacam-se o alqueive do solo, rotação de culturas, uso de cultivares resistentes e o tratamento das sementes por meio de nematicidas químicos e biológicos (Klepadlo et al., 2018). Entretanto, com a consolidação do sistema de plantio direto, o alqueive do solo tem caído em desuso. Já a rotação de culturas é limitada pela baixa disponibilidade de culturas não hospedeiras das espécies de *Meloidogyne*, assim como são poucas as cultivares de soja resistentes a esses nematoides (Ferraz et al., 2010). O tratamento de sementes é a técnica mais utilizada devido a sua praticidade, entretanto, o seu uso com moléculas químicas além de ter baixa persistência é desfavorável à biota do solo, diferentemente do uso de microrganismos como forma de tratamento das sementes (Soares et al., 2017).

Embora o ideal seja a utilização em conjunto das técnicas citadas anteriormente, o controle biológico de nematoides, por meio da microbiolização das sementes, apresenta uma série de vantagens por ser de fácil utilização, não causar riscos ao meio ambiente, contribuir para um solo mais supressivo, ter maior persistência no solo durante o ciclo da cultura e, ainda, poder promover o crescimento das plantas, como é o caso das espécies de *Bacillus* (Soares et al., 2017). Essas espécies de *Bacillus* pertencem a um importante grupo dentre as bactérias promotoras de crescimento de plantas, pois além da promoção de crescimento podem apresentar antagonismo a determinadas espécies de nematoides (Xiang et al., 2018). Entretanto, segundo (Araújo et al., 2002), a eficiência da sua utilização pode estar ligada à colonização e distribuição das bactérias na rizosfera.

Embora seja comprovada a eficiência dessas bactérias, ainda são poucos os produtos disponíveis no mercado visando o controle dos nematoides de galha e promoção de crescimento da soja, bem como não há estudos avaliando diferentes métodos de microbiolização das sementes. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes isolados de *B. subtilis*, *B. velezensis* (*syn. B. amyloliquefaciens*) e *B. methylotrophicus* aplicados via tratamento de sementes (TS) e sulco de semeadura (SS) na promoção de crescimento de soja e supressão de *M. javanica* e *M. incognita*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no período de fevereiro a abril de 2018, em condições de casa de vegetação, do LabNema (Laboratório de Nematologia), no Departamento de Fitossanidade, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV - UNESP), Câmpus de Jaboticabal, São Paulo, Brasil (21°14'27.8"S 48°17'20.1"W). A temperatura no período foi: máxima, 30,0 °C; mínima, 19,6 °C; média, 24,5 °C.

2.1. Delineamento experimental

Foram conduzidos dois experimentos, um para cada espécie de *Meloidogyne*, sendo avaliado o efeito de 19 isolados de *Bacillus* spp. no desenvolvimento a soja e no controle de *M. javanica* e *M. incognita*, sob dois métodos de aplicação [sulco de semeadura (SS) e tratamento de sementes (TS)], correspondendo a 38 tratamentos mais 6 testemunhas, sendo elas: padrão comercial biológico via TS e SS (*B. subtilis* UFPEDA 764); padrão comercial químico via TS (Abamectina); padrão comercial químico via SS (Cadusafós); tratamento controle inoculado com nematoide e sem tratamento com *Bacillus* spp. (T- *Meloidogyne* sp.); tratamento controle nematoide e sem *Bacillus* spp. (T- S. inoculação). Para visualização nos gráficos, os tratamentos foram identificados de 1 a 44 e expressos na Tabela 1. Os experimentos foram conduzidos de forma simultânea, porém separados, e em delineamento inteiramente casualizado com 6 repetições.

Tabela 1: Identificação e descrição dos tratamentos avaliados quanto a promoção de desenvolvimento de soja (cv. M5947 IPRO) e supressão de *Meloidogyne incognita* e *M. javanica*.

Nº	Tratamento	Composição	Dosagem	Concentração
1	ACB-01/ss ⁽¹⁾	<i>Bacillus subtilis</i>	400 mL/ha	1x10 ⁸ UFC/mL
2	ACB-01/ts ⁽²⁾	<i>B. subtilis</i>	4 mL/Kg de sementes	1x10 ⁸ UFC/mL
3	ACB-08/ss	<i>B. velezensis</i>	400 mL/ha	1x10 ⁸ UFC/mL
4	ACB-08/ts	<i>B. velezensis</i>	4 mL/Kg de sementes	1x10 ⁸ UFC/mL
5	ACB-09/ss	<i>B. velezensis</i>	400 mL/ha	1x10 ⁸ UFC/mL
6	ACB-09/ts	<i>B. velezensis</i>	4 mL/Kg de sementes	1x10 ⁸ UFC/mL
7	ACB-10/ss	<i>B. velezensis</i>	400 mL/ha	1x10 ⁸ UFC/mL
8	ACB-10/ts	<i>B. velezensis</i>	4 mL/Kg de sementes	1x10 ⁸ UFC/mL
9	ACB-11/ss	<i>B. subtilis</i>	400 mL/ha	1x10 ⁸ UFC/mL
10	ACB-11/ts	<i>B. subtilis</i>	4 mL/Kg de sementes	1x10 ⁸ UFC/mL
11	ACB-13/ss	<i>B. subtilis</i>	400 mL/ha	1x10 ⁸ UFC/mL
12	ACB-13/ts	<i>B. subtilis</i>	4 mL/Kg de sementes	1x10 ⁸ UFC/mL
13	ACB-15/ss	<i>B. subtilis</i>	400 mL/ha	1x10 ⁸ UFC/mL
14	ACB-15/ts	<i>B. subtilis</i>	4 mL/Kg de sementes	1x10 ⁸ UFC/mL
15	ACB-16/ss	<i>B. methylotrophicus</i>	400 mL/ha	1x10 ⁸ UFC/mL
16	ACB-16/ts	<i>B. methylotrophicus</i>	4 mL/Kg de sementes	1x10 ⁸ UFC/mL
17	ACB-17/ss	<i>B. subtilis</i>	400 mL/ha	1x10 ⁸ UFC/mL
18	ACB-17/ts	<i>B. subtilis</i>	4 mL/Kg de sementes	1x10 ⁸ UFC/mL
19	ACB-18/ss	<i>B. subtilis</i>	400 mL/ha	1x10 ⁸ UFC/mL
20	ACB-18/ts	<i>B. subtilis</i>	4 mL/Kg de sementes	1x10 ⁸ UFC/mL
21	ACB-19/ss	<i>B. velezensis</i>	400 mL/ha	1x10 ⁸ UFC/mL
22	ACB-19/ts	<i>B. velezensis</i>	4 mL/Kg de sementes	1x10 ⁸ UFC/mL
23	ACB-20/ss	<i>B. velezensis</i>	400 mL/ha	1x10 ⁸ UFC/mL
24	ACB-20/ts	<i>B. velezensis</i>	4 mL/Kg de sementes	1x10 ⁸ UFC/mL
25	ACB-21/ss	<i>B. subtilis</i>	400 mL/ha	1x10 ⁸ UFC/mL
26	ACB-21/ts	<i>B. subtilis</i>	4 mL/Kg de sementes	1x10 ⁸ UFC/mL
27	ACB-22/ss	<i>B. subtilis</i>	400 mL/ha	1x10 ⁸ UFC/mL
28	ACB-22/ts	<i>B. subtilis</i>	4 mL/Kg de sementes	1x10 ⁸ UFC/mL
29	ACB-23/ss	<i>B. velezensis</i>	400 mL/ha	1x10 ⁸ UFC/mL
30	ACB-23/ts	<i>B. velezensis</i>	4 mL/Kg de sementes	1x10 ⁸ UFC/mL
31	ACB-24/ss	<i>B. subtilis</i>	400 mL/ha	1x10 ⁸ UFC/mL
32	ACB-24/ts	<i>B. subtilis</i>	4 mL/Kg de sementes	1x10 ⁸ UFC/mL
33	ACB-25/ss	<i>B. subtilis</i>	400 mL/ha	1x10 ⁸ UFC/mL
34	ACB-25/ts	<i>B. subtilis</i>	4 mL/Kg de sementes	1x10 ⁸ UFC/mL
35	ACB-26/ss	<i>B. velezensis</i>	400 mL/ha	1x10 ⁸ UFC/mL
36	ACB-26/ts	<i>B. velezensis</i>	4 mL/Kg de sementes	1x10 ⁸ UFC/mL
37	ACB-AP3/ss	<i>B. subtilis</i>	400 mL/ha	1x10 ⁸ UFC/mL
38	ACB-AP3/ts	<i>B. subtilis</i>	4 mL/Kg de sementes	1x10 ⁸ UFC/mL
39	T- S. inoculação	-----	-----	-----
40	T- UFPEDA 764/ss	<i>B. subtilis</i>	4 mL/Kg de sementes	3x10 ⁹ UFC/mL
41	T- UFPEDA 764/ts	<i>B. subtilis</i>	400 mL/ha	3x10 ⁹ UFC/mL
42	T- Cadusafós	Cadusafós	4,0 L/ha	200,0 g/L
43	T- <i>Meloidogyne</i>	-----	-----	-----
44	T- Abamectina	Abamectina	5 mL/Kg de sementes	500,0 g/L

(1) "ss" inoculação de *Bacillus* spp. feita via sulco de semeadura; (2) "ts" inoculação de *Bacillus* spp. feita via tratamento de sementes.

2.2. Preparo do substrato e semeadura

Foram utilizados vasos de poliestireno expandido com capacidade para 1 L, preenchidos com substrato previamente autoclavado a 120 °C e 1 atm por 1 hora. O substrato foi composto por uma mistura de terra, areia e esterco bovino, na proporção 1:4:1. Após a autoclavagem, baseado na análise da terra, foram adicionados 0,7 g de adubo na formulação 4-20-20 (N-P-K) por vaso, correspondendo a 150 kg/ha dessa formulação, para manutenção nutricional da cultura.

Os vasos foram dispostos em bancada suspensa e irrigados conforme a demanda hídrica da cultura. Em cada vaso foram semeadas duas sementes de soja, 15 dias após a semeadura foi realizado o desbaste da plântula menos vigorosa, mantendo uma por vaso, e esta foi considerada uma unidade experimental. A cultivar de soja utilizada foi a M 5947 IPRO, ciclo precoce e suscetível a *Meloidogyne* spp.. As inoculações foram realizadas no ato da semeadura e serão detalhadas posteriormente.

2.3. Origem, preparo e inoculação de *Meloidogyne* spp.

A população original de *M. incognita* foi obtida de raízes de algodoeiro, naturalmente infectadas, no município de Barreiras – BA e a de *M. javanica* foi obtida de raízes de quiabeiro, naturalmente infectadas, no município de Piacatu – SP. As espécies de *Meloidogyne* foram identificadas com base nos caracteres morfológicos da região perineal de fêmeas (Netscher e Taylor, 1974), da região labial de machos (Eisenback e Hirschmann, 1981) e no fenótipo isoenzimático para esterase (Esbenshade e Triantaphyllou 1985). A população foi então mantida em plantas de tomate ‘Santa Cruz Kada’ e quiabeiro ‘Santa Cruz 47’ cultivados em casa de vegetação do LabNema até a véspera da instalação do experimento. Os nematoides foram extraídos das raízes no LabNema conforme as metodologias propostas por Hussey e Baker (1973) e Coolen e D’Herde (1972). A inoculação foi realizada no ato

da semeadura, sendo inoculados 5 mL da suspensão, contendo 3 mil ovos e J2, próximo de cada semente.

2.4. Origem, preparo e inoculação dos isolados de *Bacillus* spp.

Os 19 isolados de *Bacillus* spp. foram obtidos a partir de folhas e flores de *Citrus sinensis* e de solo de diferentes regiões do Estado de São Paulo (Souza 2018). Todos os isolados foram obtidos da coleção de microrganismos do Laboratório de Fitopatologia e Controle Biológico do Centro de Citricultura “Sylvio Moreira”/IAC.

Os isolados foram repicados em meio BDA, em placas de Petri e mantidos em estufa incubadora B.O.D. a 27 °C com fotoperíodo de 12 h durante 72 h para crescimento. Decorrido esse período, o meio foi raspado com o auxílio de uma alça de platina e o concentrado de células dissolvido em água autoclavada. Seguidamente, a suspensão foi calibrada com o auxílio de uma câmara de Neubauer até a obtenção da concentração final de 1×10^8 células por mL. As suspensões foram armazenadas a aproximadamente 8 °C por 24 h, até o momento da inoculação.

Os métodos de aplicação adotados nesse trabalho objetivaram a fiel reprodução do que é realizado pelo agricultor. Desta forma, as sementes tratadas via TS foram pesadas e acondicionadas em sacos plásticos, e então, inoculadas com a suspensão bacteriana conforme a dosagem especificada na Tabela 1, no período máximo de 2 h antes da semeadura. As sementes cujo o tratamento foi via SS, foram semeadas, inoculadas com nematoides e então tratadas com a suspensão bacteriana, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur estéril, conforme a dosagem especificada na Tabela 1.

2.5. Avaliações

Aos 15 dias após a semeadura foi realizada a avaliação de emergência, sendo considerada as plântulas completamente emergidas por tratamento. Já aos 70 dias

após a data da semeadura (soja em estádio R6), foram medidos o índice de clorofila (Clorofila), altura da planta (Altura), número de vagens por planta (Vagens), massa fresca das partes aéreas (MFPA), massa seca das partes aéreas (MSPA). Os índices de clorofila foram determinados com o auxílio de um clorofilômetro portátil ClorofiLOG Falker (modelo CFL 1030). Para tanto, foi calculada uma média a partir de 3 leituras realizadas por planta, sendo uma leitura por trifólio, a partir do primeiro trifólio totalmente desenvolvido.

As raízes foram separadas das partes aéreas e armazenadas em câmara fria (8-10 °C) até o momento da extração dos nematoides. Anteriormente à extração, as raízes foram lavadas em água parada, retirando-se o excesso de solo, para então ser avaliada a massa fresca das raízes (MFR). A água proveniente da lavagem das raízes foi vertida em peneira de 20 sobre 500 mesh, e o material retido foi recuperado e somado as respectivas raízes no momento da extração. A extração dos nematoides das raízes foi realizada conforme a metodologia supracitada, e a população final dos nematoides estimada em câmara de Peters com auxílio de um microscópio fotônico, obtendo-se a quantidade total de nematoides nas raízes por planta (NT); NT por grama de raízes (N/g.raízes); fator de reprodução (FR), esse último obtido pela relação NT e a população inicial inoculada (3.000).

2.6. Análise dos dados

Devido a existência de uma estrutura de dependência contida no conjunto de variáveis originais, realizou-se análise exploratória dos dados pelo software STATISTICA, versão 7.0 (Statistica, 2004), sendo as variáveis previamente padronizadas (distribuição normal, média = 0 e variância = 1). Nesta análise considerou-se às médias dos tratamentos e as variáveis: Clorofila; Altura de plantas (cm); Número de vagens; MFPA (g); MSPA (g); MFR (g); NT; N/g.raízes.

A estrutura multivariada dos resultados foi avaliada pela análise de componentes principais (ACP) para condensar a quantidade de informações relevantes contidas no conjunto de dados original em um menor número de dimensões (componentes principais) resultantes de combinações lineares das variáveis originais

geradas a partir dos maiores autovalores da matriz de covariância (Hair et al., 2005). Na ACP, considerou-se como relevantes os autovalores maiores que 1, de acordo com o critério de (Kaiser, 1958).

As cargas fatoriais das variáveis são usados para interpretar seu significado nos componentes principais, usando o sinal e o tamanho relativo dos coeficientes como uma indicação do peso a ser colocado em cada variável (Hair et al., 2005). Foram consideradas relevantes as cargas com valores em módulo superior a 0,5.

A faixa da elipse destacada nos eixos X e Y, dos biplots, compreende valores aproximados de -2 a 2 e isso está de acordo com Dallastra et al. (2014). Os tratamentos dentro da elipse, não foram considerados relevantes, assim sendo, os que foram localizados na região externa à elipse foram considerados, justamente por possuírem características altamente específicas (Dallastra et al., 2014).

As variáveis, emergência das plântulas de soja e fator de reprodução do nematoide foram testadas via Modelo Linear Geral (GLM) usado como análise de variância (ANOVA).

3. RESULTADOS

3.1. Emergência das plântulas de soja

Não houve diferença entre os isolados de *Bacillus* spp. quanto à emergência das plântulas de soja, tanto para as infectadas com *M. javanica* ($P=0,5615$) quanto para as infectadas com *M. incognita* ($P=0,2482$). Entretanto, quando foram avaliados os métodos de aplicação (SS e TS), observou-se que os *Bacillus* spp. aplicados via SS favoreceram a emergência das plântulas em 22,50% e 18,75% inoculadas com *M. incognita* e *M. javanica* respectivamente, comparadas às testemunhas não tratadas ($P<0,001$). O método de aplicação dos *Bacillus* spp. via TS, comparadas às testemunhas não tratadas, favoreceu a emergência em 2,50% e 5,42% para *M. incognita* e *M. javanica* respectivamente ($P<0,001$). As espécies de *M. incognita* e *M. javanica* prejudicaram em 16,7% e 33,3% ($P<0,001$), respectivamente, a emergência

das plântulas de soja quando não foram tratadas com *Bacillus* spp., em comparação à testemunha não inoculada com nematoides (T- S. inoculação).

3.2. Fator de Reprodução

O fator de reprodução nos tratamentos inoculados com *M. javanica* variou de 0,06 (T- Cadusafós) a 5,0 (T- *B. subtilis* ss), tendo a testemunha (T- *M. javanica*) multiplicado 2,6 vezes a população inicial. Para *M. incognita*, o fator de reprodução variou entre 0,16 (ACB-AP3/ts) e 8,14 (ACB-11/ss), enquanto a testemunha (T- *M. incognita*) multiplicou 6,42 vezes a população inicial.

3.3. Análise de componentes principais para tratamentos inoculados com *Meloidogyne javanica*

Pela ACP, foram encontrados três componentes principais (CP1, CP2, CP3), que somados, retiveram 78,36% da variação total contida no conjunto das variáveis originais (Tabela 2). Analisando o CP1, observa-se que houve correlação entre todas as variáveis, exceto MFR. As variáveis relevantes relacionadas ao crescimento da planta, são elas, clorofila, altura da planta, número de vagens, MFPA e MSPA foram diretamente correlacionadas, porém, agiram de forma oposta às variáveis nematológicas (nematóide total e nematóide por grama de raízes), ou seja, a medida que houve aumento da população de *M. javanica* nos tratamentos, menores foram os índices de crescimento da planta. No CP2, observa-se que apenas a variável MFR foi relevante, atuando de forma independente. No CP3, apenas as variáveis nematológicas foram relevantes, sendo ambas diretamente correlacionadas.

Tabela 2: Correlação entre as variáveis analisadas em soja (cv. M5947 IPRO) tratada com *Bacillus* spp. e inoculados com *Meloidogyne javanica*, nos componentes principais 1, 2 e 3 (CP1, CP2 e CP3).

Variáveis	Escore		
	CP1	CP2	CP3
Clorofila	0,75	0,46	-0,02
Altura da planta	0,60	-0,24	0,21
Número de vagens	0,70	0,02	0,26
Massa fresca das partes aéreas	0,84	-0,18	0,28
Massa seca das partes aéreas	0,79	-0,07	0,44
Massa fresca das raízes	-0,08	-0,94	-0,01
Nematoide total	-0,71	-0,17	0,65
Nematoide por grama de raízes	-0,61	0,35	0,69
Variância explicada (%)	45,51	16,86	15,99
Autovalores	3,64	1,35	1,28

As cargas expressivas nos componentes principais (CP) estão em negrito (Carga $\geq |0,5|$).

Pelo biplot da Figura 1, foi possível classificar os tratamentos frente às variáveis, para tanto, os tratamentos dispostos no exterior da elipse apresentaram características específicas, portanto, foram significativos ($P < 0,05$). Pelo CP1, observou-se que os tratamentos 2 (ACB-01/ts), 4 (ACB-08/ts), 10 (ACB-11/ts), 14 (ACB-15/ts), 18 (ACB-17/ts), 26 (ACB-21/ts), 28 (ACB-22/ts), 30 (ACB-23/ts), 38 (ACB-AP3/ts) e 39 (T- S. inoculação) apresentaram os maiores índices de crescimento de planta, correspondendo às variáveis clorofila, vagens, MSPA, MFPA e altura, da mesma forma, esses tratamentos foram os que menos multiplicaram *M. javanica*.

Os tratamentos 5 (ACB-09/ss), 7 (ACB-10/ss), 13 (ACB-15/ss), 15 (ACB-16/ss), 23 (ACB-20/ss), 31 (ACB-24/ss), 35 (ACB-26/ss), 40 (T- UFPEDA 764/ss) e 43 (T- NCS), foram os que mais multiplicaram os nematoides e, também, os que apresentaram menores índices de crescimento de planta. Considerando o CP2, observa-se que os tratamentos 4 (ACB-08/ts), 5 (ACB-09/ss), 7 (ACB-10/ss), 14 (ACB-15/ts), 15 (ACB-16/ss), 28 (ACB-22/ts), 30 (ACB-23/ts), 38 (ACB-AP3/ts), 40 (T- UFPEDA 764/ss) e 43 (T- NCS) apresentaram os menores índices de MFR, quando comparados aos tratamentos 2 (ACB-01/ts), 10 (ACB-11/ts), 13 (ACB-15/ss), 18 (ACB-17/ts), 23 (ACB-20/ss), 26 (ACB-21/ts), 31 (ACB-24/ss), 35 (ACB-26/ss), 39 (T- S. inoculação) e 41 (T- UFPEDA 764/ts).

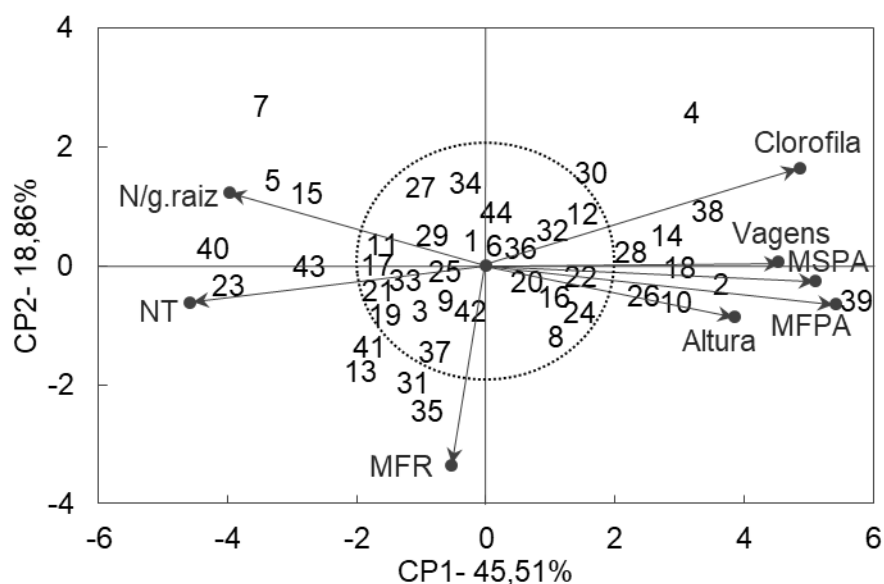


Figura 1. Biplot da Análise de Componentes Principais (CP1 x CP2) das variáveis, nematoide por grama de raízes (N/g.raízes), nematoide total (NT), clorofila, altura de planta, número de vagens, massa seca das partes aéreas (MSPA), massa fresca das partes aéreas (MFPA), massa fresca das raízes (MFR) e dos tratamentos à base de *Bacillus* spp. (números: 1 a 38), testemunha com e sem inoculação (números: 43 e 39, respectivamente) e padrões comerciais (números: 40, 41, 42 e 44), em soja (M 5947 IPRO) parasitada por *Meloidogyne javanica*. Tratamentos dentro da elipse não foram relevantes ($P > 0,05$).

No Biplot da Figura 2, observa-se no CP1, que os tratamentos 5 (ACB-09/ss), 7 (ACB-10/ss), 11 (ACB-13/ss), 15 (ACB-16/ss), 17 (ACB-17/ss), 23 (ACB-20/ss), 33 (ACB-25/ss), 40 (T- UFPEDA 764/ss), 41 (T- UFPEDA 764/ts), 42 (T- Cadusafós) e 43 (T- NCS) foram os que mais multiplicaram *M. javanica* e também, os que apresentaram os menores índices de crescimento de planta. Por outro lado, os tratamentos 2 (ACB-01/ts), 4 (ACB-08/ts), 10 (ACB-11/ts), 14 (ACB-15/ts), 18 (ACB-17/ts), 26 (ACB-21/ts), 28 (ACB-22/ts), 38 (ACB-AP3/ts) e 39 (T- S. inoculação), foram os que apresentaram os maiores índices de crescimento de planta e também os que menos multiplicaram os nematoides.

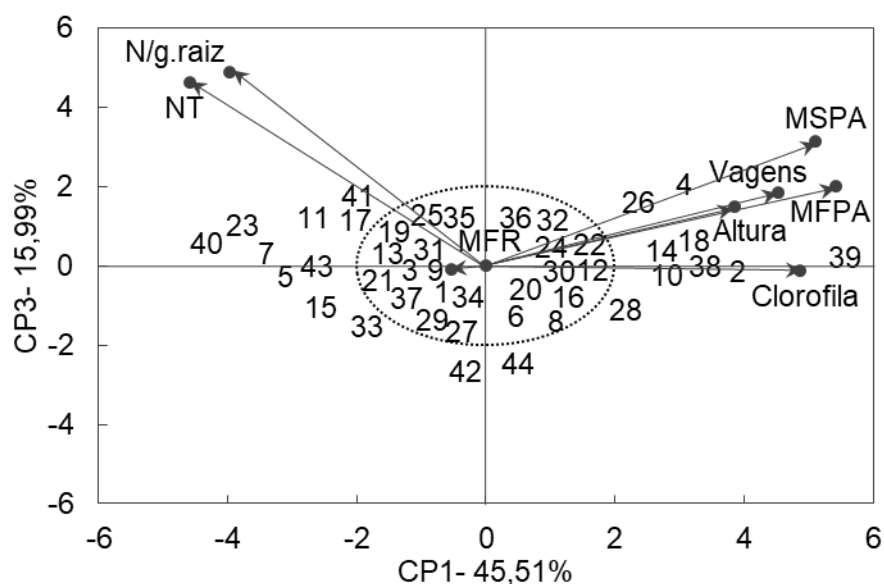


Figura 2. Biplot da Análise de Componentes Principais (CP1 x CP3) das variáveis, nematoide por grama de raízes (N/g.raízes), nematoide total (NT), clorofila, altura de planta, número de vagens, massa seca das partes aéreas (MSPA), massa fresca das partes aéreas (MFPA), massa fresca das raízes (MFR) e dos tratamentos à base de *Bacillus* spp. (números: 1 a 38), testemunha com e sem inoculação (números: 43 e 39, respectivamente) e padrões comerciais (números: 40, 41, 42 e 44), em soja (M5947 IPRO) parasitada por *Meloidogyne javanica*. Tratamentos dentro da elipse não foram relevantes ($P > 0,05$).

Pelo CP3, observa-se que dentre os tratamentos com menores índices de crescimento de planta, os tratamentos 7 (ACB-10/ss), 11 (ACB-13/ss), 17 (ACB-17/ss), 23 (ACB-20/ss), 40 (T- UFPEDA 764/ss) e 41 (T- UFPEDA 764/ts) foram os que mais multiplicaram os nematoides e, de forma oposta, os tratamentos 2 (ACB-01/ts), 10 (ACB-11/ts), 38 (ACB-AP3/ts) e 44 (T- Abamectina) foram os que menos multiplicaram os nematoides dentro dos tratamentos com maiores índices de crescimento de planta.

3.4. Análise de componentes principais para tratamentos inoculados com *Meloidogyne incognita*

A ACP para os tratamentos com *M. incognita*, também resultou em três componentes principais (CP1, CP2 e CP3), que somados, explicam 87,67% da variação total contida no conjunto das variáveis originais. Sozinho o CP1 deteve 51,57% das informações, onde as variáveis clorofila, número de vagens, MFPA e MSPA foram inversamente correlacionadas com as variáveis nematoide total e nematoide por grama de raízes. Pelo CP2, observou-se uma direta correlação entre as variáveis altura de plantas, MFR e nematoide por gramas de raízes. Já no CP3, observou-se uma correlação inversa entre as variáveis altura de plantas e nematoide total.

Tabela 3: Correlação entre as variáveis analisadas em soja (cv. M5947 IPRO) tratada com *Bacillus* spp. e inoculados com *Meloidogyne incognita*, nos componentes principais 1, 2 e 3 (CP1, CP2 e CP3).

Variáveis	Escore		
	CP1	CP2	CP3
Clorofila	0,87	-0,11	0,15
Altura da planta	-0,17	0,55	-0,63
Número de vagens	0,90	0,30	0,16
Massa fresca das partes aéreas	0,86	0,45	0,07
Massa seca das partes aéreas	0,83	0,49	0,10
Massa fresca das raízes	-0,36	0,59	-0,37
Nematoide total	-0,69	0,46	0,52
Nematoide por grama de raízes	-0,69	0,50	0,44
Variância explicada (%)	51,57	20,67	13,43
Autovalores	4,13	1,65	1,07

As cargas expressivas nos componentes principais (CP) estão em negrito (Carga $\geq |0,5|$).

No Biplot da Figura 3, analisando o CP1, observa-se que os tratamentos que menos multiplicaram os nematoides foram 2 (ACB-01/ts), 4 (ACB-08/ts), 6 (ACB-09/ts), 10 (ACB-11/ts), 14 (ACB-15/ts), 16 (ACB-16/ts), 22 (ACB-19/ts), 26 (ACB-21/ts), 28 (ACB-22/ts), 38 (ACB-AP3/ts) e 39 (T- S. inoculação), e esses também

apresentaram os maiores índices de MSPA, MFPA, vagens e clorofila. Em contrapartida, os tratamentos 1 (ACB-01/ss), 7 (ACB-10/ss), 11 (ACB-13/ss), 13 (ACB-15/ss), 15 (ACB-16/ss), 17 (ACB-17/ss), 21 (ACB-19/ss), 27 (ACB-22/ss), 29 (ACB-23/ss), 31 (ACB-24/ss), 33 (ACB-25/ss), 37 (ACB-AP3/ss), 40 (T- UFPEDA 764/ss) e 41 (T- UFPEDA 764/ts), foram os que mais multiplicaram *M. incognita* e apresentaram menores valores para MSPA, MFPA, vagens e clorofila. Pelo CP2, observa-se que os tratamentos 1 (ACB-01/ss), 7 (ACB-10/ss), 17 (ACB-17/ss), 21 (ACB-19/ss), 27 (ACB-22/ss), 29 (ACB-23/ss), 31 (ACB-24/ss), 37 (ACB-AP3/ss) e 40 (T- UFPEDA 764/ss) apresentaram altos índices de altura, MFR e NT.

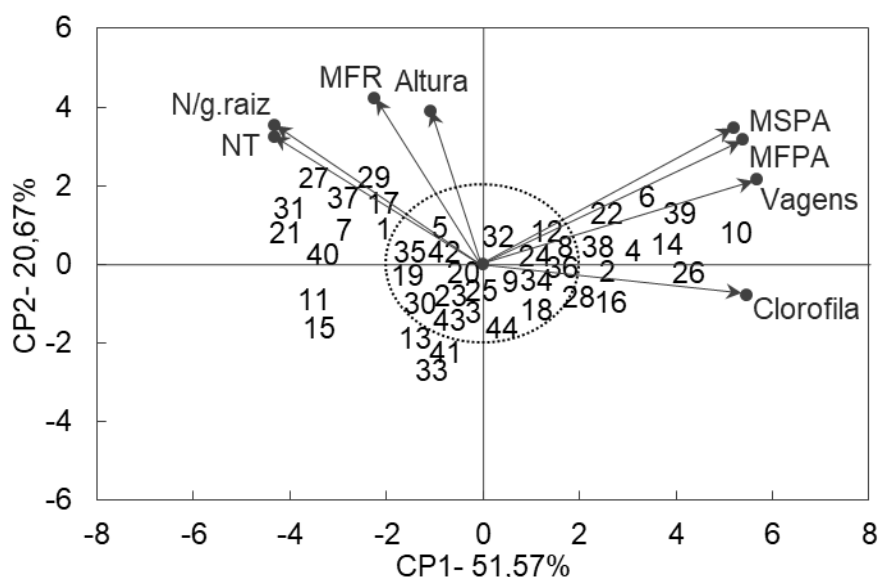


Figura 3. Biplot da Análise de Componentes Principais (CP1 x CP2) das variáveis, nematoide por grama de raízes (N/g.raízes), nematoide total (NT), clorofila, altura de planta, número de vagens, massa seca das partes aéreas (MSPA), massa fresca das partes aéreas (MFPA), massa fresca das raízes (MFR) e dos tratamentos à base de *Bacillus* spp. (números: 1 a 38), testemunha com e sem inoculação (números: 43 e 39, respectivamente) e padrões comerciais (números: 40, 41, 42 e 44), em soja (M5947 IPRO) parasitada por *Meloidogyne incognita*. Tratamentos dentro da elipse não foram relevantes ($P > 0,05$).

No Biplot CP1 e CP3 da Figura 4, observa-se ao analisar o CP1, que os tratamentos, 2 (ACB-01/ts), 4 (ACB-08/ts), 6 (ACB-09/ts), 10 (ACB-11/ts), 14 (ACB-15/ts), 16 (ACB-16/ts), 26 (ACB-21/ts), 28 (ACB-22/ts), 38 (ACB-AP3/ts) e 39 (T- S.

inoculação), apresentaram os maiores índices de vagens, clorofila MSPA e MFPA e menor multiplicação de nematoides, enquanto que os tratamentos 1 (ACB-01/ss), 5 (ACB-09/ss), 7 (ACB-10/ss), 11 (ACB-13/ss), 15 (ACB-16/ss), 21 (ACB-19/ss), 27 (ACB-22/ss), 31 (ACB-24/ss), 37 (ACB-AP3/ss), 40 (T- UFPEDA 764/ss) e 43 (T- NCS) foram os quem mais multiplicaram *M. incognita* e também apresentaram os piores índices de vagens, clorofila, MSPA e MFPA. Analisando o CP3, observa-se que dentre os tratamentos que mais multiplicaram nematoides, os tratamentos 5 (ACB-09/ss), 7 (ACB-10/ss), 11 (ACB-13/ss), 15 (ACB-16/ss) e 27 (ACB-22/ss) foram os que apresentaram maiores índices de altura.

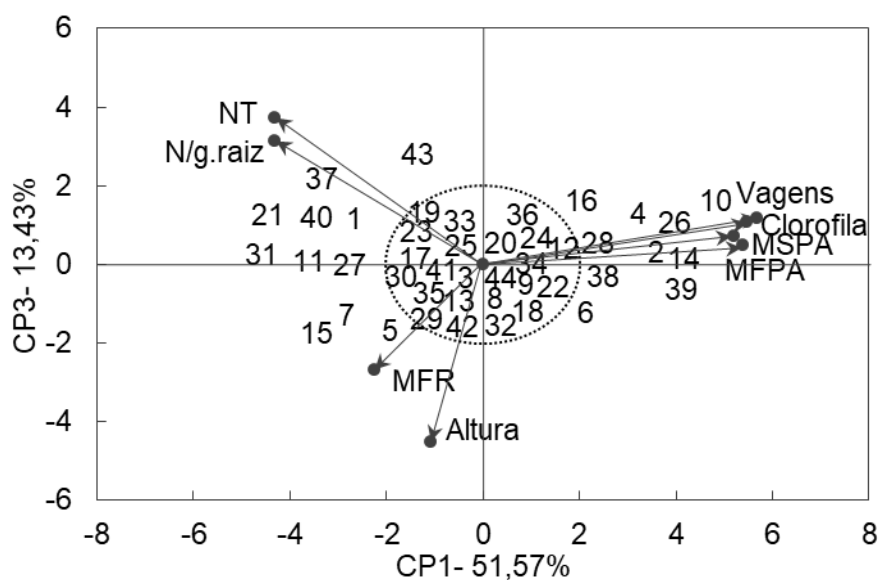


Figura 4. Biplot da Análise de Componentes Principais (CP1 x CP3) das variáveis, nematoide por grama de raízes (N/g.raízes), nematoide total (NT), clorofila, altura de planta, número de vagens, massa seca das partes aéreas (MSPA), massa fresca das partes aéreas (MFPA), massa fresca das raízes (MFR) e dos tratamentos à base de *Bacillus* spp. (números: 1 a 38), testemunha com e sem inoculação (números: 43 e 39, respectivamente) e padrões comerciais (números: 40, 41, 42 e 44), em soja (M5947 IPRO) parasitada por *Meloidogyne incognita*. Tratamentos dentro da elipse não foram relevantes ($P > 0,05$).

4. DISCUSSÃO

4.1. Emergência das plântulas de soja

O período de tempo entre o contato inicial das bactérias, pela inoculação, até o momento da avaliação de emergência, pode ser insuficiente para que cada isolado expresse suas características e, portanto, se diferenciem quanto ao desempenho frente à emergência das plântulas de soja, em ambas as espécies de *Meloidogyne*. É importante destacar que mesmo não havendo diferença entre os isolados testados, o fato de as sementes serem tratadas com algum isolado de *Bacillus* spp. favoreceu o índice de emergência da soja em situações onde houve a presença de nematoides de galha. Esses resultados corroboram os de Dawar et al. (2008), onde observaram que diferentes espécies de *Bacillus* favoreceram a germinação de sementes de feijão infectadas com *M. javanica*, bem como aos de Zhou et al. (2017), que também observaram maior germinação das sementes de soja quando tratadas com formulações de *Bacillus* spp., sob infestação de *Heterodera glycines*.

A diferença observada entre as formas de aplicação SS e TS, evidenciam que o método de aplicação é de extrema importância logo nas fases iniciais de desenvolvimento da planta. No entanto, essa maior eficiência do método via SS, pode ser devido à maior umidade promovida pelo método de aplicação, que de acordo com Costa et al. (2017) favorece a germinação e vigor das sementes. Os danos na emergência das plântulas ocasionados por *M. incognita* e *M. javanica* de 16,7% e 33,3%, respectivamente, sugerem maior impacto desses nematoides, logo nas fases iniciais de desenvolvimento da cultura, e ainda que o dano pode variar de acordo com a espécie de *Meloidogyne*. Barbosa et al. (2009), observaram, que mesmo apresentando menor FR, *M. javanica* foi mais agressivo à cana de açúcar do que *M. incognita*.

4.2. Fator de reprodução

O fator de reprodução superior a 1 obtido nas testemunhas não tratadas (T - *M. javanica* e T- *M. incognita*), indicam a viabilidade do inóculo e das condições ambientais favoráveis para a condução do experimento. Entre as duas espécies de nematoides, observou-se que o *M. incognita* apresentou maior FR quando comparado ao *M. javanica*, indicando um maior potencial biótico dessa espécie, nas condições estudadas. Para tanto, mesmo com menor multiplicação, o *M. javanica* foi mais danoso do que *M. incognita*, como visto na avaliação de emergência de plântulas. Essas características, embora possam variar de acordo com a raça e a origem da população utilizada (Tihohod e Ferraz 1986), corroboram com informações obtidas por Barbosa et al. (2009).

4.3. Análise de componentes principais para tratamentos inoculados com *Meloidogyne javanica*

Pela ACP, foi possível identificar o poder dos nematoides na redução dos parâmetros de crescimento de planta. Esse efeito foi visível principalmente no CP1, que sozinho, deteve 45,51% da variância total contidas no conjunto de variáveis originais. Nesse componente, observou-se que à medida que houve aumento da população dos nematoides, menores foram os índices de clorofila, altura, vagens, MFPA e MSPA. Da mesma forma, nos tratamentos onde houveram maiores índices de crescimento da planta, houve também menor multiplicação dos nematoides, podendo esse efeito estar ligado diretamente à eficiência dos *Bacillus* spp. utilizados. Isso também é explicado no CP3, onde que as variáveis nematológicas atuaram de forma independente, não sendo observado interferência das mesmas no processo de crescimento da planta. Isso demonstra que mesmo havendo multiplicação dos nematoides, houveram tratamentos que impediram suas ações ou compensaram seus danos no desenvolvimento da planta, indicando uma indução de tolerância. Trabalhos

anteriores já relataram a ação de *Bacillus* como indutores de resistência a *Meloidogyne* em diferentes culturas (Kloepper et al., 2004; Hu et al., 2018).

Levando em consideração os três componentes principais, observou-se que os isolados ACB-01, ACB-08, ACB-11, ACB-15, ACB-17, ACB-21, ACB-22 e ACB-AP3, foram os que se destacaram frente à supressão de *M. javanica* e à promoção de crescimento das plantas de soja. Segundo Dallemole-Giaretta et al. (2009), assim que se inicia o processo de germinação das sementes e a emissão da radícula, inicia-se a liberação de exsudatos radiculares, que são utilizados como fonte nutricional das rizobactérias. Os exsudatos radiculares são responsáveis pela atração do nematoide às raízes (Araújo et al., 2002). Portanto, o fato de as bactérias se alimentarem dos exsudatos, pode prejudicar a mobilidade do juvenil infectante até as raízes. Ainda, a falta de reconhecimento quimiotático pelos nematoides, faz com que o mesmo permaneça em movimentação na busca por alimento, que em falta, resultará na sua morte (Araújo e Marchesi, 2009). Araújo et al. (2002), observaram que a presença de *B. subtilis* afetou a orientação de *H. glycines* reduzindo a migração em direção a raiz de soja.

4.4. Análise de componentes principais para tratamentos inoculados com *Meloidogyne incognita*

Assim como no experimento para *M. javanica*, também houve uma inversa correlação nos tratamentos inoculados com *M. incognita*, entre as variáveis relacionadas à multiplicação dos nematoides (nematoide total e nematoide por grama de raízes) e as de crescimento da planta (clorofila, número de vagens, MFPA e MSPA), no CP1, e entre as variáveis nematoide total e altura de plantas no CP3. Esses resultados corroboram os de Araujo et al. (2012), ao relatarem incremento em MSPA e redução da população de *M. javanica* em soja, cujas sementes foram tratadas com *Bacillus*. Esses resultados ressaltam ainda, o dano ocasionado por *M. incognita* à soja nos tratamentos testados, ou seja, quanto maior foi a população do nematoide, menos a planta se desenvolveu. A correlação entre as variáveis altura de planta e MFR, observada no CP2, ocorre pois, à medida que o sistema radicular aumenta, maior a

capacidade de absorção de água e nutrientes, resultando em um maior crescimento vegetal e certamente maior produtividade (Albrecht et al., 2009).

As variáveis altura de planta e MFR, também foram diretamente correlacionadas com a variável nematoide por grama de raízes, no CP2, contrariando a explicação dada anteriormente. Contudo, essa correlação pode ser explicada pelo fato de o *M. incognita* ter as raízes como estrutura de sobrevivência, dessa forma, à medida que se tem aumento do sistema radicular da planta, conseqüentemente, há também mais alimento disponível para os nematoides, reduzindo a intercompetição e favorecendo a multiplicação do mesmo. Essa situação favorece o aumento populacional do nematoide, sobretudo nos tratamentos onde não houve eficiência de controle.

Os isolados que se destacaram, levando em consideração os três componentes principais, quanto a supressão de *M. incognita* e promoção de crescimento da soja, foram: ACB-01, ACB-08, ACB-09, ACB-11, ACB-15, ACB-16, ACB-21, ACB-22, ACB-AP3. Todos os melhores isolados, selecionados no experimento com *M. javanica*, se repetiram como os mais eficientes também para *M. incognita*, exceto os isolados ACB-17, ACB-09 e ACB-16, que foram bons apenas para uma espécie de nematoide. É de grande importância o fato de os isolados apresentarem eficiência semelhante para as duas espécies de *Meloidogyne*, visto que é comum haver lavouras onde ocorrem diferentes espécies de nematoides, possibilitando ao agricultor utilizar um único produto para o controle de mais de uma espécie.

Bactérias do gênero *Bacillus* são um importante grupo dentro das rizobactérias promotoras de crescimento de plantas. Dentre os fatores ligados à promoção de crescimento de planta, tem-se os fatores considerados diretos, como a produção de fitormônios, solubilização de fósforo, fixação de nitrogênio, produção de sideróforos e amônia, e também os indiretos, que estão ligados ao controle de nematoides, tais como produção de enzimas líticas, indução de resistência sistêmica, antibiose e redução de estresse oxidativo (Liu et al., 2016; Xiang et al., 2017a, 2018).

Outro fato interessante é que todos os isolados foram melhores quando aplicados via tratamento de sementes (TS), evidenciando que essa forma de

aplicação é a mais indicada, dentre as disponíveis para o produtor de soja, para inoculação desses microrganismos na semente. Araújo et al. (2002) afirmam que a eficiência no processo de colonização e distribuição das bactérias na rizosfera está ligada à forma de inoculação das mesmas, refletindo diretamente na eficiência no controle dos nematoides.

A inoculação via TS, pode permitir uma maior concentração de células bacterianas no tegumento da semente, aumentando assim, a eficiência da microbiolização. Na inoculação via SS, a possibilidade de perda de parte da suspensão para o substrato é maior, dificultando uma pré-imunização logo da radícula. Mhatre et al. (2019), ainda ressaltam que o sucesso da utilização de bactérias promotoras de crescimento visando biocontrole está diretamente relacionado à completa colonização da rizosfera. Assim, é importante destacar que a eficiência de um bioproduto não é definida apenas pelo potencial do organismo utilizado, mas também, no método adotado pelo produtor no momento da aplicação.

5. CONCLUSÕES

- A aplicação de *Bacillus* spp., via sulco de semeadura favorece a emergência das plântulas de soja infectadas com *Meloidogyne javanica* e *M. incognita*, quando comparado à aplicação via tratamento de sementes.
- A aplicação via tratamento de sementes é melhor para promoção de crescimento e supressão de *M. javanica* e *M. incognita*, em soja.
- Os isolados mais eficientes para promoção de crescimento de soja e supressão de *M. javanica* são: ACB-01, ACB-11, ACB-15, ACB-17, ACB-21 e ACB-AP3 (*B. subtilis*), ACB-08, ACB-22 (*B. velezensis*), e para *M. incognita*: ACB-01, ACB-11, ACB-15, ACB-21 e ACB-AP3 (*B. subtilis*), ACB-22, ACB-08, ACB-09 (*B. velezensis*) e ACB-16 (*B. methylotrophicus*).

6. AGRADECIMENTOS

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

7. REFERÊNCIAS

Albrecht LP, Braccini A de L, Ávila MR, et al (2009) Application of Bioregulator and Production of the Cotton Plant and Quality of Fiber. **Scientia Agraria** 10:191–198. doi: <http://dx.doi.org/10.5380/rsa.v10i3.14474>

Allen TW, Bradley CA, Sisson AJ, Byamukama E, Chilvers MI, Coker CM, Collins AA, Damicone JP, Dorrance AE, Dufault NS, Esker PD, Faske TR, Giesler LJ, Grybauskas AP, Hershman DE, Hollier CA, Isakeit T, Jardine DJ, Kelly HM, Kemerait RC, Kleczewski NM, Koenning SR, Kurle JE, Malvick DK, Markell SG, Mehl HL, Mueller DS, Mueller JD, Mulrooney RP, Nelson BD, Newman MA, Osborne L, Overstreet C, Padgett GB, Phipps PM, Price PP, Sikora EJ, Smith DL, Spurlock TN, Tande CA, Tenuta AU, Wise KA, Wrather, JA (2017) Soybean Yield Loss Estimates Due to Diseases in the United States and Ontario, Canada, from 2010 to 2014. **Plant Health Progress** 18:19–27. doi: 10.1094/PHP-RS-16-0066

Araujo FF De, Bragante RJ, Bragante CE (2012) Controle genético, químico e biológico de meloidoginose na cultura da soja. **Pesquisa Agropecuária Tropical** 42:220–224. doi: 10.1590/S1983-40632012000200013

Araújo FF de, Silva JFV, Araújo ASF de (2002) Influência de *Bacillus subtilis* na Eclosão, Orientação e Infecção de *Heterodera glycines* em Soja. **Ciência Rural** 32:197–203. doi: 10.1590/S0103-84782002000200003

Araújo FF de, Marchesi GVP (2009) Uso de *Bacillus subtilis* no controle da meloidoginose e na promoção do crescimento dotomateiro. **Ciência Rural** 39:5.

Barbosa BFF, Santos JM, Soares PL, Barbosa JC (2009) Avaliação Comparativa da Agressividade de *Meloidogyne javanica* e *M. incognita* à Variedade SP 911049 de Cana-de-açúcar. **Nematologia Brasileira** 33:243–247.

CONAB (2018) Acompanhamento da safra brasileira: grãos. **Cia Nacional Abastecimento 5-SAFRA:145**. ISSN 2318-6852.

Coolen WA, D'Herde CJ (1972) A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue. **Agricultural Research Administration** 77.

Costa DS da, Rocha CR de M, Yagushi JT, et al (2017) Hidratação controlada de sementes de soja: potencial fisiológico e emergência em solo com *Rhizoctonia solani*. **Journal of Neotropical Agriculture** 4:27–34.

Dallastra A, Unêda-Trevisoli SH, Ferraudo AS, Di Mauro AO (2014) Multivariate approach in the selection of superior soybean progeny which carry the RR gene. **Revista Ciência Agronômica** 45:588–597. doi: 10.1590/S1806-66902014000300021

Dallemole-Giaretta R, Freitas LG, Zooca RJF, et al (2009) Associação de *Pochonia chlamydosporia*, *Bacillus cereus* e Fibra de Coco no Controle de *Meloidogyne javanica* em Tomateiro. **Nematologia Brasileira** 34:2010.

Dawar S, Tariq M, Zaki MJ (2008) APPLICATION OF BACILLUS SPECIES IN CONTROL OF MELOIDOGYNE JAVANICA (TREUB) CHITWOOD ON COWPEA AND MASH BEAN. **Pakistan Journal of Botany** 40:439–444.

Esbenshade PR, Triantaphyllou AC (1985) Use of enzyme phenotypes for identification of *Meloidogyne* species. 1.

Ferraz LCCB, Brown DJF (2016) Nematologia de plantas: fundamentos e importância, Manaus: Norma Edit. p. 251.

Ferraz S, Freitas LD, Lopes EA, Dias-Arieira CR (2010) Manejo sustentável de fitonematoides. Viçosa: UFV, p. 306.

Hair J, Anderson R, Tatham R, Black W (2005) Análise multivariada de dados. Porto Alegre (RS): Bookman. p. 689.

Hu H, Wang C, Li X, et al (2018) RNA-Seq identification of candidate defense genes targeted by endophytic *Bacillus cereus* -mediated induced systemic resistance against *Meloidogyne incognita* in tomato. **Pest Management Science**, 74:2793–2805. doi: 10.1002/ps.5066

Hussey SR, Baker KR (1973) A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. **Plant Disease Reporter**, 57:1025–1028.

Kaiser HF (1958) The varimax criterion for analytic rotation in factor analysis. **Psychometrika** 23:187–200. doi: 10.1007/BF02289233

Klepadlo M, Meinhardt CG, Vuong TD, et al (2018) Evaluation of Soybean Germplasm for Resistance to Multiple Nematode Species. **Crop Science** 58:2511. doi: 10.2135/cropsci2018.05.0327

Kloepper JW, Ryu C-M, Zhang S (2004) Induced Systemic Resistance and Promotion of Plant Growth by *Bacillus* spp. **Phytopathology** 94:1259–1266. doi: 10.1094/PHYTO.2004.94.11.1259

Liu K, Garrett C, Fadamiro H, Kloepper J (2016) Induction of systemic resistance in Chinese cabbage against black rot by plant growth-promoting rhizobacteria. **Biological Control** 99:8-13.

Mhatre PH, Karthik C, Kadirvelu K, et al (2019) Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A potential alternative tool for nematodes bio-control. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology** 17:119–128. doi: 10.1016/J.BCAB.2018.11.009

Netscher C, Taylor DP (1974) An improved technique for preparing perineal patterns of *Meloidogyne* spp. **Nematologica** 20:268–269. doi: <https://doi.org/10.1163/187529274X00285>

Silva FC dos S, Sedyama T, Oliveira R de CT, et al (2017) Economic Importance and Evolution of Breeding. In: Silva FL da, Sedyama ABT, Ludke WH (eds) **Soybean Breeding**. Springer International Publishing, p. 1–17.

Soares PLM, Vidal RL, Nascimento DD, et al (2018) Os Nematoides de Galha (*Meloidogyne* spp.) nas culturas de milho e sorgo. In: Paes MCD, Pinho RG Von,

Moreira SG (eds) **Soluções integradas para os sistemas de produção de milho e sorgo no Brasil**. ABMS, Sete Lagoas, pp 66–105.

Souza ADC (2018) **Controle biológico de alternaria alternata, agente causal da mancha marrom de alternaria, por *Bacillus* spp.** 61 f. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de São Carlos.

Statistica (2004) Statistica: data analysis software system. Version 7. <www.statsoft.com>.

Tihohod D, Ferraz S (1986) Variabilidade de três populações de *Meloidogyne javanica* em plantas de soja. **Nematologia Brasileira** 10:163–171.

Xiang N, Lawrence KS, Donald PA (2018) Biological control potential of plant growth-promoting rhizobacteria suppression of *Meloidogyne incognita* on cotton and *Heterodera glycines* on soybean: A review. **Journal of Phytopathology** 166:449–458. doi: 10.1111/jph.12712

Xiang N, Lawrence KS, Kloepper JW, et al (2017a) Biological Control of *Meloidogyne incognita* by Spore-forming Plant Growth-promoting Rhizobacteria on Cotton. **Plant Disease** 101:774–784. doi: 10.1094/PDIS-09-16-1369-RE

Xiang N, Lawrence KS, Kloepper JW, et al (2017b) Biological control of *Heterodera glycines* by spore-forming plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) on soybean. **PLoS One** 12:e0181201. doi: 10.1371/journal.pone.0181201

Zhou Y, Wang Y, Zhu X, et al (2017) Management of the soybean cyst nematode *Heterodera glycines* with combinations of different rhizobacterial strains on soybean. **PLoS One** 12:e0182654. doi: 10.1371/journal.pone.0182654

CAPÍTULO 4 - Considerações finais

Por meio dos resultados obtidos nesse trabalho foi possível salientar o potencial da utilização de bactérias do gênero *Bacillus* spp. no controle de nematoides na cultura da soja, bem como na promoção de crescimento das plantas de soja. Observou-se também que o método de aplicação dessas bactérias interfere na eficiência dos *Bacillus* spp. no sistema radicular, refletindo diretamente no seu potencial de supressão dos nematoides e na promoção de crescimento. Para tanto, o método de aplicação via tratamento de sementes (TS), embora não tenha sido o melhor para emergência das plântulas, é o mais indicado, visto sua eficiência superior para melhoria dos índices de crescimento da planta e para o controle dos nematoides. Quanto aos *Bacillus* spp., observou-se que dos dezenove isolados testados, onze apresentaram eficiência na promoção de crescimento da soja e na supressão de pelo menos uma das espécies de nematoides. Dentre os onze, os isolados ACB-01, ACB-08, ACB-22 e ACB-AP3, foram eficientes na promoção de crescimento soja e supressão de *Heterodera glycines* e *Meloidogyne javanica* e *M. incognita*.