



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA
INSTITUTO FEDERAL GOIANO – CAMPUS URUTÁI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROTEÇÃO DE PLANTAS

**ASPECTOS BIOQUÍMICOS E FISIOLÓGICOS EM SOJA INFECTADA
POR *Heterodera glycines* EM RESPOSTA AO AGENTE DE
BIOCONTROLE *Bacillus velezensis* GF267**

Brena Ficher Augusto dos Santos
Eng. Agrônoma

URUTÁI – GOIÁS
2020

BRENA FICHER AUGUSTO DOS SANTOS

**ASPECTOS BIOQUÍMICOS E FISIOLÓGICOS EM SOJA INFECTADA POR
Heterodera glycines EM RESPOSTA AO AGENTE DE BIOCONTROLE *Bacillus*
velezensis GF267**

Orientador: Prof. Dr. Nadson de Carvalho Pontes

Dissertação apresentada ao Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Proteção de Plantas para obtenção do título de MESTRA

URUTAÍ – GO
2020

Sistema desenvolvido pelo ICMC/USP
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas - Instituto Federal Goiano

SSA237 Santos, Brena Ficher Augusto
a ASPECTOS BIOQUÍMICOS E FISIOLÓGICOS EM SOJA
INFECTADA POR *Heterodera glycines* EM RESPOSTA AO
AGENTE DE BIOCONTROLE *Bacillus velezensis* GF267 /
Brena Ficher Augusto Santos; orientador Nadson de
Carvalho Pontes. -- Urutá, 2020.
32 p.

Dissertação (em Mestrado Profissional em Proteção
de Plantas) -- Instituto Federal Goiano, Campus
Urutá, 2020.

1. *Glycine max* L. 2. *Heterodera glycines*. 3.
Bacillus velezensis. 4. Controle biológico.. I.
Pontes, Nadson de Carvalho, orient. II. Título.

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR PRODUÇÕES TÉCNICO-CIENTÍFICAS NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DO IF GOIANO

Com base no disposto na Lei Federal nº 9.610/98, AUTORIZO o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, a disponibilizar gratuitamente o documento no Repositório Institucional do IF Goiano (RIIF Goiano), sem ressarcimento de direitos autorais, conforme permissão assinada abaixo, em formato digital para fins de leitura, download e impressão, a título de divulgação da produção técnico-científica no IF Goiano.

Identificação da Produção Técnico-Científica

- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> Tese | <input type="checkbox"/> Artigo Científico |
| <input checked="" type="checkbox"/> Dissertação | <input type="checkbox"/> Capítulo de Livro |
| <input type="checkbox"/> Monografia - Especialização | <input type="checkbox"/> Livro |
| <input type="checkbox"/> TCC - Graduação | <input type="checkbox"/> Trabalho Apresentado em Evento |
| <input type="checkbox"/> Produto Técnico e | Educacional - Tipo: |

Nome Completo do Autor: **Brena Ficher Augusto dos Santos**

Matrícula: **2018101330540040**

Título do Trabalho: **ASPECTOS BIOQUÍMICOS E FISIOLÓGICOS EM SOJA INFECTADA POR *Heterodera glycines* EM RESPOSTA AO AGENTE DE BIOCONTROLE *Bacillus velezensis* GF267**

Restrições de Acesso ao Documento

Documento confidencial: Não Sim, justifique: _____

Informe a data que poderá ser disponibilizado no RIIF Goiano: 22/04/2020

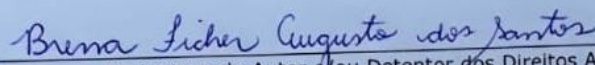
O documento está sujeito a registro de patente? Sim Não
O documento pode vir a ser publicado como livro? Sim Não

DECLARAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO NÃO-EXCLUSIVA

O/A referido/a autor/a declara que:

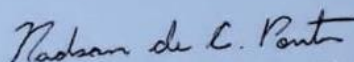
- o documento é seu trabalho original, detém os direitos autorais da produção técnico-científica e não infringe os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade;
- obteve autorização de quaisquer materiais incluídos no documento do qual não detém os direitos de autor/a, para conceder ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano os direitos requeridos e que este material cujos direitos autorais são de terceiros, estão claramente identificados e reconhecidos no texto ou conteúdo do documento entregue;
- cumpriu quaisquer obrigações exigidas por contrato ou acordo, caso o documento entregue seja baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano.

Urutai, 22 de Abril de 2020.



Assinatura do Autor e/ou Detentor dos Direitos Autorais

Ciente e de acordo:



Assinatura do(a) orientador(a)



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO - CÂMPUS URUTAÍ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROTEÇÃO DE PLANTAS

ATA DE DEFESA

DEFESA PÚBLICA N.º 57 - DISSERTAÇÃO DE MESTRADO - PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROTEÇÃO DE PLANTAS - MESTRADO PROFISSIONAL.

Área de Concentração: Fitossanidade
Linha de Pesquisa: Manejo de Pragas, Doenças e Plantas Daninhas

Aos vinte e sete dias do mês de fevereiro do ano de dois mil e vinte, às 15:00 horas, estiveram presentes no Instituto Federal Goiano - Campus Morrinhos os Doutores(as) Nadson de Carvalho Pontes (Orientador), Filipe Constantino Borel e Jaqueline Kiyomi Yamada, constituindo a Banca Examinadora da dissertação intitulada "**ASPECTOS BIOQUÍMICOS E FISIOLÓGICOS EM SOJA INFECTADA POR *Heterodera glycines* EM RESPOSTA AO AGENTE DE BIOCONTROLE *Bacillus velezensis* GF267**" de autoria de **Brena Ficher Augusto dos Santos**, candidata ao título de Mestra em Proteção de Plantas. Após leitura da dissertação e arguição pela Banca, concluiu-se que a candidata está () APROVADA sem correções, (✓) APROVADA mediante correções na versão a ser depositada () REPROVADA. Nada mais havendo a ser tratado por esta Banca Examinadora, eu, **Nadson de Carvalho Pontes**, lavrei a presente ata que, após lida e aprovada, segue assinada por seus integrantes.

Morrinhos - GO, 27 de fevereiro de 2020.

Prof. Dr. Nadson de Carvalho Pontes
Orientador - IF Goiano - Campus Urutaí

Prof. Dr. Filipe Constantino Borel
IF Goiano - Campus Morrinhos

Prof.ª Dra. Jaqueline Kiyomi Yamada
IF Goiano - Campus Morrinhos

SUMÁRIO

RESUMO	v
ABSTRACT	vi
INTRODUÇÃO.....	1
OBJETIVO	4
MATERIAL E MÉTODOS	5
CONCLUSÕES	20
REFERÊNCIAS	21

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar aspectos bioquímicos e fisiológicos da soja infectada com *Heterodera glycines* e tratada com o isolado de *Bacillus velezensis* GF267. Dois experimentos foram conduzidos em casa de vegetação: um para avaliar o efeito de GF267 sobre a infecção e reprodução do fitonematoide, além dos aspectos fisiológicos (fotossíntese líquida, taxa de transporte de elétrons, eficiência do uso da água, transpiração, razão da concentração interna e externa de CO₂ na folha (Ci/Ca) e condutância estomática); e outro para avaliar a atividade de enzimas relacionadas à defesa da planta: lipoxigenase (LIPOX), fenilalanina amônia-liase (FAL), β 1,3-glucanase (GLU), quitinase (QUI), e catalase (CAT). Os tratamentos consistiram na aplicação ou não de GF267 (1x10⁹ Unidade Formadora de Colônia - UFC/mL) via semente de soja cultivar Desafio RR, e com ou sem inoculação de *H. glycines* (4000 ovos/planta) 10 dias após o semeio, no total de 4 tratamentos. Para aspectos fisiológicos, as avaliações ocorreram aos 0, 10, 30 e 50 dias após a inoculação, com 6 repetições. Aos 60 dias após a semeadura, avaliou-se a ocorrência de penetração e quantificação do número de fêmeas/ g de raiz, cistos/ cm³ de solo, ovos/10 fêmeas e ovos/10 cistos. Para aspectos bioquímicos, as coletas de tecido foliar para avaliação ocorreram às 0, 48, 96, 144, 192 e 240 horas após a inoculação com *H. glycines*, com 5 repetições para cada tratamento e tempo de coleta. Em ambos os experimentos, o delineamento inteiramente casualizado. O tratamento com GF267 reduziu o número de fêmeas/ g de raiz, cistos/cm³ de solo e número de ovos/10 cistos. Dentre os parâmetros avaliados de aspecto fisiológico, aos 20 dias após a inoculação, plantas tratadas com GF267 tiveram eficiência do uso da água maior. E aos 50 dias após a inoculação, plantas tratadas com GF267 apresentaram menor transpiração, maior relação Ci/Ca e melhor eficiência do uso da água. Em relação aos aspectos bioquímicos, plantas tratadas com GF267 não tiveram aumento da atividade de GLU, QUI e CAT apenas para LIPOX e FAL. Para LIPOX, plantas com GF267 inoculadas e não, tiveram aumento significativo entre 96 e 192 horas após inoculação. E para FAL, plantas com GF267, inoculadas apresentaram aumento da atividade em 0 e 192 horas, e as não inoculadas em 96 horas após inoculação. O isolado GF267 de *B. velezensis* foi capaz de reduzir a população de *H. glycines*, além de aumentar a atividade das enzimas LIPOX e FAL, ambas relacionadas a defesa da planta contra fitopatógenos, em condições de casa de vegetação.

Palavras-chave: *Glycine max* L.; *Heterodera glycines*; *Bacillus velezensis*; Controle biológico.

ABSTRACT

The present study aimed to evaluate biochemical and physiological aspects of soybeans infected with *Heterodera glycines* and treated with *Bacillus velezensis* isolate GF267. Two experiments were conducted in the greenhouse: one to evaluate the effect of GF267 on infection and proper reproduction, in addition to the physiological aspects (liquid photosynthesis, electron transport rate, water use, transpiration, internal concentration ratio) and external Leaf CO₂ (C_i / C_a) and stomatal conductance); and another to evaluate the activity of enzymes related to plant defense: lipoxygenase (LIPOX), phenylalanine ammonia lyase (FAL), β 1,3-glucanase (GLU), chitinase (QUI) and catalase (CAT). The treatments consisted of the application or not of GF267 (1x10⁹ Colony Forming Unit - UFC / mL) via soybean seed cultivar Desafio RR, and with or without inoculation of *H. glycines* (4000 eggs / plant) 10 days after sowing, at total of 4 treatments. For physiological aspects, the evaluations occurred at 0, 10, 30 and 50 days after inoculation, with 6 replications. At 60 days after sowing, the occurrence of penetration and quantification of the number of females/g of root, cysts/cm³ of soil, eggs/10 females and eggs/10 cysts was evaluated. For biochemical aspects, leaf tissue collections for evaluation occurred at 0, 48, 96, 144, 192 and 240 hours after inoculation with *H. glycines*, with 5 replicates for each treatment and collection time. In both experiments, the design was completely randomized. Treatment with GF267 reduced the number of females/g of root, cysts/cm³ of soil and the number of eggs/10 cysts. Among the evaluated parameters of physiological aspect, at 20 days after inoculation, plants treated with GF267 had greater efficiency in the use of water. And at 50 days after inoculation, plants treated with GF267 showed less transpiration, higher C_i/C_a ratio and better water use efficiency. Regarding the biochemical aspects, plants treated with GF267 did not increase GLU, QUI and CAT activity only for LIPOX and FAL. For LIPOX, plants with GF267 inoculated and not, had a significant increase between 96 and 192 hours after inoculation. And for FAL, plants with GF267, inoculated showed increased activity in 0 and 192 hours, and those not inoculated in 96 hours after inoculation. The isolate GF267 from *B. velezensis* was able to reduce the population of *H. glycines*, in addition to increasing the activity of the enzymes LIPOX and FAL, both related to the defense of the plant against phytopathogens, under greenhouse conditions.

Key words: *Glycine max* L., *Heterodera glycines*; *Bacillus velezensis*; Biological control.

INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L) Merrill) é a cultura mais cultivada no território brasileiro, com aproximadamente 36 milhões de hectares e produção de 114,3 milhões de toneladas, na qual a região centro-oeste é responsável por quase 80% da produção (CONAB, 2019). O grão é utilizado para a produção de diversos subprodutos, como óleo, ração animal, biocombustível, sabão, cosméticos, resinas, solventes, tintas e anticoncepcionais (DOMINGUES et al., 2014).

Diversos fatores contribuem para redução da produtividade da soja, os patógenos são um dos principais. Os nematoides, por exemplo, podem acarretar perdas de até 100% nas piores áreas, dependendo da espécie. Várias espécies de fitonematoides atacam a cultura da soja. No Brasil, as espécies que causam os maiores danos são *Meloidogyne javanica*, *M. incognita*, *Heterodera glycines*, *Pratylenchus brachyurus* e *Rotylenchulus reniformis* (JUHÁSZ et al., 2013).

O nematoide do cisto da soja (NCS), *H. glycines*, foi detectado pela primeira vez no Brasil na safra de 91/92, uma espécie de grande interesse econômico e importância na cultura da soja (SILVA et al., 2018). O ciclo de vida de *H. glycines* nas condições climáticas brasileiras é de 29 dias após a infestação do solo. Desta forma, ao longo do ciclo de cultivo da soja o NCS pode ter de duas a quatro gerações (ARAÚJO et al., 2019). O corpo da fêmea de *H. glycines* após a morte se torna o cisto, uma estrutura de coloração marrom escura, leve, extremamente resistente a deterioração e a dessecação, tornando-se a mais importante forma de dispersão do nematoide, onde os ovos protegidos podem se manter viáveis por até 8 anos, mesmo na ausência de plantas hospedeiras (MATSUO et al., 2012).

As estratégias de manejo e controle do patógeno *H. glycines* se baseiam no uso de cultivares resistentes, rotação de culturas, manejo do solo, controle químico e uso de agentes de biocontrole (ALMEIDA et al., 2016). A prática de rotação de culturas deve ser aliada a outros métodos de controle devido a este nematoide formar estrutura de resistência, os cistos (CAMPOS et al., 2011). Nenhum método isolado se mostrou até então capaz de promover o controle efetivo do nematoide do cisto, tornando-se necessário o correto manejo da cultura aliado a outras boas práticas, condicionando as plantas com nutrição balanceada, alto teor de matéria orgânica no solo, saturação de bases adequada, dentre outras condições favoráveis para o desenvolvimento pleno da planta (SHI et al., 2015). Não há evidências científicas de

que nematicidas químicos possam reduzir significativamente a população de nematoides em áreas infestadas, mas se aplicados via tratamento de sementes podem apresentar efeito supressor no início do desenvolvimento da cultura (GRIGOLLI; ASMUS, 2014).

O controle biológico visa à redução do número de espécies e indivíduos utilizando inimigos naturais e constitui uma alternativa viável, recomendável utilização via tratamento de sementes e/ou aplicado no sulco de plantio (ABREU et al., 2015). Os inimigos naturais dos nematoides fitoparasitas são variados, a exemplo espécies de fungos, bactérias e até mesmo outros nematoides (MARINO; SILVA, 2013). As bactérias assumem papel de destaque como possíveis antagonistas de fitonematoides devido a sua abundância no solo (BRAGA JUNIOR et al., 2018).

O gênero *Bacillus* corresponde a um grupo de bactérias saprófitas, gram-positivas, aeróbicas, formadoras de endósporos, que podem produzir proteases, enzimas as quais destroem a cutícula dos nematoides, denotando assim efeito nematicida. O combate se dá por diversos modos: parasitismo, produção de toxinas, antibióticos ou enzimas, competição por nutrientes, indução de resistência, interferindo no reconhecimento do nematoide-planta-hospedeiro e também por meio da promoção da saúde das plantas, manifestando assim um grande potencial (MACHADO et al., 2012; PAGE et al., 2019).

Em trabalho desenvolvido por Machado e Costa (2017) na cultura da soja e *in vitro*, observou-se que a utilização de diferentes concentrações de culturas de *B. subtilis* proporcionou ação nematicida contra *Pratylenchus brachyurus in vitro* e em casa de vegetação, reduzindo significativamente o número de nematoides nas raízes e no solo. Araujo et al. (2012) relataram que o uso de *B. subtilis*, via tratamento de sementes foi eficaz na redução do desenvolvimento do nematoide das galhas, *Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne incognita*, na cultura da soja.

Estudo conduzido por Kath et al. (2017) obteve resultados onde isolados de *Trichoderma* spp. mostraram-se eficientes no controle do *Pratylenchus brachyurus*, na cultura da soja, uma vez que, foram capazes de reduzir a penetração do nematoide nas plantas e promoveram a mortalidade *in vitro*. Em estudo realizado por Zhou et al. (2016), o uso de *B. velezensis* (sin=*Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*, *B. methylotrophicus*) foi efetivo na redução do nematoide das galhas (*M. incognita*) na cultura do tomate em ensaios conduzidos em casa de vegetação e *in vitro*.

No Brasil, existem produtos biológicos registrados para o controle de nematoides. Um

exemplo é um produto à base de *B. velezensis* strain GF267 (Registro no MAPA N° 15216), uma rizobactéria com ocorrência natural em solos e eficaz no controle de alguns fitonematoides em soja, *M. javanica* (nematóide das galhas) e *P. brachyurus* (nematóide das lesões).

Mates et al. (2019) observaram maior atividade de enzimas relacionadas à defesa, como peroxidase e polifenoloxidase, em plantas de tomateiro inoculadas com *Xanthomonas perforans* e previamente tratadas com *B. velezensis* strain GF 267 (=GF267), o que sugere um efeito de indução de resistência por parte do antagonista. Entretanto, não se conhece seu efeito sobre o nematóide do cisto da soja. Diante do exposto, o presente estudo buscou avaliar alterações bioquímicas e fisiológicas na interação soja x *H. glycines* em resposta à aplicação de GF267 via sementes e o efeito do antagonista na redução da colonização pelo patógeno.

OBJETIVO

Avaliar o controle de nematoide do cisto da soja (*Heterodera glycines*) por *Bacillus velezensis* GF 267 e seu efeito sobre as trocas gasosas e atividade de enzimas relacionada à defesa de plantas contra fitopatógenos.

MATERIAL E MÉTODOS

Controle do nematoide do cisto da soja por *Bacillus velezensis* strain GF267 e seu efeito sobre trocas gasosas

O ensaio foi conduzido em casa de vegetação com sistema de controle de temperatura e umidade. Vasos de cerâmica com capacidade de 0,5L foram preenchidos com uma mistura de areia e solo (1:1) previamente autoclavada à 120°C por 30 minutos e deixada em repouso por 15 dias para devida aeração. Os vasos foram mantidos em uma caixa de areia, de modo que a lateral estivesse coberta com areia para evitar oscilações de temperatura e umidade.

Sementes de soja da cultivar Desafio RR, suscetível a *Heterodera glycines* foram utilizadas no experimento. Uma parte das sementes foi tratada com o formulado biológico do isolado de *Bacillus velezensis* GF267 (GF267), multiplicada em fermentador industrial, na concentração de 1mL de suspensão (1×10^9 UFC/mL) por quilo de semente. Outra parte, o tratamento controle, foi imersa em água destilada estéril antes da semeadura.

Após o tratamento, foram semeadas 2 sementes por vaso. Após 10 dias, as plantas foram inoculadas com suspensão de ovos de *H. glycines* raça 3, na dose de 2 mL, com concentração de 4.000 ovos/planta. Os ovos foram colocados num orifício distante de 1 cm da haste das plantas. O experimento consistiu de quatro tratamentos em esquema fatorial 2x2: plantas tratadas e não tratadas com GF267, inoculadas e não inoculadas com *H. glycines*. Cada tratamento foi composto por 6 repetições. Aos 20 e 40 dias da semeadura, realizou-se a aplicação de 10 mL de solução nutritiva (Ouro verde®, NPK + micronutrientes, 5 g.L⁻¹) por planta.

Foi avaliada as trocas gasosas das folhas com o analisador de gases no infravermelho (IRGA) de sistema aberto (LI-6800, LI-COR Inc., Lincoln, NE, USA) aos 0, 20, 40 e 50 dias após a inoculação.

As variáveis analisadas foram: E = Taxa transpiratória ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); A = Taxa fotossintética ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e g_s = Condutância estomática ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Ao final, calculou-se a relação C_i/C_a ($\mu\text{mol mol}^{-1}$), em que C_i é a concentração interna de CO_2 e C_a a concentração externa de CO_2 . As medições foram realizadas no segundo par de folhas totalmente expandidas a partir do ápice da planta, em dias ensolarados e sem nebulosidade, no período de 8 às 11 horas da manhã. Para essas medições foi utilizado uma densidade constante de fluxo de fótons de $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, umidade relativa de 50 % e concentração de CO_2 de $400 \mu\text{mol}$

mol^{-1} . A temperatura na câmara foi mantida em 25 °C. Foram obtidos os dados de transpiração (E , $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), fotossíntese (A , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), condutância estomática (g_s , $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$), relação entre concentração interna e externa de CO_2 (C_i/C_a) e eficiência do uso da água (WUE, $\mu\text{mol CO}_2/\text{mmol H}_2\text{O}$). Durante as medições de trocas gasosas foram obtidos também os dados da taxa de transporte de elétrons (ETR, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).



Figura 1. Avaliação com equipamento com sistema aberto de fotossíntese com analisador de CO_2 e vapor d'água por radiação infravermelha (“Infra Red Gas Analyser – IRGA”).

Após 50 dias da inoculação, as plantas foram destinadas a análise de quantificação e penetração de nematoides. Nesse ensaio, foram contabilizados o número de fêmeas por grama de raiz (FGR), número de cistos por centímetro cúbico de solo (CCS), número de ovos por 10 fêmeas (OPF) e número de ovos por 10 cistos (OPC). Para a extração de *H. glycines* das raízes foi utilizada a metodologia descrita por TIHOHOD (2000). A parte aérea das plantas foi descartada e as raízes lavadas sob forte jato de água, sobre o conjunto de peneiras de 20 e 60 Mesh (Figura 2). Em seguida, o material retido na peneira de 20 Mesh foi descartado e recolhido o material da peneira de 60 Mesh em um béquer (com auxílio de uma pisseta). Depois foi filtrado com papel filtro, e avaliado sobre uma calha telada para contagem do número de fêmeas (ANDRADE et al., 1995). Após esse processo, as raízes foram lavadas mais uma vez e em seguida foi aferida a massa fresca para quantificação de *H. glycines* por grama de raiz.

Para extração dos cistos no solo, utilizou a metodologia de SHERPHERD (1970),

onde foram colocados 100 cm³ de solo num becker de 2L. Adicionou-se água até completar $\frac{1}{4}$ de seu volume e a mistura foi agitada para suspender o solo, e depois esperou 60 segundos para decantação de partículas grossas. O sobrenadante foi colocado cuidadosamente sob peneiras de 60 e 100 mesh, sem ressuspender o solo do fundo. O processo foi repetido por 3 vezes. Os nematoides retidos na peneira de 100 mesh foram recolhidos e filtrados. A contagem dos cistos e fêmeas foi realizada com auxílio de lupa, e a contagem de ovos com auxílio de microscópio fotônico no aumento de 40x.

Para contagem de ovos em fêmeas e em cistos utilizou-se a metodologia de HUSSEY E BARKER (1973). Separou-se 10 fêmeas e 10 cistos ao acaso durante a contagem na lupa. Em seguida, as fêmeas e cistos foram estourados com auxílio de bastão de vidro sob peneiras de 100 e 500 mesh. Os ovos foram recolhidos da peneira de 500 mesh, e contados com auxílio da placa de Peters, no microscópio fotônico no aumento de 40X (Figura 2). Cada amostra foi contada por 4 vezes e posteriormente realizada a média do número de ovos encontrados.

Para a avaliação de infecção radicular utilizou a técnica de coloração das raízes com fucsina ácida, descrita por BYRD et al. (1983). Foram avaliados 2 vasos do tratamento com GF267 e inoculados com *H. glycines*, e 2 vasos do tratamento sem GF267 e inoculados com *H. glycines*. As raízes foram lavadas em água corrente e mantidas no hipoclorito de sódio 2,5% por 4 minutos. Após esse período lavou-se as raízes em água corrente, e deixou em repouso por 15 minutos em água para retirada do excesso de hipoclorito de sódio. Posteriormente, as raízes foram acondicionadas em solução de fucsina ácida e expostas a aquecimento por 45 segundos para coloração dos nematoides no interior da raíz. As raízes foram resfriadas em temperatura ambiente, seguido de enxague em água corrente. Após essa etapa, foi adicionado 20 mL de glicerina e 2 gotas de ácido clorídrico (HCl). Em seguida, as raízes foram cortadas em 1cm para visualização no microscópio fotônico e obtenção das imagens.



Figura 2. Lavagem das raízes e contagem de cistos de *Heterodera glycines*.

Aspectos bioquímicos da interação soja x *Heterodera glycines* em resposta microbiolização de sementes com *Bacillus velezensis* GF 267

Realizou-se o semeio de soja (cv. Desafio RR) em copo de plástico com capacidade de 200 mL com mistura de solo e areia 1:1 preparado da mesma forma do ensaio anterior. Os procedimentos de tratamento das sementes com o antagonista e de inoculação do patógeno foram os mesmos descrito anteriormente. O experimento foi delineado sob fatorial 2x2 (plantas tratadas e não tratadas com GF267, inoculadas e não inoculadas). A unidade experimental correspondeu a seis vasos, com cinco repetições para cada tratamento.

No dia da inoculação, realizou-se a primeira coleta de folhas para análise enzimática ao final da tarde, às 17h. Após esta coleta, as plantas foram inoculadas com suspensão de ovos de *H. glycines* raça 3 na concentração de 4.000 ovos/planta, utilizando-se 2mL de suspensão por planta. Os ovos foram adicionados por meio de um orifício distante 1 cm da haste das plantas. O procedimento de coleta de folhas para análise enzimática foi repetido aos 48, 96, 144, 192 e 240 horas após a inoculação. O material coletado foi acondicionado em nitrogênio líquido para conservação até o momento do processamento das amostras. Para cada coleta, utilizou-se uma única planta por parcela.

Para obtenção dos extratos utilizados na determinação da atividade das enzimas β 1,3-glucanase (GLU), Quitinase (QUI), Fenilalanina amonialiase (FAL), Lipoxigenase (LIPOX), e catalase (CAT), amostras de tecido radicular foram maceradas em cadinho contendo N_2

líquido com auxílio de pistilo até obtenção de um pó fino. O pó obtido foi homogeneizado em 2 mL de tampão Tris HCl 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, (pH 7,0). O homogeneizado foi centrifugado a $13.000 \times g$ por 30 min, a 4°C, e os sobrenadantes usados para as determinações enzimáticas por meio de leitura em espectrofotômetro.

Para dosagem de proteínas totais foi utilizado a metodologia de Bradford (1976). A reação foi iniciada com 50 μ L da amostra enzimática, acrescida de 1 mL de reagente de Bradford, estando a amostra homogeneizada e incubada por vinte minutos em temperatura ambiente. A absorbância foi medida a 595nm. Uma curva padrão de proteína com albumina de soro bovino (BSA) foi preparada e as leituras das amostras correspondentes aos extratos enzimáticos foram convertidas em concentração de proteína solúvel, por comparação com as leituras de soluções padrões de BSA.

A atividade de LIPOX foi determinada ao adicionar 50 μ L de extrato enzimico a 1,2 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,0) acrescido de ácido linoleico, conforme descrito por Schewe et. al. (1986). O processo de incubação durou 24 horas. Após esse período a leitura foi realizada em espectrofotômetro com absorbância de 234 nm e expressa em μ mol de hidroperóxido do ácido linoléico oxidado por minuto, por μ g de proteína.

A atividade de FAL foi determinada conforme descrito por Hyodo, Kuroda e Yang (1978), com adição 50 μ L de extrato enzimico a 1,5 mL de tampão borato de sódio 0,1 M, (pH 8,0) acrescido de 10 mM de L-fenilalanina, mantida incubada por um período de 24 horas, e a leitura realizada em espectrofotômetro com absorbância de 290 nm.

A atividade da GLU foi determinada conforme descrito por Pan et al., (1991), em alíquotas de 100 μ L do sobrenadante a uma mistura composta de 300 μ L de tampão acetato de sódio 1 M (pH 4,5) e 250 μ L do substrato laminarina, na concentração de 4 mg.mL^{-1} . A mistura da reação foi incubada por duas horas em temperatura ambiente. Após esse período a reação foi interrompida com 1 mL da solução DNS 1% (2 M NaOH, ácido dinitrosalicílico) em banho-maria a 100°C, por cinco minutos. A interrupção da reação ocorreu através do resfriamento das amostras em temperatura ambiente. A absorbância do produto liberado pela GLU foi medida a 540 nm e a atividade expressa em unidades de absorbância como a produção de 1 μ mol de açúcar redutor por hora, por miligrama de proteína.

A atividade QUI foi determinada conforme Babu et al. (2003) com modificações. Adicionando 100 μ L de extrato enzimico a 300 μ L de solução de quitina (composta por 0,1g para cada 100 mL tampão acetato de potássio), foi mantida incubada a temperatura ambiente

por duas horas e após esse período, a reação foi paralisada com 1 mL de solução DNS 1% em banho-maria por cinco minutos. O resfriamento ocorreu de forma natural, em temperatura ambiente, e posteriormente a amostra lida em espectrofotômetro, com absorvância a 540 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a produção de 1 μmol de açúcar redutor por hora, por miligrama de proteína.

A atividade da CAT foi determinada pela adição de 0,04 mL do extrato enzimático bruto a 2,6 mL de meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 50 mM.L^{-1} , pH 7,0 e 0,4 mL H_2O_2 (HAMMERSCHMIDT, 2001). O decréscimo na absorvância, no primeiro minuto de reação, foi medido a 240 nm, a 25 °C. E a atividade enzimática calculada, em razão do coeficiente de extinção molar de 36 M (ANDERSON et al., 1995) e expresso em μmol de peróxido de hidrogênio consumido por minuto de leitura expresso em grama de proteína.

Análises estatísticas

Os experimentos foram realizados seguindo o delineamento experimental inteiramente casualizado. Para as análises bioquímicas as amostras foram analisadas em triplicatas. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância. Quando observados efeitos significativos dos tratamentos ($P \leq 0,05$), as médias foram comparadas com base no intervalo de confiança do teste T de *Student* ($P \leq 0,05$). Todas as análises foram realizadas com auxílio do programa SAS 9.4.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação às variáveis relacionadas a trocas gasosas, não se observou diferenças entre os tratamentos na primeira avaliação realizada aos 10 dias após a semeadura, antes da inoculação (Tabela 1). Já aos 30 dias (20 após a inoculação), observou-se efeito de GF267 e *H. glycines* (F, $P \leq 0,05$) sobre E (transpiração), WUE (eficiência do uso da água), Ci/Ca e GSW (condutância estomática). Plantas com GF267 não inoculadas, aos 20 dias após inoculação, apresentaram uma redução nos valores de E, Ci/Ca e GSW, e aumento de WUE (Tabela 2).

Tabela 1. Níveis de significância obtidos após a análise de variância em relação ao efeito do tratamento das sementes com *Bacillus velezensis* GF267 e da inoculação com *Heterodera glycines* sobre as variáveis transpiração (E), fotossíntese líquida (A), eficiência do uso da água (WUE), razão entre a concentração interna e externa de CO₂, condutância estomática (GSW) e taxa de transporte de elétrons (ETR) avaliadas em plantas de soja em diferentes estádios de desenvolvimento.

Dias após a inoculação	E	A	WUE	Ci/Ca	gs	ETR
0 ¹	0,1011 ²	0,4124	0,3430	0,1610	0,0650	0,0742
20	0,0167	0,6917	0,0450	0,0470	0,0411	0,9749
30	0,7482	0,8221	0,0087	0,0051	0,7563	0,7965
50	0,6474	0,0668	0,0512	0,0499	0,7565	0,1427

¹ dia em que foi realizada a inoculação. ² p-valor.

Tabela 2. Valores de transpiração (E), eficiência do uso da água (WUE), razão entre a concentração interna e externa de CO₂ e condutância estomática (GSW) em plantas de soja com 30 dias após a semeadura em resposta ao tratamento das sementes com *Bacillus velezensis* GF267.

Tratamentos	E (mmol m ⁻² s ⁻¹)	WUE (μmol CO ₂ / mmol H ₂ O)	Ci/Ca	gs (mol m ⁻² s ⁻¹)
<i>B. velezensis</i> strain GF267	5,62 A ¹	1,87 A	0,79 A	0,27 A
Controle	7,72 B	1,51 B	0,84 B	0,43 B
P-valor	0,0182	0,0345	0,0158	0,0148
CV ²	35,68	30,82	6,48	48,67

¹ Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (t, p<0,05). ² Coeficiente de Variação.

Aos 50 dias após a semeadura (40 dias após a inoculação), foi possível observar efeito de GF267 e *H. glycines* sobre as variáveis WUE e Ci/Ca (F, $P \leq 0,05$). Para estas variáveis, houve efeito apenas da inoculação, com redução de WUE e aumento de Ci/Ca em plantas de soja inoculadas com *H. glycines*, quando comparado com a testemunha (Tabela 3).

Tabela 3. Valores de eficiência do uso da água (WUE) e razão entre a concentração interna e externa de CO₂ (Ci/Ca) em plantas de soja aos 50 dias após a semeadura em resposta à inoculação por *Heterodera glycines* realizada 10 dias após a semeadura.

Tratamentos	WUE ($\mu\text{mol CO}_2/\text{mmol H}_2\text{O}$)	Ci/Ca
Inoculado	1,32 A ¹	0,87 A
Não Inoculado	1,59 B	0,84 B
P-valor	0,0016	0,0010
CV ²	18,79	3,27

¹ Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (t, p<0,05). ² Coeficiente de Variação.

Na última avaliação realizada aos 60 dias após a semeadura (50 dias após a inoculação), houve efeito de GF267 e *H. glycines* sobre a variável Ci/Ca (F, $P \leq 0,05$). Para esta variável, houve efeito apenas do antagonista, com aumento de WUE e redução de Ci/Ca (Tabela 4).

Tabela 4. Valores de eficiência do uso da água (WUE), razão entre a concentração interna e externa de CO₂ em plantas de soja com 60 dias após a semeadura em resposta ao tratamento das sementes com *Bacillus velezensis* GF267.

Tratamentos	WUE ($\mu\text{mol CO}_2/\text{mmol H}_2\text{O}$)	Ci/Ca
<i>B. velezensis</i> strain GF267	1,78 A ¹	0,84
Controle	1,55 B	0,86
P-valor	0,0389	0,0310
CV ²	19,48	2,67

¹ Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (t, p<0,05). ² Coeficiente de Variação.

Diversos estudos mostram que a associação entre plantas e rizobactérias apresentam

outros benefícios, além do controle de fitopatógenos, como a disponibilização de nutrientes e a produção de metabólitos que estimulam o desenvolvimento de diferentes espécies de plantas (RODRIGUES et al., 2019; ZUCARELI et al., 2018; PAIS et al., 2016). Szilagyi-Zecchin et al. (2015) observaram que a bactéria *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42, produtora de compostos indólicos e sideróforos, na dose de 20% da solução inoculante (correspondendo a $1,6 \times 10^5$ bactérias/semente) promoveu o crescimento da parte aérea de mudas de tomateiro das cultivares ‘Santa Clara’ e ‘Cereja’. Costa et al. (2013) constaram que as estirpes não nodulíferas UFPI CB1-8, UFPI CB4-1A e UFPI CB7-1, pertencentes ao gênero *Bacillus* proporcionam aumento da produção de massa de matéria seca da parte aérea do feijão-caupi.

O isolado de *B. velezensis* strain GF267 via sementes promoveu maior eficiência no uso da água em diferentes momentos da avaliação, independente da infecção ou não por *H. glycines*, indicando o efeito benéfico deste isolado para o desenvolvimento de plantas de soja. Também houve redução da relação Ci/Ca nos tratamentos com GF267, independente da inoculação. Valores elevados desta variável indicam que o CO₂ que está chegando às células do mesofilo não está sendo fixado na fase carboxilativa, possivelmente por danos em sua estrutura, reduzindo então a taxa fotossintética.

As avaliações de colonização das plantas de soja por *H. glycines* confirmaram a presença do fitonematoide apenas nas parcelas com plantas inoculadas. Em relação a quantificação do patógeno, a partir da análise de variância, foi possível observar efeitos dos tratamentos para as variáveis número de FGR (F, $P=0,0202$), CCS (F, $P<0,0001$), OPF (F, $P=0,0001$) e OPC (F, $P<0,0001$) (Figura 3). Como esperado observou-se efeito apenas do fator ‘inoculação’ para as variáveis FGR (F, $P=0,0052$) e OPF (F, $P<0,0001$), (Figura 3A e 3C). Já para as variáveis CCS e OPC, houve interação significativa entre os fatores avaliados (F, $P \leq 0,05$), com diferenças entre os tratamentos nas plantas inoculadas com *H. glycines*. É possível observar redução em CCS e OPC nos tratamentos com aplicação *Bacillus velezensis* de GF267 via semente (Figura 3B e 3D), porém nas variáveis FGR e OPF a aplicação não mostrou redução significativa.

Apesar da taxa fotossintética ser uma das variáveis afetadas pela infecção de soja por *H. glycines* (MATSUO et al., 2012), não se observou alterações sobre esta variável no presente estudo. A taxa fotossintética na cultura da soja aumenta gradativamente do estágio vegetativo para o reprodutivo, atingindo valores máximos no período de enchimento de grãos,

quando a demanda por fotoassimilados aumenta (MOURA et al., 2012). Ainda assim, foi possível observar efeito deletério da infecção por *H. glycines*, com redução na eficiência do uso da água e aumento da relação Ci/Ca aos 50 dias após a semeadura (40 dias após a inoculação).

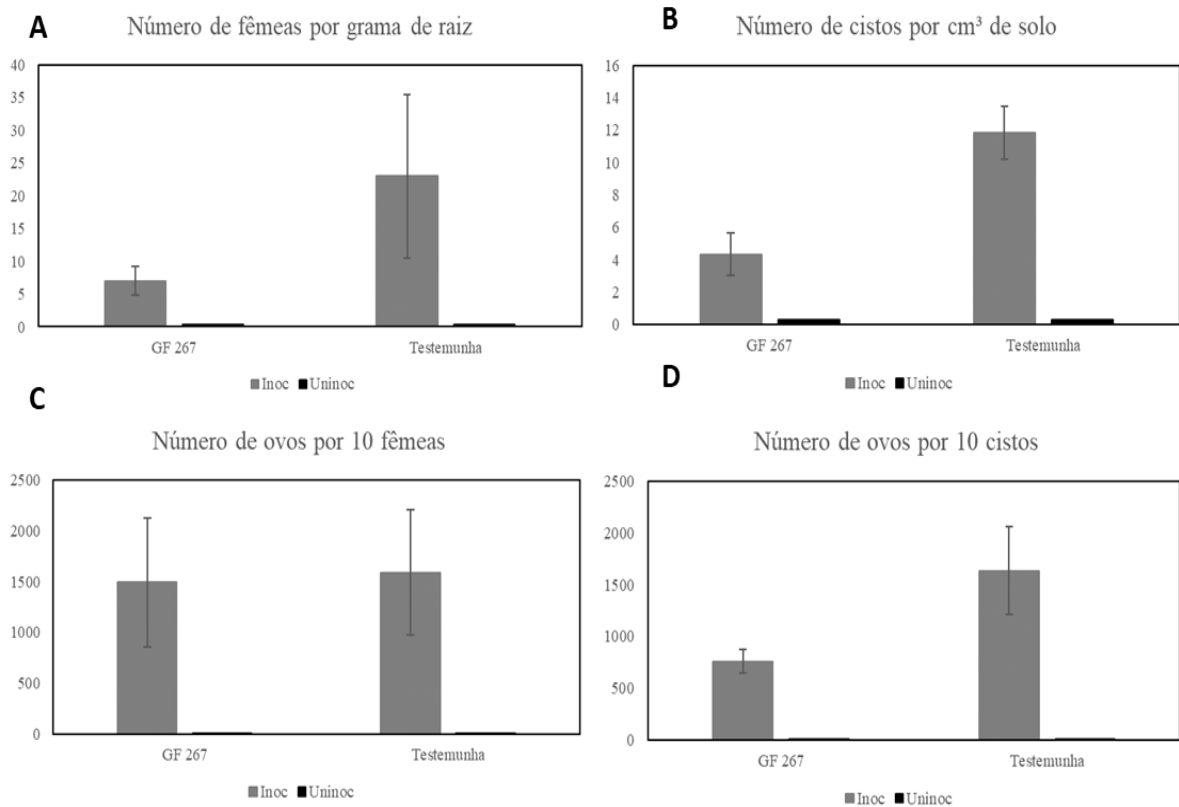


Figura 1. Inóculo de *Heterodera glycines* em raízes de soja em resposta à aplicação ou não de *Bacillus velezensis* GF267. Inoc = inoculado, Uninoc = não inoculado, GF 267 = tratamento de sementes com *B. velezensis* GF267. Barras verticais correspondem ao intervalo de confiança do teste T de *Student* ($P \leq 0,05$).

Agentes de controle biológico atuam como antagonistas à fitopatógenos de diferentes maneiras, seja por ação direta contra estes, indução de resistência ou promoção de crescimento (MACHADO et al., 2012). No presente estudo, observou-se redução no inóculo do patógeno em resposta ao tratamento de sementes por *B. velezensis* strain GF267. Estes resultados estão em acordo com os obtidos em diferentes trabalhos em que este gênero bacteriano proporcionou bons resultados no antagonismo contra fitonematóides (ARAÚJO et al., 2012; ZHOU et al., 2016; MACHADO; COSTA, 2017, XIANG et al., 2018). Xiang et al. (2017) observaram mortalidade superior a 50% de J2 de *H. glycines*, pelo antagonismo de 13 espécies de *Bacillus*, o que indica ser este grupo de antagonistas extremamente promissor na

redução do impacto deste patógeno sobre em cultivos de soja.

Foi possível confirmar a infecção das raízes por *H. glycines* por meio da técnica de coloração das raízes com fucsina ácida (Figura 4). Além das fêmeas coletadas pelos métodos de extração e dos cistos coletados no solo, observou-se a presença de juvenis de segundo e terceiro estágio no interior das raízes.



Figura 2. Indivíduos de *H. glycines* em raízes de soja, cultivar suscetível Desafio RR. A– juvenil de terceiro estágio (J3), testemunha não tratada com GF 267. B- juvenil de segundo estágio (J2), tratamento com *B. velezensis* C– juvenil de segundo estágio, testemunha não tratada com GF 267.

Em relação à atividade das enzimas LIPOX e PAL, foi possível observar efeito do tratamento com GF267 logo na primeira avaliação, antes mesmo da inoculação (Tabela 5).

Tabela 5. Níveis de significância obtidos após a análise de variância em relação ao efeito do tratamento das sementes com *Bacillus velezensis* GF267 e da inoculação com *Heterodera glycines* sobre a atividade das enzimas lipoxigenase (LIPOX), fenilalanina amonialiase (PAL), β 1,3-glucanase (GLU), Quitinase (QUI) e catalase (CAT) em plantas de soja aos 0, 48, 96, 144, 192 e 240 após a inoculação.

Horas após a inoculação ¹	LIPOX	PAL	GLU	QUI	CAT
0	<0,0001 ²	0,0010	<0,0001	<0,0001	0,2113
48	0,1401	0,3267	<0,0001	0,0526	0,0027
96	0,0006	0,0004	0,0425	0,0001	<0,0001
144	0,0027	0,6326	0,0541	0,0502	<0,0001
192	<0,0001	0,0152	0,0013	0,0011	0,0013
240	0,7616	0,4387	0,0042	0,0013	0,2010

¹ Inoculação realizada 10 dia após a semeadura. ² p-valor.

Observou-se maior atividade das enzimas LIPOX e PAL nas plantas que receberam tratamento das sementes com GF267 (Figuras 5A e 5B). Quanto às interações dos fatores

tratamento e inoculação para a enzima PAL houve aumento às 192 horas, além de observar resultados para a enzima CAT que foi inoculada e não tratada apresentar um aumento nas 96, 144 e 192 horas. Para as enzimas GLU, QUI e CAT observou-se efeito contrário em relação ao tratamento com GF267, com baixa expressão da atividade enzimática quando comparado ao tratamento controle em que houve aumento da atividade das enzimas analisadas (Figuras 5C, 5D e 5E).

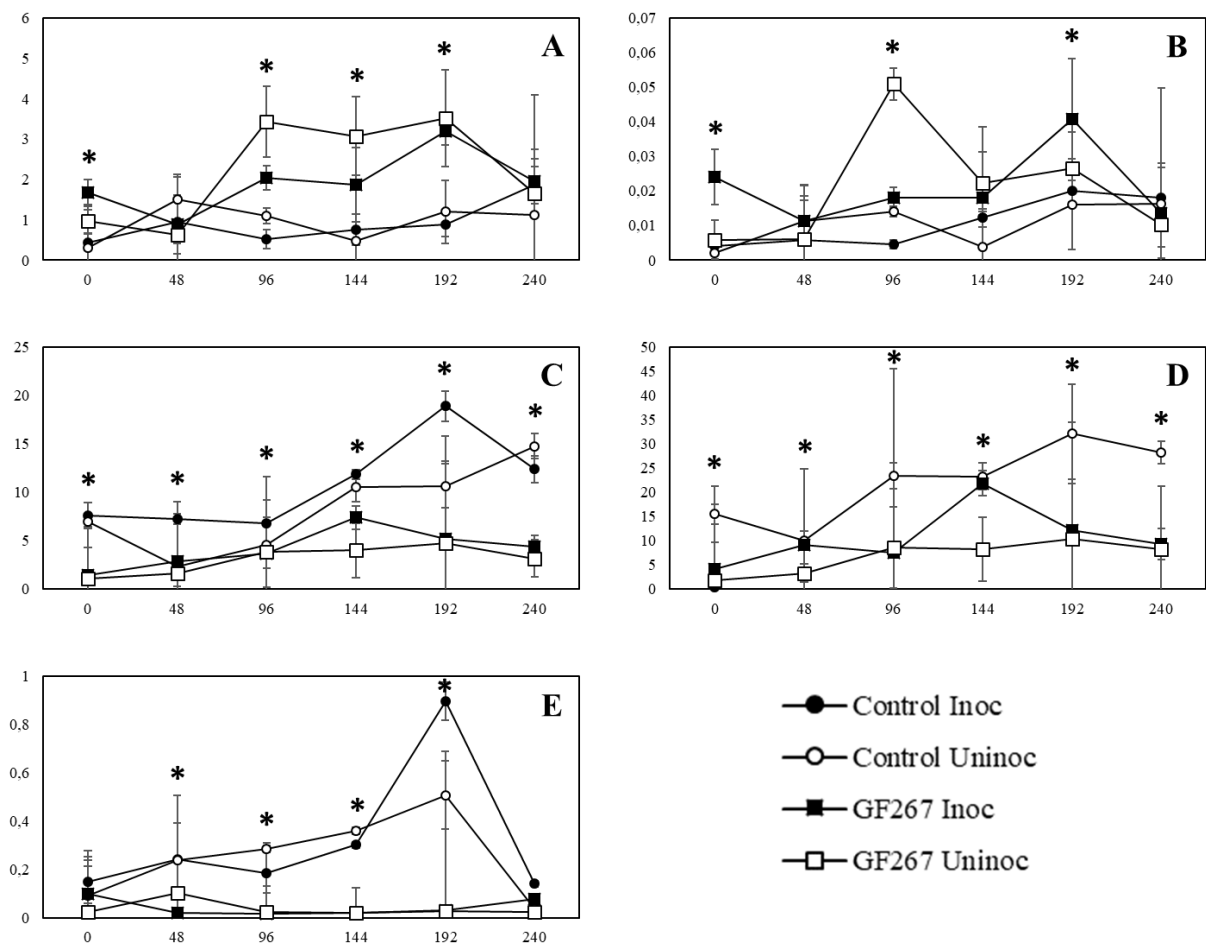


Figura 3. Atividade ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$) das enzimas lipoxigenase (A), fenilalanina amônia-lyase (B), glucanase (C), quitinase (D) e catalase (E) em plantas de soja em resposta ao tratamento das sementes com *Bacillus velezensis* GF 267 e inoculação aos 10 dias da semeadura por *Heterodera glycines* observadas às 0, 48, 96, 144, 192 e 240 horas após a inoculação. Inoc = inoculado, Uninoc = não inoculado, GF267 = tratamento das sementes com *B. velezensis* GF 267. *Houve efeito dos fatores avaliados sobre a atividade enzimática (F, $P \leq 0,05$). Barras verticais correspondem ao intervalo de confiança do teste T de Student ($P \leq 0,05$).

A menor atividade destas enzimas nas plantas que receberam tratamento por semente

de GF267 foi observada em quase todas as avaliações, com exceção para a CAT nas avaliações as 0 e 240 horas após a inoculação, quando não se observou efeito dos fatores avaliados sobre esta variável. O efeito da inoculação de *H. glycines* para estas enzimas foi observado em algumas avaliações após 48 horas da inoculação. Para GLU, 48 após a inoculação, observou-se interação entre os fatores avaliados (F, $P=0,0025$), com maior atividade enzimática nas plantas inoculadas no tratamento controle (F, $P<0,0001$), sem diferenças entre plantas inoculadas e não inoculadas em plantas tratadas com GF267 (F, $P=0,1399$).

Só houve diferença entre os tratamentos em plantas inoculadas (F, $P<0,0001$), com maior atividade no tratamento controle (Figura 5C). Observou-se efeito da inoculação na atividade da QUI nas avaliações às 96 (F, $P=0,00183$) e 144 (F, $P=0,0398$) horas após a inoculação, com aumento da atividade enzimática nesta última avaliação nas plantas inoculadas. Para CAT, não se observou efeito da inoculação quanto à atividade desta enzima (F, $P\leq 0,05$).

Espécies de rizobactérias do gênero *Bacillus* possuem a capacidade de invadir os tecidos internos das plantas, isto é, são bactérias endofíticas facultativas, com parte do seu ciclo realizado fora da planta hospedeira (PAGE et al., 2019). Alterações nas atividades de enzimas-chave, como as lipoxigenases, as peroxidases, a fenilalanina amônia-liase, as β -1, 3-glucanases e as quitinases, permitem acompanhar o estado de indução de resistência em plantas expostas a patógenos e atribui-se a essas enzimas a função de respostas contra patógenos e ferimentos (ALMEIDA et al., 2012).

O início do processo de colonização das raízes de soja por *B. velezensis* GF267 aplicado via semente pode ter promovido o aumento da atividade destas enzimas, de maneira independente à infecção por *H. glycines*. O fato de se observar maior atividade destas enzimas em plantas tratadas na avaliação anterior à inoculação corrobora para esta afirmação. As plantas podem reconhecer padrões moleculares associados à microrganismos e desencadear respostas de defesa sistêmica, mesmo não sendo este um fitopatógeno (ZHOU et al., 2016).

Se este processo levar a uma condição momentânea de estresse, pode haver redução da condutância estomática e, por consequência, de processos de trocas gasosas como a transpiração (SILVA et. al, 2013). Entretanto, no caso de microrganismos benéficos, estas alterações podem ser temporárias, haja vista que para que haja a interação, estas barreiras devem ser vencidas. Isso justifica o fato da redução na transpiração e na condutância

estomática em resposta à aplicação do antagonista ter sido observada apenas na segunda avaliação, aos 30 dias após a semeadura.

A quitinase é uma enzima que atua diretamente na proteção vegetal, enzima lítica que hidrolisam a quitina e atua na defesa das plantas contra patógenos sendo elevadas nos tecidos vegetais em resposta à infecção e a tratamentos hormonais e químicos (PASCHOLATI, 2011). A colonização das plantas por bactérias se dá nos espaços intercelulares, próximo ao local de acúmulo destas enzimas, o que nos leva a imaginar que possa haver mecanismos em bactérias que suprimam o aumento da atividade desta enzima.

A catalase desempenha papel específico, protegendo as células dos efeitos tóxicos do excesso de H_2O_2 , sendo uma substância importantíssima para a defesa das plantas, funcionando tanto como um agente diretamente tóxico ao patógeno como molécula sinalizadora da expressão de vários genes de resistência (PATEL et al. 2011).

Quanto as atividades enzimáticas em efeito no controle de nematoide parasitas de plantas, Kath et al (2017) relata que a atividade de catalase em amostras tratadas com alguns isolados de *Trichoderma* spp. apresentou um aumento significativo no período de 72 horas após o surgimento, o que vem a corroborar com demais estudos que mostram que a colonização nas raízes por isolados de *Trichoderma* spp. podem aumentar os níveis de enzimas relacionadas à defesa vegetal (FREITAS et al., 2012; SZABÓ et al., 2012). A proteção vegetal através da produção dessas enzimas foi previamente observada no parasitismo causado por nematoides das galhas (SOUZA et al., 2015).

A ausência do efeito da interação entre aplicação do antagonista e inoculação do patógeno sobre os processos bioquímicos e fisiológicos estudados pode ser um indicativo de que a ação de *B. velezensis* strain GF267 sobre *H. glycines* seja resultado de uma ação direta do antagonista sobre o nematoide. A produção de metabólitos secundários por rizobactérias, tais como enzimas e toxinas, podem inibir a reprodução de nematoides, a eclosão e a sobrevivência de juvenis de *H. glycines* (XIANG et al., 2018). Além disso, estas podem transformar exsudatos radiculares em subprodutos, interferindo no processo de reconhecimento nematoide-planta (XIA et al., 2011). Metabólitos produzidos por espécies de *Bacillus* possuem efeito nematicida, inclusive com ação *in vitro* contra fitonematoides (MACHADO; COSTA, 2017).

A aplicação via tratamento de sementes permite que o antagonista esteja em contato com raízes logo no momento da germinação e da protusão radicular. Desta forma, a

associação por rizobactérias é favorecida e há uma proteção precoce contra fitonematoides. A eficiência foi observada no presente estudo para *H. glycines*, e já havia sido demonstrada para outras espécies, como no trabalho de Araujo et al. (2012), em que o uso de *B. subtilis*, via tratamento de sementes foi eficaz na redução do desenvolvimento do nematoide das galhas na cultura da soja.

CONCLUSÕES

Bacillus velezensis strain GF267 se mostra eficiente na redução de inóculos de *Heterodera glycines*, com redução do número de cistos no solo e de ovos por cisto. A aplicação do antagonista teve efeito positivo na eficiência do uso da água e na redução da razão entre a concentração interna e externa de CO₂, bem como promoveu maior atividade das enzimas lipoxigenase e fenilalanina amônia-liase, independente da inoculação ou não com *H. glycines*.

REFERÊNCIAS

- ABREU, J. A. S.; ROVIDA, A. F. S.; CONTE, H. Controle biológico por insetos parasitoides em culturas agrícolas no Brasil: Revisão de literatura. **Revista Uningá Review**, v. 22, n. 2, p. 22-25, 2015.
- ANDERSON, M. D.; PRASAD, T. K.; STEWART, C. R. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. **Plant Physiology**, v. 109, p. 1247-1257, 1995.
- ALMEIDA, J. A.; SOUZA, J. C.; ARAÚJO, F. G. Tratamento de sementes com abamectina e *Paecilomyces lilacinus* no manejo de *Heterodera glycines* na cultura da soja. **Multi-Science Journal**, v. 1, n. 4, p. 62-65, 2016.
- 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, n. 2, p. 220-224, 2012.
- ARAÚJO, F. G.; FERRARI, R. M.; SILVA, J. O.; MOREIRA, J. A. A.; ROCHA, M. R. Life Cycle of *Heterodera glycines* in Resistant and Susceptible Soybean. **Journal of Agricultural Science**, v. 11, n. 2, p. 507-515, 2019.
- BABU, R. C.; NGUYEN, B. D.; CHAMARERK, V.; SHANMUGASUNDARAM, P.; CHEZHIAN, P.; JEYAPRAKASH, P.; GANESH, S. K.; PALCHAMY, A.; SADASIVAM, S.; SARKARUNG, S.; WADE, L. J.; NGUYEN, H. T. Genetic analysis of drought resistance in rice by molecular markers: association between secondary traits and field performance. **Crop Science**, v. 43, n. 4, p. 1457-1469, 2003.
- BRAGA JUNIOR, G. M.; CHAGAS, L. F. B.; AMARAL, L. R. O.; MILLER, L. O.; CHAGAS JUNIOR, A. F. Efficiency of inoculation by *Bacillus subtilis* on soybean biomass and productivity. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 13, n. 4, p. 1-6, 2018.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BYBD JR., D. W.; KIRKPATRICK, T.; BARKER, K. R. An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. **Journal of Nematology**, v. 15, n. 1, p. 142-143, 1983.
- CAMPOS, H. D.; SILVA, J. R. C.; CAMPOS, V. P.; SILVA, L. H. C. P. D.; COSTA, L. S. A. S.; SILVA, W. J. R. D. Efeito da temperatura do solo na infectividade e reprodução de *Meloidogyne javanica* e *Heterodera glycines* em cultivares de soja. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 5, p. 900-907, 2011.

CONAB. Acompanhamento da safra brasileira de grãos - Safra 2018/19 - Oitavo levantamento. Brasília, v. 6, p. 1-132, 2019.

COSTA, E. M. D.; NÓBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F. D.; TROCHMANN, A.; FERREIRA, L. D. V. M.; MOREIRA, F. M. D. S. Promoção do crescimento vegetal e diversidade genética de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 9, p. 1275-1284, 2013.

DOMINGUES, M. S.; BERMANN, C.; MANFREDINI, S. A produção de soja no Brasil e sua relação com o desmatamento na Amazônia. **Revista Presença Geográfica**, v. 1, n. 1, p. 32-47, 2014.

FREITAS, M. A.; PEDROSA, E. M. R.; MARIANO, R. L. R.; MARANHÃO, S. R. V. L. Screening *Trichoderma* spp. as potential agents for biocontrol of *Meloidogyne incognita* in sugarcane. **Nematropica**, v. 42, n. 1, p. 115-122, 2012.

GRIGOLLI, J. F. J.; ASMUS, G. L. Manejo de Nematoides na Cultura da Soja. In: LOURENÇÃO, A. L. F.; GRIGOLLI, J. F. J.; MELOTTO, A. M.; PITOL, C.; GITTI, D. C.; ROSCOE, R. Tecnologia e Produção: Soja 2013/2014. 1 ed. Curitiba: Mediograf, p. 194-203, 2014.

HAMMERSCHMIDT, R. Cytological and biochemical aspects of the induced resistance response of cucumber to fungal pathogens. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, p. 253-254, 2001.

HYODO, H.; KURODA, H.; YANG, S. F. Induction of phenylalanine ammonia-lyase and increase in phenolics in lettuce leaves in relation to the development of russet spotting caused by ethylene. **Plant Physiology**, v. 62, p. 31-35, 1978.

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

JUHÁSZ, A. C. P.; PÁDUA, G. P.; WRUCK, D. S. M.; FAVORETO, L.; RIBEIRO, N. R. Desafios fitossanitários para a produção de soja. **Informe Agropecuário**, v. 34, n. 276, p. 66-75, 2013.

KATH, J.; DIAS-ARIEIRA, C. R.; FERREIRA, J. C. A.; HOMIAK, J. A.; SILVA, C. R. D.; CARDOSO, C. R. Control of *Pratylenchus brachyurus* in soybean with *Trichoderma* spp. and resistance inducers. **Journal of Phytopathology**, v. 165, n. 11-12, p. 791-799, 2017.

MACHADO, A. P.; COSTA, M. J. N. Biocontrole do fitonematoide *Pratylenchus brachyurus* in vitro e na soja em casa de vegetação por *Bacillus subtilis*. **Revista Biociências**, v. 23, n. 1, p. 83-94, 2017.

MACHADO, V.; BERLITZ, D. L.; MATSUMURA, A. T. S.; SANTIN, R. C. M.; GUIMARÃES, A.; SILVA, M. E.; FIUZA, L. M. Bactérias como agentes de controle biológico de fitonematoides. **Oecologia Australis**, v. 16, n. 2, p. 165-182, 2012.

MARINO, R. H.; SILVA, D. G. C. Controle do nematoide das galhas por *Pleurotus ostreatus* em alface. **Scientia Plena**, v. 9, n. 10, p. 1-6, 2013.

MATES, A. P. K.; PONTES, N. C.; HALFELD-VIEIRA, B. A. *Bacillus velezensis* GF267 as a multi-site antagonist for the control of tomato bacterial spot. **Biological Control**, v. 137, p. 1-8, 2019.

MATSUO, É.; SEDIYAMA, T.; OLIVEIRA, R. D.; CRUZ, C. D.; OLIVEIRA, R. D. C. T. Avaliação de genótipos de soja em relação ao nematoide de cisto. **Bragantia**, v. 71, n. 2, p. 173-181, 2012.

MOURA, J. Z.; PÁDUA, L. E. M.; MOURA, S. G.; TORRES, J. S.; SILVA, P. R. R. Escala de desenvolvimento fenológico e exigência térmica associada a graus-dia do feijão-caupi. **Revista Caatinga**, v. 25, n. 3, p. 66-71, 2012.

PAGE, A. P.; ROBERTS, M.; FÉLIX, M.; PICKARD, D.; PAGE, A.; WEIR, W. The golden death bacillus *Chryseobacterium nematophagum* is a novel matrix digesting pathogen of nematodes. **BMC Biology**, v. 17, n. 10, p. 1-13, 2019.

PAIS, A. K. L.; SILVA, J. R.; ALENCAR, F. C.; PEIXOTO, A. R.; SOUZA, J. C.; PAZ, C. D. Seleção de rizobactérias como promotoras de crescimento em melancia. **Scientia Plena**, v. 12, n. 4, 2016.

PAN, S. Q.; YE, X. S.; KUC J. A technique for detection of chitinase, beta-1,3-glucanase, and protein-patterns after a single separation using polyacrylamide-gel electrophoresis or isoelectrofocusing. **Phytopathology**, v. 81, p. 970-974, 1991.

PASCHOLATI, S. F. Fisiologia do parasitismo: como os patógenos atacam as plantas. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (ed). Manual de Fitopatologia. v. 1, 4 ed. São Paulo, Editora Agronômica Ceres, 2011. Cap. 34 – p. 543-591.

PATEL, P. K.; HEMANTARANJAN, A.; SARMA, B. K.; SINGH, R. Growth and antioxidant system under drought stress in Chickpea (*Cicer arietinum* L.) as sustained by salicylic acid. **Journal of Stress Physiology & Biochemistry**, v. 7, n. 4, p. 130-144, 2011.

RODRIGUES, V. A.; SANTOS, R. K. A.; BARBOSA, A. J. V.; NOVAIS, D. B.; FERREIRA, J. S. Isolamento e inoculação de rizobactérias em mudas de *Eucalyptus urophylla*. **Revista Terra & Cultura: Cadernos de Ensino e Pesquisa**, v. 34, n. 67, p. 138-149, 2019.

SCHEWE, T.; RAPOPORT, S. M.; KUHN, H. Enzymology and physiology of reticulocyte lipooxygenase: comparison with other lipooxygenases. **Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol**, v. 58, p. 191-272, 1986.

SHEPHERD, A. M. Extraction and estimation of Heterodera. In: SOUTHEY, J. F. Laboratory methods for work with plant and soil nematodes. London, UK: Ministry of Agriculture Fisheries and Food; Her Majesty's Stationery Office. p. 23, 1970.

SHI, Z.; LIU, S.; NOE, J.; ARELLI, P.; MEKSEM, K.; LI, Z. SNP identification and marker assay development for high-throughput selection of soybean cyst nematode resistance. **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, p. 314, 2015.

SILVA, A. R. A.; BEZERRA, F. M. L.; LACERDA, C. F.; PEREIRA FILHO, J. V.; FREITAS, C. A. S. Trocas gasosas em plantas de girassol submetidas à deficiência hídrica em diferentes estádios fenológicos. **Revista Ciência Agronômica**, v. 44, n. 1, p. 86-93, 2013.

SILVA, R. A.; NUNES, N. A.; SANTOS, T. F. S.; IWANO, F. K. Efeito da rotação e sucessão de culturas no manejo de nematoides da soja em área arenosa. **Nematropica**, v. 48, n. 2, p. 198-206, 2018.

SOUZA, C. C. M.; PEDROSA, E. M. R.; ROLIM, M. M.; OLIVEIRA FILHO, R. A.; SOUZA, M. A. L. M.; PEREIRA FILHO, J. V. Crescimento e respostas enzimáticas do feijoeiro caupi sob estresse hídrico e nematoide de galhas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 19, n. 2, p. 113–118, 2015.

SZABÓ, M.; CSEPREGI, K.; GÁLBER, M.; VIRÁNYT, F.; FEKETE, C. Control plant-parasitic nematodes with *Trichoderma* species and nematode-trapping fungi: The role of chi18-5 and chi18-12 genes in nematode egg-parasitism. **Biological Control**, v. 63, n. 2, p. 121–128, 2012.

SZILAGYI-ZECCHIN, V. J.; MÓGOR, A. F.; RUARO, L.; RÖDER C. Tomato seedlings growth (*Solanum lycopersicum*) promoted by bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42 in organic system. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 38, n. 1, p. 26-33, 2015.

TIHOHOD, D. Nematologia agrícola aplicada. Jaboticabal: FUNEP. 2000.

VON CAEMMERER, S. V.; FARQUHAR, G. D. Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. **Planta**, v. 153, n. 4, p.376-387, 1981.

XIA, Y.; XIE, S.; MA, X.; WU, H.; WANG, X.; GAO, X. The *purL* gene of *Bacillus subtilis* is associated with nematicidal activity. **FEMS Microbiology Letters**, v. 322, n. 2, p. 99-107, 2011.

XIANG, N.; LAWRENCE, K. S.; DONALD, P. A. Biological control potential of plant growth-promoting rhizobacteria suppression of *Meloidogyne incognita* on cotton and *Heterodera glycines* on soybean: A review. **Journal of Phytopathology**, v. 166, n. 7-8, p. 449–458, 2018.

XIANG, N.; LAWRENCE, K. S.; KLOPPER, J. W. Biological control of *Meloidogyne incognita* by ppore-forming plant growth-promoting rhizobacteria on cotton. **Plant Disease**, v. 101, n. 5, p. 774–784, 2017.

ZHOU, L.; YUEN, G.; WANG, Y.; WEI, L.; JI, G. Evaluation of bacterial biological control agents for control of root-knot nematode disease on tomato. **Crop Protection**, v.84, p. 8-13, 2016.

ZUCARELI, C.; BARZAN, R. R.; SILVA, J. B. D.; CHAVES, D. P. Associação de fosfatos e inoculação com *Bacillus subtilis* e seu efeito no crescimento e desempenho produtivo do feijoeiro. **Revista Ceres**, v. 65, n. 2, p. 189-195, 2018.