

Biocontrole do fitonematoide *Pratylenchus brachyurus* in vitro e na soja em casa de vegetação por *Bacillus subtilis**Phytonemathode biocontrol of Pratylenchus brachyurus in vitro and on greenhouse soybean plant by Bacillus subtilis*Alexandre Paulo Machado^{1,3}, Mauro Júnior Natalino da Costa²¹ Departamento de Ciências Básicas em Saúde, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, MT.² Centro Universitário de Várzea Grande (UNIVAG), Várzea Grande, MT.³ Autor para correspondência (*Author for correspondence*): alepaulo@hotmail.com**RESUMO**

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial da bactéria *Bacillus subtilis* no controle *in vitro* e *in vivo* do fitonematoide *Pratylenchus brachyurus*. Cultura bacteriana foi incubada à temperatura de 28°C em caldo triptona de soja durante 7 dias. O cultivo microbiano, células bacterianas, sobrenadante filtrado, meio de cultivo concentrado 5X e material eluído por rotoevaporação (H₂O + compostos voláteis) foram utilizados. O inóculo de *P. brachyurus* foi obtido pelas técnicas de trituração de raízes e centrifugação. Em laboratório, a influência do bacilo na taxa de natalidade e mortalidade do nematoide *P. brachyurus* foi avaliada, bem como na germinação das sementes de soja. Em casa de vegetação, foram observados o desenvolvimento vegetal e a presença de ovos e de juvenis de *P. brachyurus* respectivamente nas raízes e no solo. O controle da população do nematoide se mostrou efetivo *in vitro*. A microbiolização das sementes de soja com a rizobactéria e seus produtos não afetou a germinação, mas reduziu significativamente o número de nematoides nas raízes e no solo, ocasionando também considerável incremento da biomassa vegetal. Desse modo, a utilização de *B. subtilis* e de seus metabólitos no controle biológico do nematoide *P. brachyurus* pode ser uma estratégia promissora na cultura da soja.

Palavras-chaves: Controle biológico, nematoide, *Glycine max*.**ABSTRACT**

The objective of this study was to evaluate the potential *in vitro* and *in vivo* of *Bacillus subtilis* in controlling plant parasitic nematode *Pratylenchus brachyurus*. Bacterial culture was incubated at 28°C in tryptone soy broth for 7 days. Bacterial culture, bacillus cells, supernatant, culture concentrated 5X by rotary evaporation and eluted solution (H₂O + volatiles) were used. The *P. brachyurus* inoculum was obtained by grinding of the roots and centrifugation techniques. In the laboratory, the bacterial effects on the germination of soybean seeds and their influence in the birth rate and mortality of the nematode *P. brachyurus* were evaluated. In the greenhouse, we observed the plant development and the presence of nematode eggs and J2 respectively in roots and soil. Biocontrol of nematode population *in vitro* was effective. The microbiolization soybean seed with rhizobacteria and its products did not affect germination, but significantly reduced the number of nematodes in the roots and soil, and causing also considerable increase in plant biomass. Thus, the use of *B. subtilis* and its metabolites in biological control of phytonematode *P. brachyurus* may be a promising strategy in soybean culture.

Key-words: Biological Control, nematode, *Glycine Max*.

INTRODUÇÃO

Os fitonematoides podem causar grandes perdas na agricultura, apresentando atualmente, resistência à ação de pesticidas convencionais. Em campos cultivados, inclusive naqueles com ausência de rotação de culturas, a taxa populacional aumenta significativamente. As espécies do gênero *Pratylenchus* Filipjev (nematoides das lesões radiculares) são parasitas de dezenas de espécies vegetais e no Brasil, encontram condições favoráveis para o seu desenvolvimento, disseminação e sobrevivência, devido aos fatores edafoclimáticos. Atualmente, *P. brachyurus* Filipjev e Schuurmans Stekhoven e *P. zae* Graham causam as maiores perdas, com ampla distribuição geográfica e grande número de plantas hospedeiras, apresentando também habilidades de sobrevivência em restos culturais (Altmann, 2010; Asmus, 2003; Costa, 2012; Goulart, 2008). As perdas, somente na cultura da soja [*Glycine max* (L.) Merrill], causadas pelo *P. brachyurus*, são estimadas em valores acima de 30% (Goulart, 2008).

No controle, são necessárias ao menos, duas estratégias básicas na sustentabilidade da produção, sendo elas a redução de níveis populacionais e também o estímulo ao desenvolvimento radicular das culturas, numa convivência com esses parasitas (Asmus, 2003; Dias et al., 2010; Costa, 2012; Goulart, 2008; Inomoto & Asmus, 2010). As estratégias incluem produtos químicos e biológicos, práticas culturais e cultivares resistentes.

Pesquisas têm sido direcionadas à descoberta de novos organismos e substâncias bioativos ambientalmente nulos, ou pouco impactantes ao meio ambiente. Fungos e bactérias têm sido empregados neste controle, diminuindo a densidade populacional do parasita no campo e equilibrando a microbiota do solo, tornando-o supressivo ao patógeno (Padilha & Samuell, 2000). São empregadas estratégias de predação, parasitismo e antibiose entre os microrganismos e fitopatógenos. A capacidade de produzir metabólitos secundários inibitórios (toxinas) e de causar patologias nos

nematoides acarreta efeitos sobre a eclosão, desenvolvimento, motilidade e mortalidade, reduzindo a invasão das raízes das plantas por estes parasitas (Siddiqui & Mahmood, 1993; Costa et al., 2002).

Um dos microrganismos de maior eficácia nesta estratégia de controle tem sido a bactéria *Bacillus subtilis*, com ações significativas já confirmadas por diversos autores (Li et al., 2005; Cardoso & Araújo, 2011; Mutua et al., 2011; Araújo & Marchesi, 2009). Redução da eclosão de ovos imaturos e maduros do nematoide das galhas (*Meloidogyne graminicola*), bem como aumento da mortalidade de juvenis em 24 e 48 horas, foram observados em ensaios *in vitro* utilizando cepas de *B. subtilis* por Ludwig et al. (2013). Redução significativa da eclosão do nematoide dos cistos (*Heterodera glycines*) foi observada *in vitro*, após tratamento com cultura desta bactéria por Araújo et al. (2002). Esta bactéria tem sido inclusive, isolada do rizoplano (rizobactéria), atuando diretamente sobre os nematoides, além disso, pode modificar os exsudatos radiculares, fazendo com que os mesmos não sejam reconhecidos pelos nematoides e, conseqüentemente inibindo a eclosão (Ramamoorthy et al., 2001; Siddiqui et al., 2001).

Existe também, a possibilidade destes antagonistas atuarem como agentes promotores do crescimento da parte aérea e raízes das plantas, com efeitos na produtividade. Entre os gêneros mais estudados destacam-se *Bacillus*, bem como *Pseudomonas*, *Azospirillum* e *Rhizobium*. Os efeitos desses microrganismos sobre o desenvolvimento das plantas são amplos, incluindo os efeitos benéficos na germinação de sementes, emergência de plântulas e crescimento vegetal (Lazzaretti & Bettioli, 1997; Luz, 2001; Ludwig & Moura, 2007; Mafia et al., 2007; Araújo & Marchesi, 2009; Izzeddin & Medina, 2011; Ludwig et al., 2013; Sarti & Miyazaki, 2013; Orberá et al., 2014). Araújo & Hungria (1999) observaram que *B. subtilis* (AP-3) e seus metabólitos proporcionaram incrementos na nodulação e rendimento da soja no campo. Em alguns

trabalhos, observou-se que a promoção de crescimento de plantas por rizobactérias também tem sido relacionada à produção de hormônios como giberelinas (Holl et al., 1988), auxinas (Araújo et al., 2005) e ácidos láctico e succínico (Yoshikawa, 1993). Em resposta aos exsudatos de raízes de soja, *B. subtilis* produziu AIA (ácido indol acético) e AIB (ácido indolbutírico) (Araújo et al., 2005).

O objetivo deste trabalho foi avaliar *in vitro* a ação de suspensões de diferentes preparados de *Bacillus subtilis* sobre a mortalidade de *P. brachyurus* e sobre as populações do nematoide na cultura de soja em casa de vegetação. Também foram avaliados os efeitos destes preparados na germinação das sementes e na biomassa da parte aérea e raiz.

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismo

Cepa de *B. subtilis* (UFMT-01), previamente identificada por métodos clássicos e moleculares conforme Machado et al. (2010), proveniente do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina da UFMT (Cuiabá, MT) foi utilizada no estudo. Os ensaios prévios de verificação da atividade de antibiose aos fungos ambientais e fitopatogênicos também foram realizados. A atividade de antibiose contra fitonematoides foi realizada no Laboratório de Fitopatologia e no Campo Experimental do UNIVAG-Centro Universitário, em Várzea Grande, MT. O período de condução dos ensaios foi de outubro de 2013 a março de 2014.

Cultivo e extrato microbiano

Culturas puras de *B. subtilis* foram incubadas à temperatura de 28°C em meio líquido triptona de soja (caldo TSB, HIMEDIA) durante 7 dias. Parte das culturas foi centrifugada a 5000 rpm, sendo o pellet lavado duas vezes em solução salina isotônica esterilizada. O sobrenadante foi filtrado em membrana millipore 0,45 µm. Outra parte dos cultivos foi roto-evaporada a 60°C até atingir a concentração em 5X. Desse modo, foram utilizados no experimento: o caldo com

crescimento microbiano, células bacterianas centrifugadas ressuspensas em solução salina esterilizada, sobrenadante filtrado do caldo cultivado, meio cultivado 5X concentrado por rotoevaporação e material eluído em rotoevaporador (H₂O + compostos voláteis). As testemunhas se deram com água destilada (testemunha I) e meio TSB (Testemunha II) esterilizados. Para quantificação do inóculo bacteriano se utilizou a escala McFarland e contagem em placa com ágar triptona de soja (TSA, HIMEDIA).

Produção de inóculo de P. brachyurus

A partir de cultura pura de *P. brachyurus*, caracterizada através dos aspectos morfológicos, conforme descrito por Handoo & Golden (1989) e mantida em quíabo na casa de vegetação, obteve-se uma suspensão de nematoides, utilizando-se a técnica de trituração de raízes de Coolen & D'Herde (1972), juntamente com a técnica de centrifugação de Jenkins (1964).

A alíquota de 20 g de raízes foi triturada em liquidificador durante 40 segundos e em seguida a suspensão passou por uma peneira de 20 mesh sobreposta a outra de 400 mesh e o resíduo da peneira de 400 mesh foi recolhido para um copo, com o auxílio de jatos de água de uma pisseta. A suspensão foi colocada em tubos de centrífuga, juntamente com uma pitada de caolim e centrifugada por 5 min a 1.450 rpm. Terminada a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se a solução de sacarose (450 g de açúcar para 1.000 mL de água) ao resíduo. Procedeu-se à nova centrifugação por mais 1 minuto na mesma rotação anterior e os tubos foram retirados. O sobrenadante foi retido em uma peneira de 500 mesh na posição inclinada para que o excesso de sacarose fosse lavado com água. O resíduo da peneira, depois de lavado, foi recolhido para um copo, onde tal suspensão foi avaliada quanto à população (ovos, juvenis e adultos) de nematoides no solo, com o auxílio da câmara de contagem de Peters. Três alíquotas de 1 ml foram retiradas e colocadas em lâmina de contagem e levada ao microscópio estereoscópio para a contagem de nematoides. Em câmara de fluxo laminar, toda

a suspensão de nematoides foi passada três vezes em água destilada e esterilizada, em peneiras esterilizadas de 0,025 mm, sendo guardada em câmara fria a 8°C até o momento do estabelecimento dos ensaios.

Teste de antagonismo microbiano na eclosão e na mortalidade de juvenis de P. brachyurus

A quantia de 10 mL de culturas bacterianas foi colocada em placas de Petri estéreis, de 4,5 cm de diâmetro. A seguir, foi pipetado 1 mL de suspensão contendo 500 ovos de *P. brachyurus* e a mistura final foi incubada por 7 dias, à 25°C, em sala climatizada. Após a incubação foi realizada a avaliação da percentagem de J2 eclodidos (formas juvenis de 2º estágio). Para o teste de mortalidade, foram observados os nematoides aparentemente inativos. Para que os nematoides fossem considerados inativos, estes deveriam apresentar um corpo retilíneo e imóvel ao microscópio. Cada placa constituiu uma unidade experimental, sendo que realizadas seis repetições, sob um delineamento experimental inteiramente casualizado.

Os tratamentos referentes ao ensaio I foram os seguintes:

1. Testemunha I (H₂O esterilizada);
2. Testemunha II (Caldo TSB esterilizado);
3. Cultura pura de *B. subtilis* em TSB (1x10⁷ células/mL);
4. Cultura pura de *B. subtilis* em TSB (diluição 0,2 X);
5. Cultura pura de *B. subtilis* em TSB (diluição 100 X);
6. Cultura pura de *B. subtilis* em TSB (diluição 1.000X);
7. Células de *B. subtilis* ($\geq 1 \times 10^9$ células/mL);
8. Sobrenadante filtrado de cultura de *B. subtilis* (TSB);
9. Cultura de *B. subtilis* rotoevaporada 5X (TSB);
10. Eluído rotoevaporado.

Efeitos de B. subtilis sob a germinação de sementes de soja in vitro

Os testes de germinação de sementes de soja foram realizados com 6 subamostras de 50 sementes da variedade de soja TMG 1174.

Para o tratamento biológico das sementes plantadas foram utilizados os tratamentos:

1. Testemunha I (H₂O esterilizada);
2. Testemunha II (Caldo TSB esterilizado);
3. Cultura pura de *B. subtilis* em TSB (1x10⁷ células/mL);
4. Células de *B. subtilis* ($\geq 1 \times 10^9$ células/mL);
5. Sobrenadante filtrado de cultura de *B. subtilis* (TSB)
6. Cultura rotoevaporada de *B. subtilis* [5X] (TSB);
7. Eluído rotoevaporado.

Nestes ensaios foram aplicados 5,0 mL da suspensão bacteriana sobre as sementes que foram imediatamente homogeneizadas e efetivada a semeadura (cinco sementes por copo). O delineamento experimental empregado foi o de parcelas inteiramente casualizadas com 6 repetições, totalizando 60 parcelas. As sementes foram semeadas em papel toalha germitest, umedecidos com água no valor de 2,5 vezes o valor do peso do papel seco e distribuídas sobre duas folhas de papel germitest no terço superior, sendo cobertas por outra do mesmo papel e enroladas. Os papéis foram fixados com ligas de borrachas, formando um cartucho e levadas a câmara de germinação (B.O.D) a 25°C por um período de sete dias. O fornecimento de água é condição essencial para que a semente inicie a germinação e se desenvolva normalmente. O substrato foi, durante todo o teste, suficientemente umedecido ao oferecer às sementes a quantidade de água necessária para sua germinação. Tomou-se o cuidado de o substrato, especialmente o de papel, não ser tão umedecido a ponto de formar uma película de água em torno das sementes, já que este excesso restringe a aeração, prejudicando a germinação.

Para evitar a perda de água por evaporação, a amostra foi mantida em ambiente com alta umidade, visando reduzir a necessidade de reumidecimento do substrato após a semeadura. Por fim foi realizada a avaliação da porcentagem de plântulas normais e anormais. A porcentagem de germinação de sementes correspondeu à proporção do número de sementes que produziu plântulas

classificadas como normais, em condições e períodos especificados. Além de serem classificadas como plantas normais que podem dar origem a uma plântula sadia, podem ser classificadas como plântulas anormais, sementes não germinadas que não são capazes de dar origem a uma plântula sadia.

Ensaio para ação de B. subtilis sob a população de P. brachyurus em casa de vegetação e no desenvolvimento da soja

O estudo foi realizado em condições de casa de vegetação. Foram utilizados copos plásticos com capacidade para 0,7 kg de substrato. O substrato esterilizado foi composto de areia, esterco e solo na proporção de 1:1:3. A análise de solo do substrato apresentou as características descritas a seguir pH (H₂O): 5,6; pH (CaCl₂): 5,0; Ca: 3,36 Cmol_c dm⁻³; K: 0,08 Cmol_c dm⁻³; Mg: 3,3 Cmol_c dm⁻³; Al: 0,0 Cmol_c dm⁻³; H + Al: 7,0 Cmol_c dm⁻³; Soma de bases: 6,74 Cmol_c dm⁻³; Saturação de bases: 49,1%; Zn: 4,8 mg dm⁻³; Cu: 0,3 mg dm⁻³; Fe: 20 mg dm⁻³; Mn: 112,7 mg dm⁻³; B: 0,18 mg dm⁻³; S: 6,8 mg dm⁻³; P: 30,8 mg dm⁻³; matéria orgânica: 64 g kg⁻¹; areia: 569 g kg⁻¹; silte: 99 g kg⁻¹; argila: 332 g kg⁻¹.

As plantas foram cultivadas durante 60 dias em casa de vegetação com reposição periódica da umidade do solo para próximo da capacidade de campo. Após este período, as plantas foram coletadas cuidadosamente separando-se as partes aérea e radicular e amostras de solo foram coletadas em cada um dos vasos. A parte aérea foi secada em estufa (60°C) até a obtenção de massa constante. As raízes, imediatamente após coletadas, foram lavadas em água corrente, deixadas secar sobre papel absorvente durante quatro horas, pesadas e submetidas aos procedimentos de trituração e extração de ovos e formas ativas de nematoides (Coolen & D'Herde, 1972), juntamente com a técnica de centrifugação de Jenkins (1964). Após a contagem dos ovos e formas ativas de cada espécie de nematoides, os resultados foram expressos em ovos e juvenis por grama de raiz. Para extração de nematoides nas amostras de solo foi utilizada a mesma metodologia, apenas excluindo-se o

caolime os resultados expressos em formas ativas por 150 cm³ de solo.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância para obtenção dos valores de F. Para comparação das médias, foi empregado o teste Tukey a 5% de probabilidade. Foi utilizado o programa estatístico SASM-AGRI (Canteri et al., 2001).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeitos in vitro de B. subtilis na eclosão e mortalidade de P. brachyurus

Os dados referentes à imersão dos nematoides em suspensões de preparados de *B. subtilis* (Fig. 1) evidenciaram efeitos antagônicos significativos da bactéria sobre a taxa de mortalidade do nematoide *P. brachyurus* ($P \leq 0,05$). Os tratamentos 3, 4 e 9 demonstraram maior atividade inibitória do nematoide e, estatisticamente, não diferiram entre si nas taxas de mortalidade. Com relação ao meio TSB esterilizado (testemunha 2), não se verificou efeitos inibitórios, não diferindo estatisticamente da testemunha em água (testemunha 1). O valor percentual da taxa de mortalidade da testemunha 2 (caldo TSB) foi utilizado como referência para base de cálculo do grau de eficácia, subtraindo-o de dados percentuais dos tratamentos, o que correspondeu a seguinte ordem: 49,99% (tratamento 3), 44,52% (T4), 36,78% (T5), 27,30% (T6), 27,37% (T7), 38,35% (T8), 56,91% (T9), 41,12% (T10). Estes resultados indicam o cultivo bacteriano de *B. subtilis* como uma alternativa potencial para o controle de *P. brachyurus*. A diluição da calda fermentada é um fator importante a ser considerado antes da aplicação, pois o grau de eficácia diminui conforme menor concentração dos constituintes do cultivo. A diluição de 100 a 1.000X do cultivo de *B. subtilis* reduziu consideravelmente a eficácia de mortalidade do nematoide. Quando se utilizou somente células de *B. subtilis* (pellet), houve pouca inibição *in vitro* do nematoide, indicando que metabólitos presentes no cultivo são importantes na redução da natalidade e aumento da mortalidade.

Bactérias nematófagas constituem grupo natural de microrganismos que podem atuar de diferentes maneiras antagônicas sobre os nematoides, em especial, por parasitismo, produção de toxinas, antibióticos, enzimas, competição por nutrientes, inclusive induzindo a resistência vegetal sistêmica e como promotores do crescimento (Tian et al., 2007).

Numerosas cepas de espécies de *Bacillus* vêm sendo empregadas para prevenção e controle

de fitopatógenos (fungos, bactérias e nematoides) e insetos. Redução da eclosão de ovos imaturos e maduros de *Meloidogyne graminicola*, bem como aumento da mortalidade de J2 em 24 e 48 horas, foram observados em ensaios *in vitro* utilizando rizobactérias, incluindo cepas de *Bacillus* (Ludwig et al., 2013). Redução significativa da eclosão do nematoide *Heterodera glycines* foi observada *in vitro* após tratamento com cultura de *B. subtilis* (Araújo et al., 2002).

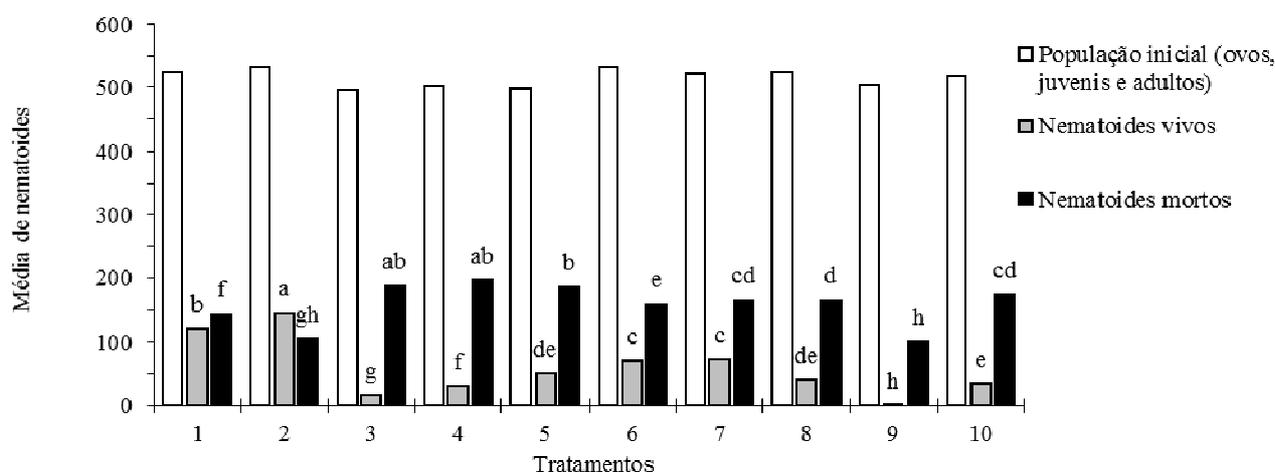


Figura 1 - Médias da população de *P. brachyurus*, compreendendo vivos e mortos (ou supostamente mortos), imersos em suspensões *in vitro*. 1 e 2 representam os dados das testemunhas (em água e meio TSB). Enquanto que, de 3 a 10 têm-se os dados referentes aos tratamentos com diferentes preparados a partir do cultivo de *B. subtilis*. Médias seguidas de mesma letra, para cada grupo de colunas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). N.S. – não significativo. Nematoides vivos CV 17,4%, nematoides mortos CV 11,4% e total final (mortos + vivos) CV 13,9%.

Figure 1 - Averages of *P. brachyurus* forms (live and dead population, or apparently dead) after immersion *in vitro* on different *B. subtilis* suspensions. Eggs, juveniles and adult forms composed the nematode population. Treatments 1 and 2 represent the negative controls (distilled water and TSB medium), while 3 to 10 have the data relating to different preparations from pure *B. subtilis* culture. Averages were followed by the same letter for each group of columns, which did not differ amongst themselves, according to the Tukey test ($P \leq 0.05$). Live nematodes CV 17.4%, dead nematodes CV 11.4% and the overall total (dead + live) CV 13.9%.

Supressão da população de nematoides na cultura de soja em casa de vegetação

Diferenças significativas entre os tratamentos para controlar a população do nematoide *P. brachyurus* em soja foram observadas na raiz e solo (Fig. 2 e 3). A microbiolização das sementes de soja com cultivo de *B. subtilis* inibiu a presença de nematoides e ovos no solo e nas raízes.

A menor quantidade de ovos e juvenis do fitonematoide nas raízes e no solo foi observada no tratamento 6 (concentrado 5X), tendo eficácia acima de 70%, quando comparada às testemunhas. A inoculação em sementes ou no solo reduz consideravelmente a presença do nematoide *H. glycines* na rizosfera de soja, em plantas com 62 dias (Araújo et al., 2002). Estudo com linhagens de soja susceptível (BRS 184) e resistente (BRS

282) demonstrou que o tratamento de sementes com carbofurano ou *B. subtilis* é eficaz no controle da meloidinose em casa de vegetação (Araújo et al., 2012). Redução significativa de nematoides (54%) em raízes de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) foi verificada após o uso de *B. subtilis* com estrume de vaca (Wepuhkhulu et al., 2011). Migração de nematoide em direção oposta às raízes de soja foi verificada após tratamento com rizobactérias (Araújo et al., 2002), indicando a probabilidade de um efeito repelente. A utilização de rizobactérias em sementes reduziu o número de galhas e ovos de *M. graminicola* em plantas de arroz (Ludwig et al., 2013).

Outro aspecto interessante é a presença de substâncias voláteis no material eluído da cultura bacteriana por rotoevaporação, as quais provavelmente estiveram ligadas à inviabilidade dos ovos e morte do nematoides, bem como aumento biomassa vegetal. Ryu et al. (2004) demonstraram que compostos orgânicos voláteis (VOCs) de *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens* podem induzir a resistência sistêmica contra patógenos. Esses compostos também podem atuar no crescimento e desenvolvimento vegetal (Farag et al., 2013). Hofmann (2013) indica que VOCs contribuem com a fixação vegetal de enxofre (S).

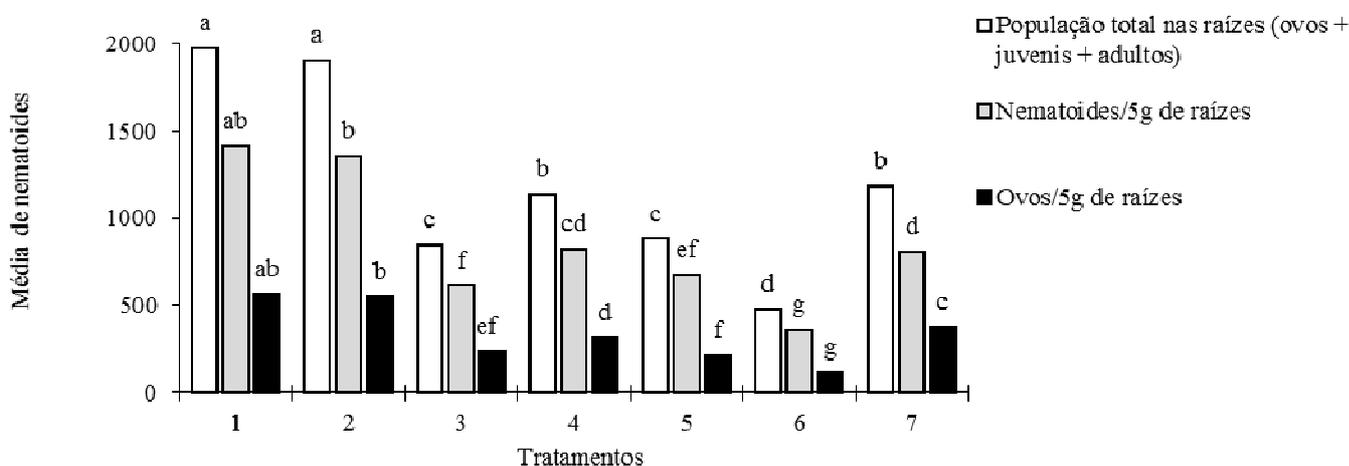


Figura 2 - Média de *P. brachyurus* em 5 g de raízes na cultura da soja cultivada em casa de vegetação. 1 e 2 representam os dados das testemunhas (em água e meio TSB). Enquanto que, de 3 a 7 têm-se os dados referentes aos tratamentos com diferentes preparados a partir do cultivo de *B. subtilis*. Médias seguidas de mesma letra, para cada grupo de colunas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). População total nas raízes (ovos + juvenis + adultos) CV 12,7%, nematoide/ 5g de raízes CV 14,5% e ovos/5 g de raízes 9,4%.

Figure 2 - Average *P. brachyurus* population in 5 g of roots from soya plants cultivated in greenhouse. Treatments 1 and 2 represent the negative control data (sterile distilled water and TSB medium), while 3 to 7 have the data relating to treatments with different preparations from *B. subtilis* culture. Averages followed by the same letter, for each group of columns that did not differ amongst themselves, according to the Tukey test ($P \leq 0.05$). Nematode/ 5g of roots, CV 14.5%; eggs/ 5g, CV 9.4%; and the overall forms, CV 12.7%.

Efeitos de *B. subtilis* sobre a germinação de sementes, massa seca da parte aérea e raízes

De acordo com os experimentos, não foram verificados efeitos significativos sobre a germinação das sementes de soja com a cepa de *B. subtilis* utilizada (Fig. 4). No entanto, a utilização de rizobactérias pode influenciar positivamente na emergência, enraizamento, crescimento e desenvolvimento dos vegetais,

bem como no controle de pragas e na produtividade (Araújo & Hungria, 1999; Luz, 2001; Mafia et al., 2007; Araújo & Menezes, 2009; Junges et al., 2013). A inoculação de *B. subtilis* em sementes de soja, milho e algodão causou aumento de emergências (Araújo, 2008). Luz (2001) observou diminuição de fitopatógenos fúngicos nas sementes de milho tratadas com *B. subtilis*.

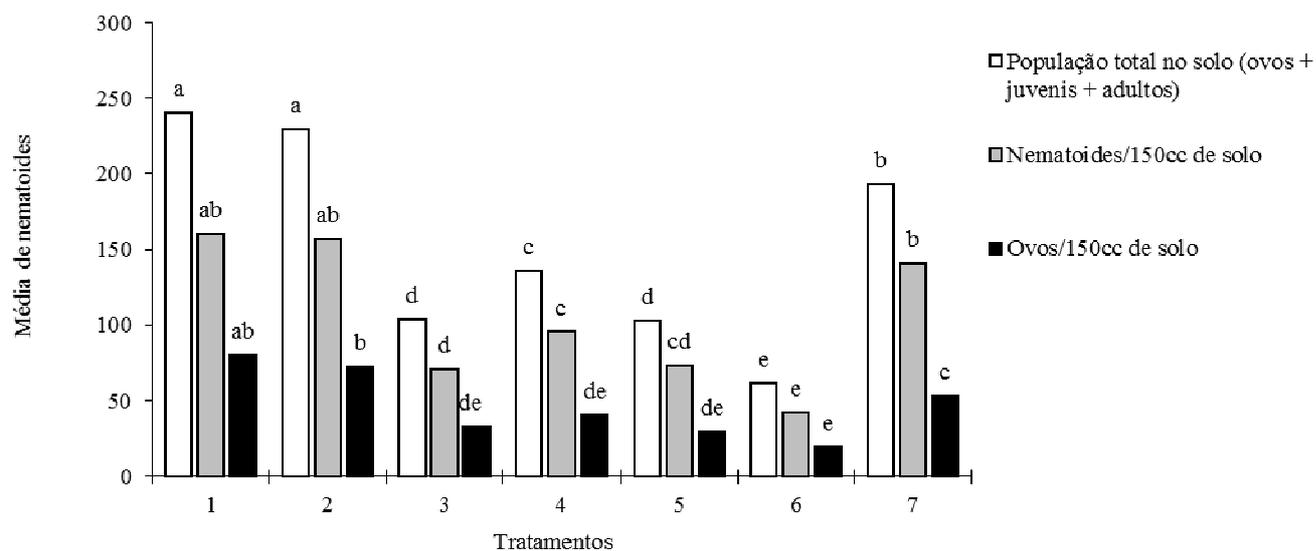


Figura 3 - Média de *P. brachyurus* em 150 cm³ de solo na cultura da soja cultivada em casa de vegetação. 1 e 2 representam os dados das testemunhas (em água e meio TSB). Enquanto que, de 3 a 7 têm-se os dados referentes aos tratamentos com diferentes preparados a partir do cultivo de *B. subtilis*. Médias seguidas de mesma letra, para cada grupo de colunas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). População total no solo (ovos + juvenis + adultos) CV 8,9%, nematoides/150 cm³ de solo CV 8,5%, ovos/150 cm³ de solo CV 11,6%.

Figure 3 - Average *P. brachyurus* population in 150 cm³ soil from soya culture in greenhouse. Treatments 1 and 2 represent the negative control data (sterile distilled water and TSB medium), while 3 to 7 have the data relating to treatments with different preparations from *B. subtilis* culture. Averages followed by the same letter, for each group of columns that did not differ amongst themselves, according to the Tukey test ($P \leq 0.05$). Nematodes/150cc, CV 8.5%; eggs/150 cm³, CV 11.6%; and overall nematode forms (eggs, juveniles and adults)/150 cm³, CV 8.9%.

Na avaliação de massa seca das raízes e da parte aérea, a média nos tratamentos foi superior a das testemunhas (Fig. 4). Em relação à parte aérea, o tratamento 6 mostrou 33,5% a mais de crescimento do que a testemunha, sendo estatisticamente significativa. O tratamento 3 também apresentou resultados promissores. Alguns estudos têm comparado o tratamento da soja com extratos bacterianos e agentes químicos fungicidas para verificar o efeito protetor do vegetal ou redução de sintomas, em especial, foliares causados por patógenos (Mantecón, 2008; Araújo & Marchesi, 2009). Pulverização com altas doses de extrato de *B. subtilis* em plantações de soja nos estágios R3 e R5, respectivamente estágio vegetal com vagens de soja em fase de formação e grãos em enchimento, mostrou redução da incidência e controle de *Septoria glycinis*, tendo ação similar a dos antifúngicos químicos comerciais (Mantecón, 2008). Tratamentos com *B. subtilis* ou carbofurano de plantas de tomateiro foram

efetivos no controle dos ovos de nematoides e de juvenis do gênero *Meloidogyne*, o que também esteve relacionado ao incremento da parte aérea (Araújo & Marchesi, 2009). Aumento significativo de massa seca e dos teores de fósforo e nitrogênio em milho foi observado após inoculação de *B. subtilis* nas sementes (Araújo, 2008).

Cepas de *B. subtilis* podem colonizar tanto monocotiledônias como dicotiledônias, tais como arroz, trigo, feijão e soja (Lazzaretti & Bettiol, 1997). Após a inoculação de *B. subtilis*, a colonização pode ocorrer em todas as partes vegetais, tais como folhas, caules e raízes (Ji et al., 2008). Incremento de peso, rendimento por planta, longevidade dos frutos e firmeza em tomateiros foram verificados após aplicação de cultivo de *Bacillus subtilis* (Mena-Violante et al., 2009). Melhora acentuada na emergência das plântulas e aumento da biomassa ocorreram em tomate, espinafre e quiabo após aplicação de

Pseudomonas aeruginosa ou *B. subtilis* (Adesemoye et al., 2008).

Outro fator importante tem sido o sinergismo simbiótico entre os microrganismos na promoção do desenvolvimento vegetal. A inoculação de *B. subtilis* e *Bradyrhizobium japonicum* em sementes de soja propiciou crescimento do vegetal em 125%, além de 100% da parte aérea, 235% da raiz, 20% de

folhas e 88% de nódulos radiculares (Sarti & Miyazaki, 2013).

A microbiolização com *B. subtilis* e *Bradyrhizobium japonicum* de sementes de soja causou incremento significativo quanto ao número de nódulos (59 a 60%) e produtividade de grãos (22 a 24%) (Araújo & Hungria, 1999).

Figura 4 - Germinação de sementes de soja (%) em laboratório e massa seca da parte aérea e das raízes de soja tratadas com diferentes preparados de *B. subtilis* e inoculadas com *P. brachyurus* em casa de vegetação. Médias não foram diferentes entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Figure 4 - Soybean seed germination *in vitro* and dry mass of shoots and roots of soybean treated with different preparations of *B. subtilis* and inoculated with the *P. brachyurus* nematode in a greenhouse. Means were not different by Turkey test ($P \leq 0,05$).

Tratamentos	Germinação de soja (%)	Massa seca	
		Parte aérea	Raiz
1. Testemunha I	77,3 ^{N.S.}	154,8 e	6,6 ^{N.S.}
2. Testemunha II	76,8	156,1 de	6,7
3. Cultura pura	77,1	202,2 bc	7,9
4. Células de <i>B. subtilis</i>	75,5	139,2 fg	7,6
5. Sobrenadante filtrado	76,3	138,4 g	6,8
6. Cultivo [5X]	75,8	232,7 a	7,8
7. Eluído rotaevaporado	77,3	193,4 c	7,3
C.V. (%)	4,7	8,3	5,4

O emprego de diferentes isolados de *B. subtilis* com *Rhizobium leguminosarum* inibiu a população de nematoides de 28 a 42% em plantação de feijão “Coco Rosa”, tendo aumento também a nodulação das raízes (Mutua et al., 2011). Em feijão-caupi, a massa radicular e a nodulação aumentaram após coinoculação com rizóbios e *B. subtilis*, além da influência positiva no crescimento vegetal e na fixação de N (Araújo et al., 2010).

A mistura de diferentes bactérias pode também contribuir no controle de nematoides. Freitas (2008) obtiveram redução de 53% no número de galhas formadas por *M. incognita* em raízes de tomateiro, utilizando uma mistura de *Pseudomonas* spp fluorescentes, três *Pseudomonas* spp não fluorescentes e *Bacillus* sp. Siddiqui et al. (2001) verificaram por meio de testes *in vitro* um efeito nematicida de diferentes isolados de *Pseudomonas*

aeruginosa e *B. subtilis* sobre juvenis de segundo estágio de *M. javanica* e zonas de inibição do crescimento de *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium solani* e *Rhizoctonia solani*. Os autores observaram, ainda, em casa de vegetação e campo, diferentes níveis de supressão da infecção causada por tais fungos e pelos nematoides em *Vigna radiata*.

CONCLUSÕES

Diferentes preparados da cultura bacteriana da cepa de *B. subtilis* proporcionaram ação nematicida contra *P. brachyurus in vitro* e em casa de vegetação, exceto o uso de células puras, demonstrando resultados potenciais para sua utilização no controle do fitonematoide em condições experimentais de campo. Culturas puras (1×10^7 células/mL), cultivo concentrado, calda com metabólitos e

eluídos rotoevaporados mostraram-se eficazes na inibição dos nematoides, sem interferir na germinação das sementes, tendo ainda proporcionado o incremento de biomassa das partes área e radicular.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq e à FINEP pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- ADESEMOYE, A. O.; OBINI, M.; UGOJI, E. O. Comparison of plant growth-promotion with *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis* in three vegetables. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 423-426, 2008.
- ALTMANN, N. **Plantio direto no Cerrado: 25 anos acreditando no sistema**. Passo Fundo: Aldeia Norte Editora, 568p, 2010.
- ARAÚJO, F. F. Inoculação de sementes com *Bacillus subtilis*, formulado com farinha de ostras e desenvolvimento de milho, soja e algodão. **Ciência e Agrotecnologia**, 32: 456-462, 2008.
- ARAÚJO, F. F.; BRAGANTE, R. J.; BRAGANTE, C. E. Controle genético, químico e biológico de meloidoginose na cultura da soja. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 42, p. 220-224, 2012.
- ARAÚJO, A. S. F.; CARNEIRO, R. F. V.; BEZERRA, A. A. C.; ARAÚJO, F. F. Coinoculação rizóbio e *Bacillus subtilis* em feijão-caupi e leucena: efeito sobre a nodulação, a fixação de N₂ e o crescimento das plantas. **Ciência Rural**, v. 40, p. 182-185, 2010.
- ARAÚJO, F. F.; HENNING, A.; HUNGRIA, M. Phytohormones and antibiotics produced by *Bacillus subtilis* and their effects on seed pathogenic fungi and on soybean root development. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 21, p. 1639-1645, 2005.
- ARAÚJO, F. F.; HUNGRIA, M. Nodulação e rendimento de soja co-infectada com *Bacillus subtilis* e *Bradyrhizobium japonicum* / *B. elkanii*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, p. 1633-1643, 1999
- ARAÚJO, F. F.; MARCHESI, G. V. P. Uso de *Bacillus subtilis* no controle da meloidoginose e na promoção do crescimento do tomateiro. **Ciência Rural**, v. 39, p. 1558-1561, 2009.
- ARAÚJO, F. F.; MENEZES, D. Indução de resistência a doenças foliares em tomateiro por indutores biótico (*Bacillus subtilis*) e abiótico (Acibenzolar-S-Metil). **Summa Phytopathologica**, v. 3, p. 169-172, 2009.
- ARAÚJO, F. F.; SILVA, J. F. V.; ARAÚJO, A. S. F. Influência de *Bacillus subtilis* na eclosão, orientação e infecção de *Heterodera glycines* em soja. **Ciência Rural**, v. 32, p. 197-203, 2002.
- ASMUS, G. L. Distribuição quali-quantitativa de nematoides fitoparasitos em áreas de produção de algodão em Mato Grosso do Sul. In: Congresso Brasileiro do Algodão, 2003, Goiânia. **Anais**. Goiânia: EMBRAPA, p.142-143, 2003.
- CANTERI, M. G.; ALTHAUS, R. A.; VIRGENS FILHO, J. S.; GIGLIOTI, E. A.; GODOY, C. V. SASM - Agri: Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott - Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, v.1, p.18-24, 2001.
- CARDOSO, R. B.; ARAÚJO, F. F. Multiplicação de *Bacillus subtilis* em vinhaça e viabilidade no controle da meloidoginose em cana de açúcar. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, 15,1283-1288, 2011.
- COOLEN, W. A.; D'HERDE, C. J. **A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue**. Ghent: State Agriculture Research Centre, 77p, 1972.
- COSTA, M. J. N.; CAMPOS, V. P.; PFENNING, L. H., OLIVEIRA, D. F. Patogenicidade e reprodução de *Meloidogyne incognita* em tomateiros (*Lycopersicon esculentum*) com aplicação de filtrados fúngicos ou extratos de plantas e de esterco. **Nematologia Brasileira**, v. 26, p. 5-12, 2002.
- COSTA, M. J. N. Nematoides: consorciação e rotação de culturas. In: Paterniani, M. E. A. G.; Duarte, A. P.; Tsunehiro, A. **Diversidade e inovações na cadeia produtiva de milho e sorgo na era dos transgênicos**. Campinas: Instituto Agronômico, Associação Brasileira de Milho e Sorgo, p. 367-378, 2012.
- DIAS, W. P.; ASMUS, G. L.; SILVA, J. F. V.; GARCIA, A.; CARNEIRO, G. E. S. Nematoides. In: Almeida, A. M. R.; Seixas. **Soja: doenças radiculares e de hastes e inter-relações com o manejo do solo e da cultura**. Embrapa Soja: Londrina, p. 173-206, 2010.
- FARAG, M. A.; ZHANG, H.; RYU, C.M. Dynamic Chemical Communication between Plants and Bacteria through Airborne Signals: Induced Resistance by Bacterial Volatiles. **Journal of Chemical Ecology**, v. 39, p. 1007-1018, 2013.

- FREITAS, L. G. **Rizobactérias versus Nematoides**. Viçosa: UFV, p. 10, 2008. Disponível em: <<http://www.ufv.br/dfp/lab/nematologia/rizo.pdf>>. Acesso em: 12 mar. 2009.
- GOULART, A. M. C. **Aspectos gerais sobre nematoides-das-lesões-radiculares (gênero *Pratylenchus*)**. Planaltina: Embrapa Cerrados, p. 30 (Documentos), 2008.
- HANDOO, Z. A.; GOLDEN, A. M. A key and diagnostic compendium to the species of the genus *Pratylenchus* Filipjev, 1936 (Lesion nematodes). **Journal of Nematology**, v. 21, p. 202-218, 1989.
- HOFMANN, N.R. Volatile Organic compounds: a bacterial contribution to plant sulfur nutrition. **The Plant Cell**, v. 25, p. 2381, 2013.
- HOLL, F. B.; CHANWAY, C. P.; TURKINGTON, R.; RADLEY, R. A. Response of crested wheatgrass (*Agropyron cristatum* L.), perennial ryegrass (*Lolium perenne*) and white clover (*Trifolium repens* L.) to inoculation with *Bacillus polymyxa*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 20, p. 19-24, 1988.
- INOMOTO, M. M.; ASMUS, G. L. Host status of graminaceous cover crops for *Pratylenchus brachyurus*. **Plant Disease**, v. 94, p. 1022-1025, 2010.
- IZZEDDIN, N. A.; MEDINA, L. T. Efecto del control biológico por antagonistas sobre fitopatógenos em vegetales de consumo humano. **Salus**, v. 15, p. 8-12, 2011.
- JENKINS, W. R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Reporter**, v. 48, p. 692, 1964.
- JI, X.; LU, G.; GAI, Y.; ZHENG, C.; MU, Z. Biological control against bacterial wilt and colonization of mulberry by an endophytic *Bacillus subtilis* strain. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 65, p. 565-673, 2008.
- JUNGES, E.; TOEBE, M.; SANTOS, R. F.; FINGER, G.; MUNIZ, M. F. B. Effect of priming and seed-coating when associated with *Bacillus subtilis* in maize seeds. **Revista Ciência Agronômica**, 44, 2013.
- LAZZARETTI, E.; BETTIOL, W. Tratamento de sementes de arroz, trigo, feijão e soja com um produto formulado a base de células e de metabólitos de *Bacillus subtilis*. **Scientia Agricola**, 54: 89-96, 1997.
- LI, B.; XIE, G.; SOAD, A.; COOSEMANS, J. Supression of *Meloidogyne javanica* by antagonistic and plant growth-promoting rhizobacteria. **Journal Zhejiang University Science**, v. 6, p. 496-501, 2005.
- LUDWIG, J.; MOURA, A. B. Controle biológico da queima-das-bainhas em arroz pela microbiolização de sementes com bactérias antagonistas. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, p. 381-386, 2007.
- LUDWIG, J.; MOURA, A. B.; GOMES, C. B. Potencial da microbiolização de sementes de arroz com rizobactérias para o biocontrole do nematoide das galhas. **Tropical Plant Pathology**, v. 38, p. 264-268, 2013.
- LUZ, W. Efeito de bioprotetores em patógenos de sementes e na emergência e rendimento de grãos de milho. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, p. 16-20, 2001.
- MACHADO, A. P.; VIVI, V. K.; TAVARES, J. R.; GUEIROS, F. J.; FISCHMAN, O. Antibiosis and dark-pigments secretion by the phytopathogenic and environmental fungal species after interaction in vitro with a *Bacillus subtilis* isolate. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, p. 997-1004, 2010.
- MAFIA, R. G.; ALFENAS, A. C.; FERREIRA, E. M.; TEIXEIRA, D. A.; ZAUZA, E. A. V. Indução do enraizamento e crescimento do eucalipto por rizobactérias: efeito da adição de fonte alimentar e da composição do substrato de enraizamento. **Revista Árvore**, v. 31, p. 589-597, 2007.
- MANTECON, J. D. Efficacy of chemical and biological strategies for controlling the soybean brown spot (*Septoria glycines*). **Ciencia e Investigación Agraria**, v. 35, p. 211-214, 2008.
- MENA-VIOLANTE, H. G.; CRUZ-HERNANDEZ, A.; PAREDES-LOPEZ, O.; GOMEZ-LIM, M.A.; OLALDE-PORTUGAL, V. Fruit texture related changes and enhanced shelf-life through tomato root inoculation with *Bacillus subtilis* BEB-13BS. **Agrociencia**, v. 43, p. 559-567, 2009.
- MUTUA, G. K.; KARANJA, N. K.; AYUKE, F.; NDUKHU, H.; KIMENJU, J.W. The potential of *Bacillus subtilis* and *Rhizobium leguminosarum* in controlling plant-parasitic nematodes in farmers' fields. **African Crop Science Conference Proceedings**, v. 10, p. 209-215, 2011.
- ORBERA, T. M.; SERRAT, M. J.; ORTEGA, E. Potential applications of *Bacillus subtilis* strain SR/B-16 for the control of phytopathogenic fungi in economically relevant crops. **Biotecnología Aplicada**, v. 31, p.13-17, 2014.
- PADILHA, T.; SAMUEL, C.A. Fungos nematófagos na redução da disponibilidade de larvas infectantes de nematoides trichostrongilídeos. In MELO, I. S. DE AZEVEDO, J. L. **Controle Biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000.
- RAMAMOORTHY, V.; VISWANATHAN, T.; RAGUCHANDER, V.; PRAKASAM, V.; SEMIYAPPAN, R. Induction of systemic resistance by

plant growth promoting rhizobacteria in crop plants pest and diseases. **Crop Protection**, v. 20, p. 1-11, 2001.

RYU, C. M.; FARAG, M. A.; HU, C.H.; REDDY, M. S.; KLOPPER, J. W.; PARÉ, P. W. Bacterial Volatiles Induce Systemic Resistance in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 134, p. 1017-1026, 2004.

SARTI, G. C.; MIYAZAKI, S. S. Actividad antifúngica de extractos crudos de *Bacillus subtilis* contra fitopatógenos de soja (*Glycine max*) y efecto de suco inoculación con *Bradyrhizobium japonicum*. **Agrociencia**, v. 47, p. 373-383, 2013.

SIDDIQUI, Z. A.; IQBAL, A.; MAHMOOD, I. Effects of *Pseudomonas fluorescens* and fertilizers on the reproduction of *Meloidogyne incognita* and growth of tomato. **Applied Soil Ecology**, v. 16, p. 179-185, 2001.

SIDDIQUI, Z.; MAHMOOD, Z. Integrated control of a root-knot disease complex of chickpea by fungal

filtrates and green manuring. **Nematologia Mediterranea**, v. 21, p. 161-164, 1993.

TIAN, B.; YANG, J.; ZHANG, K.Q. Bacteria used in the biological control of plant-parasitic nematodes: populations, mechanisms of action, and future prospects. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 61, p. 197-213, 2007.

WEPUHKHULU M.; KIMENJU, J.; ANYANGO, B.; WACHIRA, P.; KYALLO, G. Effect of soil fertility management practices and *Bacillus subtilis* on plant parasitic nematodes associated with common bean. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, v. 13, p. 27-34, 2011.

YOSHIKAWA, M. Succinic and lactic acids as plant growth promoting compounds produced by rhizosphere *Pseudomonas putida*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 1150-1154, 1993.