



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

SILAS MIAN ALVES

***Bacillus velezensis* CMLL06:**
POTENCIAL PARA CONTROLE DE DOENÇAS DE SOLO NA
CULTURA DA SOJA

Londrina
2021

SILAS MIAN ALVES

***Bacillus velezensis* CMLL06:**
POTENCIAL PARA CONTROLE DE DOENÇAS DE SOLO NA
CULTURA DA SOJA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Orientador: Prof^a. Dr. Leandro Simões Azeredo Gonçalves

Coorientador: Dr. Rodrigo Thibes Hoshino

Londrina
2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

A474 Alves, Silas.
 Bacillus velezensis CMLL06: POTENCIAL PARA CONTROLE DE DOENÇAS DE SOLO NA CULTURA DA SOJA / Silas Alves. - Londrina, 2021.
 67 f. : il.

 Orientador: Leandro Simões Azeredo Gonçalves.
 Coorientador: Rodrigo Thibes Hoshino.
 Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2021.
 Inclui bibliografia.

 1. Controle biológico - Tese. 2. Nematoides - Tese. 3. Rizobactérias - Tese. I. Simões Azeredo Gonçalves, Leandro . II. Thibes Hoshino, Rodrigo. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. IV. Título.

CDU 63

SILAS MIAN ALVES

***Bacillus velezensis* CMLL06:**
POTENCIAL PARA CONTROLE DE DOENÇAS DE SOLO NA
CULTURA DA SOJA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Agronomia.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Leandro Simões Azeredo
Gonçalves
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Admilton Gonçalves de Oliveira Junior
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Dr. Andressa Cristina Zamboni Machado
Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná –
IDR-Paraná

Londrina, 26 de fevereiro de 2021.

Dedico este trabalho aos meus pais Marta Mian e José Raimundo, e a todos os familiares e amigos que torcem por mim.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Leandro, pela orientação e amizade; que contribuiu muito para minha formação.

Ao meu co-orientador Rodrigo Hoshino, que me ajudou muito durante esses dois anos.

À minha co-orientadora Andressa Machado, por todo apoio, ensinamentos e amizade.

Aos meus queridos pais, José Raimundo e Marta Mian, que sempre me apoiaram.

Aos meus irmãos Ramom, Hocmone, Tamar e principalmente a Perola, que sempre me incentivou a estudar.

Ao laboratório de nematologia do Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná (IDR – PR) e toda sua equipe, que me ajudaram muito.

Ao Laboratório de Ecofisiologia e Biotecnologia agrícola (LEBA), onde foi minha segunda casa.

Às amigas que fiz no LEBA: Leonel, Alison, Antoni, Luana, Aline, Suelem Renatinho, Hoshino, Mayara, os Jãos, Satie, Karolzinha, Douglas, Shimizo, Du e Renata.

Aos amigos da AgBio: Alan e Mirela.

Ao Boi, por todo o apoio na montagem do genoma bacteriano.

**Se você pensa que é um derrotado,
você será derrotado. Se não pensar “quero
a qualquer custo!” Não conseguirá nada.**

Napoleon Hill

ALVES, Silas Mian. ***Bacillus velezensis* CMLL06**: Potencial para controle de doenças de solo. 2021. 67 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

RESUMO

A soja (*Glycine max* (L.) Merr.) é considerada a principal oleaginosa cultivada no mundo, sendo o Brasil maior produtor e exportador dessa cultura, movimentando mais de U\$ 32 bilhões na safra 2019/2020. A produção da soja no Brasil é severamente limitada pelas restrições impostas por fatores bióticos e abióticos, destacando as doenças de solo devido a forte influência na produtividade e a dificuldade na erradicação. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial da cepa CMLL06 como biocontrole para diferentes patógenos de solo na cultura da soja. Nesse estudo incluí o sequenciamento bacteriano, mineração de genes responsáveis pela síntese de metabólitos secundários e a atividade antifúngica e nematicida desse isolado. Essa cepa foi obtida em amostras de solo no norte do Paraná, Brasil, e com base nas informações da identidade média de nucleotídeos e na hibridização digital DNA-DNA foi identificado como *Bacillus velezensis*. O genoma dessa cepa foi estimado em 3.981.409 pb com um teor de GC de 46,48% e apresentou 4047 sequências de DNA codificantes. Com base na informação do webserver antiSMASH 5.1.0, foram identificados 13 clusters de biossíntese de metabólitos secundários, no qual alguns desses têm um importante papel na supressão de patógenos e na promoção de crescimento da planta. A cepa CMLL06 apresentou atividade antifúngica *in vitro* (*Macrophomia phaseolina*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum*) e *in vivo* (*Sclerotinia sclerotiorum*), com incremento de 54 e 26% na germinação e no número de plântulas sadias de soja, respectivamente, quando comparado com o controle (com infecção). Em relação à supressão de nematoides na soja, apresentou uma porcentagem de controle de 69 e 60% para *Meloidogyne javanica* e *Pratylenchus brachyurus*, respectivamente. Com base nesses resultados, essa cepa tem um importante papel para o controle de doenças do solo na cultura soja, sendo promissor para o desenvolvimento de produtos comerciais.

Palavras-chave: *Glycine max* (L.) Merr.; controle biológico; *Sclerotinia sclerotiorum*; *Meloidogyne javanica* e *Pratylenchus brachyurus*.

ALVES, Silas Mian. ***Bacillus velezensis* CMLL06**: Potential to control soil-borne diseases. 2021. 66 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

ABSTRACT

Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) Is considered the main oilseed cultivated in worldwide, with Brazil being the largest producer and exporter of this crop, with a turnover of more than U \$ 32 billion in the 2019/2020 harvest. Soybean production in Brazil is severely limited by restrictions imposed by biotic and abiotic stress, highlighting soil diseases due to the strong influence on yield and the difficulty in eradication. In this context, the present study aimed to evaluate the potential of the CMLL06 strain as a biocontrol for different soil-borne pathogens in soybean. This study includes bacterial sequencing, mining of genes responsible for the synthesis of secondary metabolites and the antifungal and nematicidal activity of this strain. This strain was obtained from soil samples in northern Paraná, Brazil, and based on information on the average nucleotide identity and on digital DNA-DNA hybridization, it was identified as *Bacillus velezensis*. The genome of this strain was estimated at 3,981,409 bp with a GC content of 46.48% and presented 4047 coding DNA sequences. Based on information from the antiSMASH 5.1.0 webserver, 13 secondary metabolite biosynthesis clusters were identified, in which some of these have an important role in suppressing pathogens and promoting growth plant. The strain CMLL06 showed antifungal activity in vitro (*Macrophomia phaseolina*, *Rhizoctonia solani* and *Sclerotinia sclerotiorum*) and in vivo (*Sclerotinia sclerotiorum*), with an increase of 54 and 26% in germination and in the number of healthy soybean seedlings, respectively, when compared with the control (with infection). Regarding nematode suppression in soybean, it presented a control percentage of 69 and 60% for *Meloidogyne javanica* and *Pratylenchus brachyurus*, respectively. Based on these results, this isolate plays an important role in the control of soil-borne diseases in soybean crops, being promising for the development of commercial products.

Keywords: *Glycine Max* (L.) Merr.; Biological control; *Sclerotinia sclerotiorum*; *Meloidogyne Javanica* and *Pratylenchus Brachyurus*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – *Ranking* dos dez maiores produtores mundiais de soja (milhões de toneladas).17
- Figura 2** – Principais doenças causadas por fungos e nematoides que incidem na cultura da soja.....19
- Figura 3** – Galhas formadas no sistema radicular de planta de soja parasitada por *Meloidogyne* spp.24
- Figura 4** – Ciclo de vida de *Meloidogyne* spp.....26
- Figura 5** – *Pratylenchus brachyurus* juvenil.....27
- Figura 6** – Microrganismos base de biofungicidas comerciais, com destaque a *Bacillus* spp. e *Trichoderma* spp.....33
- Figura 7** – Microrganismos-base dos bionematicidas comerciais registrados, com destaque a espécies do gênero *Bacillus*.....37
- Figura 8** – Árvore filogenômica da similaridade entre os isolados do grupo *Bacillus subtilis*. A matriz foi gerada pelo GENE e exportada para SplitsTree.....47
- Figura 9** – Representação circular do genoma da cepa *Bacillus velezensis* CMLL06 usando o programa BRIG.....49
- Figura 10** – Inibição do crescimento micelial (%) para *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum* pela cepa CMLL06. Os dados estão representados pelo gráfico de barras.....51
- Figura 11** – Inibição do crescimento micelial (%) da *Sclerotinia sclerotiorum* utilizando o fermento autoclavado (15 min, 120 °C) e o sobrenadante livre de células da cepa *Bacillus velezensis* CMLL06.....52
- Figura 12** – Porcentagem de germinação e sementes sadias de soja inoculadas com diferentes produtos e, posteriormente, infectada com *Sclerotinia sclerotiorum*.53
- Figura 13** – Fator de reprodução e nematoide por grama de raiz em soja inoculadas com diferentes produtos via tratamento de semente e, posteriormente, inoculadas com *Meloidogyne javanica* (A e B) e *Pratylenchus brachyurus* (C e D).54

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 – Características do genoma <i>Bacillus velezensis</i> CMLL06 | 46 |
| Tabela 2 – Comparação do genoma da cepa CMLL06 com outras espécies de <i>Bacillus</i> . ¹ dDDH: Hibridização digital DNA-DNA, ANI: identidade média de nucleotídeos, GC: conteúdo de guanina e citosina no genoma, e Bp: tamanho do genoma em gigabases (10 ⁶)..... | 48 |
| Tabela 3 – Genes codificadores de biomoléculas encontrados no genoma da cepa CMLL06 identificado por meio do webserver antSMASH..... | 50 |

SUMÁRIO

| | | |
|------------|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 14 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA | 16 |
| 2.1 | IMPORTANCIA ECONÔMICA DA SOJA | 16 |
| 2.2 | PRINCIPAIS DOENÇAS DA CULTURA DA SOJA..... | 18 |
| 2.2.1 | DOENÇAS FÚNGICAS DE SOLO | 19 |
| 2.2.2 | NEMATOIDES | 22 |
| 2.2.2.1 | NEMATOIDES DAS GALHAS | 23 |
| 2.2.2.2 | NEMATOIDES DAS LESÕES RADICULARES..... | 26 |
| 2.3 | FORMAS DE CONTROLE DE DOENÇAS DO SOLO | 28 |
| 2.3.1 | CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS DO SOLO..... | 31 |
| 2.5 | <i>BACILLUS</i> SPP..... | 34 |
| 3 | ARTIGO | 39 |
| 3.1 | MATERIAL E MÉTODOS | 39 |
| 3.4.1 | ORIGEM DA CEPA CMLL06..... | 39 |
| 3.4.2 | IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR | 39 |
| 3.4.3 | PREDIÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS | 40 |
| 3.4.4 | ENSAIO DE ANTAGONISMO DIRETO POR CULTURA DUPLA..... | 41 |
| 3.4.5 | ATIVIDADE DO FERMENTADO AUTOCLAVADO E DO SOBRENADANTE LIVRE DE CÉLULAS DA CMLL06 SOBRE O CRESCIMENTO MICELIAL DE <i>SCLEROTINIA SCLEROTIORUM</i> | 42 |
| 3.4.6 | ATIVIDADE DA CEPA CMLL06 SOBRE <i>SCLEROTINIA SCLEROTIORUM</i> EM SEMENTES DE SOJA | 43 |
| 3.4.7 | PREPARO DO INÓCULO PARA O ENSAIO DE CONTROLE DE NEMATOIDES | 44 |
| 3.4.7.1 | ENSAIOS PARA CONTROLE DE NEMATOIDES | 44 |
| 3.5 | Resultados | 45 |
| 3.5.1 | CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA..... | 45 |
| 3.5.3 | MONTAGEM E ANOTAÇÃO DO GENOMA | 45 |
| 3.5.4 | IDENTIFICAÇÃO DO ISOLADO E ANÁLISE FILOGENÉTICA..... | 46 |
| 3.5.5 | ANÁLISE ANTI-SMASH DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS..... | 49 |
| 3.5.6 | ATIVIDADE ANTIFÚNGICA..... | 51 |

| | | |
|-------|----------------------------|----|
| 3.5.7 | ATIVIDADE NEMATICIDA | 54 |
| 3.6 | Discussão | 55 |
| 5 | REFERÊNCIAS | 59 |

1. INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merr.) é considerada a principal oleaginosa cultivada no mundo, com um total de 364 Mt de grãos produzidos em 2020 (USDA, 2020). O Brasil, contribui com aproximadamente 133 Mt, com um aumento de aproximadamente 7,12 Mt ano⁻¹ e 91,41 Kg ha ano⁻¹ durante os últimos dez anos (CONAB, 2020). Mesmo com esse cenário positivo, a produtividade e a distribuição espacial da cultura da soja são severamente limitadas pelas restrições impostas por fatores bióticos e abióticos (HARTMAN *et al.*, 2015; REIS *et al.*, 2020).

Dentre os fatores bióticos, as doenças de solo têm sido reconhecidas como um dos principais fatores limitantes para cultura da soja, devido à forte influência na produtividade e à dificuldade na erradicação de alguns patógenos em sistemas de cultivo (WEN *et al.*, 2017; CORATO, 2020). Recentemente, SAVARY *et al.* (2019) revelaram que as perdas de produtividade ocasionadas por doenças e pragas na cultura da soja podem variar entre 11 a 32,4%, sendo que as doenças de solos têm um importante impacto sobre a cultura.

Dentre as principais doenças fúngicas do solo para cultura da soja no Brasil destacam-se o mofo-branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) (WILLBUR *et al.*, 2019), a podridão radicular (*Rhizoctonia solani*) (BLANCO *et al.*, 2018), a podridão do carvão (*Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid) (REIS *et al.*, 2014) e a síndrome da morte súbita (*Fusarium* sp.) (COSTA *et al.*, 2016). Por exemplo, para *S. sclerotiorum* estima-se que cerca de 30% da área semeada (~10 milhões de ha) de soja no Brasil estejam infestadas, provocando perdas econômicas anuais estimadas de US\$ 1,47 bilhão devido à redução no rendimento e no custo de fungicidas (LEHNER *et al.*, 2017).

Para os nematoides, os principais problemas ocasionados na cultura da soja no Brasil são devidos ao ataque dos nematoides de galhas (*Meloidogyne javanica* e *M. incognita*), do nematoide de cisto (*Heterodera glycines*), do nematoide reniforme (*Rotylenchulus reniformis*) e do nematoide das lesões radiculares (*Pratylenchus brachyurus*) (DIAS *et al.*, 2010; MACHADO, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2021). Segundo a Sociedade Brasileira de Nematologia (SBN), os nematoides podem provocar prejuízos anuais de US\$ 6,5 bilhões para o agronegócio brasileiro, sendo que para a cultura da soja esse prejuízo pode chegar a US\$ 3,0 bilhões.

O manejo das doenças de solo é de difícil controle devido às características ecológicas, o que torna importante a realização do manejo integrado, que inclui a rotação ou sucessão de culturas não hospedeiras, a utilização de cultivares resistentes ou tolerantes e os controles químico e biológico (KATAN, 2017; PANTH *et al.*, 2020). Dentre essas medidas de controle, o controle biológico vem sendo cada vez mais utilizado na supressão de patógenos do solo devido à sua eficiência de controle, baixo impacto ambiental e aos seus efeitos diretos na planta, como por exemplo, indução de resistência local/sistêmica e promoção de crescimento vegetal (RAHMAN *et al.*, 2018; TEIXEIRA *et al.*, 2021). Além disso, o custo para o desenvolvimento de um produto comercial biológico é 75X menor quando comparado com o químico sintético (RAM *et al.*, 2018).

No Brasil, é observado um crescimento substancial no número de registros de produtos biológicos para controle de doenças em plantas, destacando os gêneros *Trichoderma* e *Bacillus* (AGROFIT, 2020). O gênero *Bacillus* representa um grande grupo de bactérias gram-positivas que pertencem ao filo Firmicutes e vêm se destacando na agricultura devido ao seu metabolismo secundário diversificado e à capacidade de produzir uma ampla gama de substâncias antagonistas diferentes estruturalmente (FIRA *et al.*, 2018). Por exemplo, o isolado *B. velezensis* FZB42 tem aproximadamente 8% do seu genoma envolvido na produção de metabólitos secundários, incluindo bacteriocinas, peptídeos antimicrobianos e lipopeptídeos, policetídeos e sideróforos que, ao mesmo tempo, mostram propriedades promotoras de crescimento vegetal (FAN *et al.*, 2018; YE *et al.*, 2018).

Considerando os avanços do controle biológico nos últimos anos e o aumento da demanda desses produtos no mercado, esse estudo teve como objetivo avaliar o potencial da cepa *Bacillus velezensis* CMLL06 como biocontrole para patógenos de solo na cultura da soja, com destaque para *S. sclerotiorum*, *M. javanica* e *P. brachyurus*. Além disso, nesse estudo também incluiu-se o sequenciamento do genoma da bactéria e a mineração dos genes responsáveis pela síntese de metabólitos secundários.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 IMPORTANCIA ECONÔMICA DA SOJA

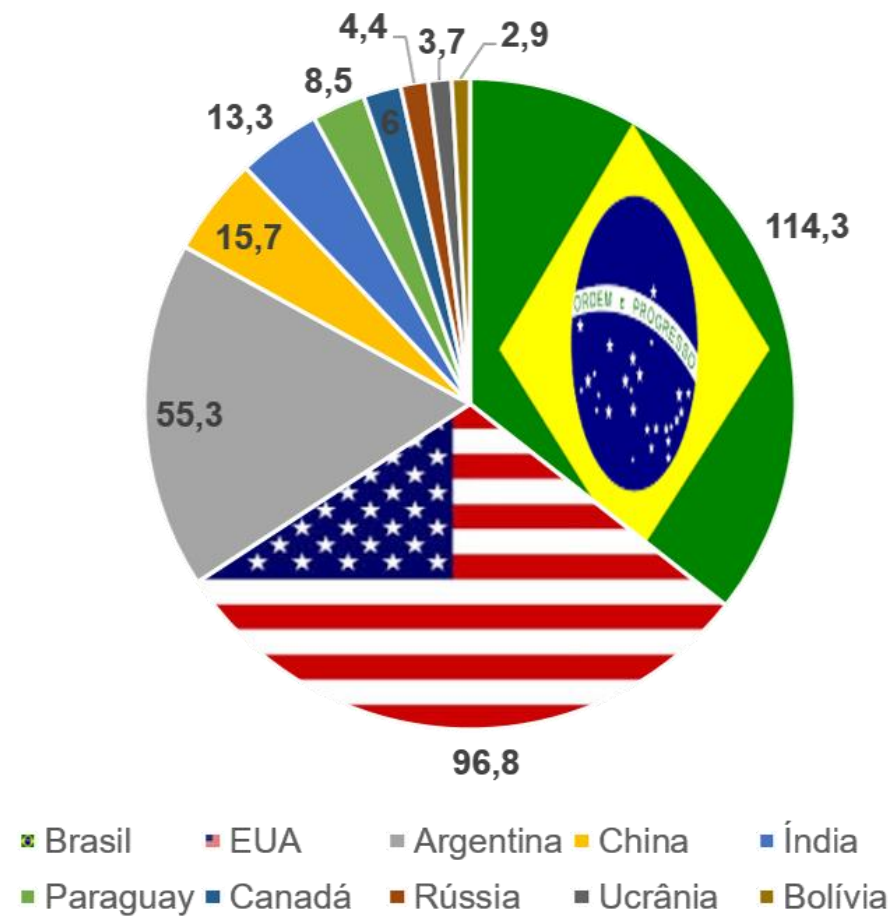
A soja é originária do continente asiático, mais especificamente da China, pertence à divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, ordem Fabales, família Leguminosae, subfamília Papilionoideae, gênero *Glycine* e espécie *Glycine max*. Apresenta número de cromossomos $2n = 40$, é autógama, anual, herbácea, ereta, apresenta crescimento morfológico diversificado, com número variado de ramificações. Seu ciclo é de 80 a 150 dias, dependendo do genótipo e das condições edafoclimáticas (SEDIYAMA, TEIXEIRA e BARROS, 2009).

No cenário agrícola mundial, a soja é considerada a principal oleaginosa produzida e o quarto produto entre as oleaginosas mais utilizado para consumo humano (FAO, 2020). Seus grãos são amplamente utilizados na agroindústria (produção de óleo vegetal e rações para alimentação animal), indústria química e de alimentos. Também é uma potencial fonte alternativa de biocombustível e tem sido utilizada principalmente nos Estados Unidos, sendo que, em 2016, mais de 55% da produção de biodiesel foi da matéria prima “soja” (KIM, 2018).

A soja é considerada uma das mais importantes *commodities* produzidas e comercializadas no mundo, sendo produzida em mais de 60 países (CONAB, 2019). A produção mundial é de aproximadamente 333,7 milhões de toneladas, numa área de 120,5 milhões de hectares, movimentando 107,8 milhões de dólares anualmente. O Brasil é o maior produtor mundial (Figura 1), com produção aproximada de 114,3 milhões de toneladas, numa área de 35,9 milhões de hectares. O segundo maior produtor são os Estados Unidos e, somando-se sua produção à do Brasil, tem-se 63,3% da soja produzida no mundo (FAO, 2020).

A soja é a principal cultura no Brasil, tanto em extensão territorial quanto em volume produzido. Representa 50% dos grãos produzidos no país, o que a torna o produto mais importante para a balança comercial nacional, fazendo do Brasil o maior exportador do grão. O montante das exportações brasileiras em 2018 foi de 239,26 bilhões de toneladas e a exportação de soja foi responsável por 40,64 bilhões de toneladas (CONAB, 2019).

Figura 1. *Ranking* dos dez maiores produtores mundiais de soja (milhões de toneladas).



Fonte: FAO (2021)

A cultura é produzida na maior parte do território brasileiro, principalmente nas regiões Centro Oeste, Sul e Sudeste, sendo os maiores produtores nacionais o estado do Mato Grosso, cuja produção é de 35,885 milhões de toneladas, numa área de 10,004 milhões de hectares; o Paraná, com produção de 21,598 milhões de toneladas, numa área de 5,503 milhões de hectares; Goiás, com 13,159 milhões de toneladas, numa área de 3,545 milhões de hectares; e o Rio Grande do Sul, com 11,444 milhões de toneladas, numa área de 5,902 milhões de hectares (CONAB, 2020).

A oleaginosa é o principal produto agrícola do Paraná e representa metade dos grãos produzidos no estado, apresentando em 2019 valor bruto de produção de 19,94 bilhões de reais. Na última safra (2019/2020), o estado produziu o maior volume de soja da sua história, o que o classificou como segundo maior produtor brasileiro. A produtividade obtida foi de 3792 quilos por hectare e o volume produzido

representou aproximadamente 17% da produção nacional. Mais da metade da produção é exportada, sendo a China o principal destino, com aproximadamente 90% do total, seguida pelo Paquistão, Bangladesh, Tailândia e Vietnã. Os três municípios maiores produtores, de acordo com a safra 2019, foram: Tibagi, que gerou renda de 444,6 milhões de reais, seguido por Cascavel, que gerou renda de 399,0 milhões de reais e Guarapuava, com renda de 335,6 milhões (DERAL, 2021).

2.2 PRINCIPAIS DOENÇAS DA CULTURA DA SOJA

Concomitantemente ao aumento da produção de soja, a incidência de pragas e doenças na cultura é crescente, sendo esses os principais fatores que limitam sua produtividade. Isso é consequência da expansão das áreas de produção, principalmente em novas regiões, utilização de cultivares com baixa variabilidade genética e da intensificação do monocultivo (BARROS, 2009).

No mundo, já foram listadas mais de 100 doenças (SINCLAIR; BECKMAN, 1989) e, aproximadamente 50 delas, causadas por fungos, vírus, bactérias e nematoides, já foram identificadas no Brasil (YORINORI, 2002). A importância econômica de cada doença varia de ano para ano e de região para região, dependendo das condições climáticas de cada safra. As perdas anuais causadas por doenças na cultura são estimadas em cerca de 15 a 20%, mas há doenças que podem resultar em perdas de até 100% da produção (EMBRAPA, 2007).

As principais viroses que acometem a cultura da soja são: mosaico cálico (*Alfalfa Mosaic Virus* - AMV), mosqueado do feijão (*Bean Pod Mottle Virus* - BPMV), mosaico comum da soja (*Soybean Mosaic Virus* - SMV), necrose da haste (*Cowpea Mild Mottle Virus* - CPMMV) e queima do broto (*Tobacco Streak Virus* - TSV).

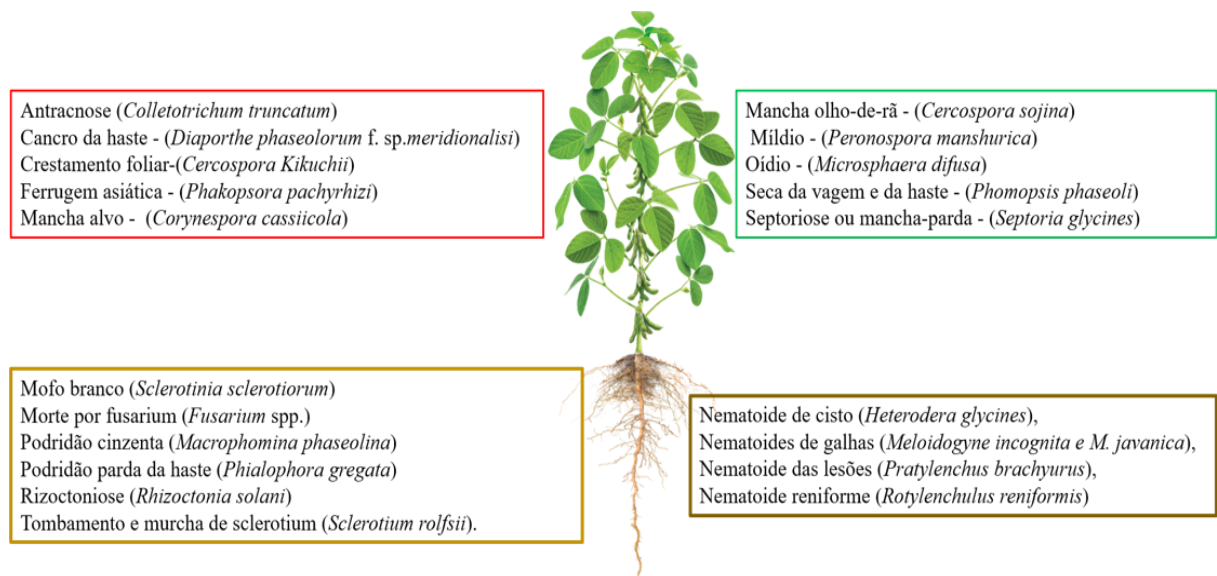
As principais doenças bacterianas ocorrentes na cultura são: crestamento bacteriano (*Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*), fogo selvagem (*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*) e pústula bacteriana (*Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*) (ITO, 2013).

A maioria das doenças que incidem na cultura da soja são causadas por fungos, sendo os que incidem na parte aérea a antracnose (*Colletotrichum truncatum*), cancro da haste (*Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*) crestamento foliar e mancha púrpura da semente (*Cercospora kikuchii*), ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*), mancha alvo (*Corynespora cassiicola*), mancha olho-de-rã

(*Cercospora sojina*), míldio (*Peronospora manshurica*), oídio (*Microsphaera diffusa*), seca da vagem e da haste (*Phomopsis phaseoli*) e septoriose ou mancha-parda (*Septoria glycines*) (Figura 2) (ITO, 2013).

Os nematoides são patógenos muito importantes para a soja e, a cada ano, têm ganhado mais relevância, tendo em vista a sua disseminação pelo país, bem como sua agressividade para a cultura. Mais de 100 espécies de nematoides, envolvendo cerca de 50 gêneros, já foram relatados parasitando soja em todo o mundo. No Brasil, os que a parasitam são o nematoide de cisto (*Heterodera glycines*), os nematoides de galhas (*Meloidogyne incognita* e *Meloidogyne javanica*), o nematoide das lesões (*Pratylenchus brachyurus*) e o nematoide reniforme (*Rotylenchulus reniformis*) (Figura 2) (HENNING *et al.*, 2014).

Figura 2: Principais doenças causadas por fungos e nematoides que incidem na cultura da soja.



2.2.1 DOENÇAS FÚNGICAS DE SOLO

Patógenos de solo são definidos como organismos que habitam no solo a maior parte do seu ciclo de vida, podem sobreviver um longo período no solo na ausência de hospedeiros, apresentam capacidade de competição saprofítica e seus estádios de disseminação e sobrevivência confinados no solo, apesar de alguns

apresentarem capacidade de produzir esporos disseminados pelo ar ou pela água (MICHEREFF, ANDRADE e MENESES, 2005).

As doenças de solo estão entre as principais responsáveis pelos danos econômicos causados por doenças na agricultura (MICHEREFF ANDRADE e MENESES, 2005) e, dentre elas, as causadas por fungos estão entre as de destaque. Os fungos constituem o maior grupo de habitantes do solo, causando doenças nos mais diversos ambientes agrícolas, em todas as culturas cultivadas, com variados tipos de sintomas (WHEELER e RUSH, 2001).

Muitos fungos habitantes de solo possuem alta competição saprofítica, o que lhes permite sobreviverem em restos culturais em alta densidade populacional. Nesse ambiente, há fungos que produzem agregados miceliais, escleródios, oósporos, clamidósporos ou outros tipos de esporos, que são resistentes à condições adversas, permanecendo viáveis na ausência de plantas hospedeiras. Tais características tornam difícil a erradicação desses fungos quando estabelecidos numa área. (WHEELER e RUSH, 2001).

As principais doenças causadas por fungos habitantes do solo na cultura da soja são: mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*), morte por fusarium (*Fusarium* spp), podridão cinzenta (*Macrophomina phaseolina*), podridão parda da haste (*Phialophora gregata*), rizoctoniose (*Rhizoctonia solani*) e tombamento e murcha de sclerotium (*Sclerotium rolfsii*) (GODOY, 2016).

O mofo branco, apresenta mais de 400 espécies de plantas hospedeiras. Toda parte aérea da planta pode ser afetada, porém, as infecções iniciam-se frequentemente em pétalas caídas nas axilas das folhas e dos ramos laterais. Os sintomas característicos são a murcha seca das folhas e a podridão aquosa da haste. Sobre a parte afetada pode-se desenvolver micélio branco e estruturas de resistência denominadas escleródios, que apresentam tamanho variável e podem ser formados tanto na superfície quanto no interior das hastes e das vagens infectadas (ITO, 2013; HENNING, 2014).

A fase mais suscetível da planta compreende do estágio de florescimento pleno ao início da formação de vagens. A ocorrência do fungo é favorecida por temperaturas amenas e alta umidade relativa, de 10 a 21°C, condições em que os escleródios germinam e desenvolvem apotécios na superfície do solo. Estes produzem ascósporos que são liberados no ar e são responsáveis por infectar as plantas. A doença é de difícil controle, pois o fungo ataca a planta tanto por via

aérea, por meio dos ascósporos, quanto via solo, por meio da germinação de escleródios (ITO, 2013; HENNING, 2014).

A morte por *fusarium* pode ser causada por diversas espécies de fungos do gênero *Fusarium*, podendo ocorrer no estágio inicial da cultura e no estágio reprodutivo. As plantas afetadas apresentam amarelecimento foliar e, com o progresso da doença, podem evoluir até a morte. Em condição de alta umidade, forma-se micélio branco sobre a haste, onde são formadas estruturas de resistência, os clamidósporos. As condições ideais para o desenvolvimento do fungo são alta umidade, temperaturas entre 20 e 28°C e solos com pH abaixo de 6. *Fusarium* spp. podem sobreviver em sementes e restos culturais. Visto isso, são recomendados a utilização de sementes saudáveis, o tratamento de sementes, incorporação de restos culturais e a rotação de culturas (ITO, 2013).

O fungo *Macrophomina phaseolina* é amplamente disseminado, tem centenas de espécies de plantas como hospedeiras e produz estruturas de resistência denominadas microescleródios, que lhe permite sobreviver sob condições adversas. A ocorrência da podridão cinzenta é favorecida em condições de estresse hídrico e temperaturas entre 28 e 35°C. Os sintomas característicos são a podridão da haste acima do solo, das raízes e, com o avanço da doença, são formadas estruturas de reprodução do fungo. Em caso de alta severidade, pode ocorrer desfolha prematura, má formação de vagens e até a morte da planta. O fungo pode sobreviver em sementes, nos restos culturais e no solo (ITO, 2013). Cultivos em solos compactados resultam em plantas com sistema radicular superficial e, conseqüentemente, apresentam menor tolerância à seca, tornando-as mais fracas e, portanto, mais suscetíveis ao patógeno (HENNING, 2014).

A podridão parda da haste (*Phialophora gregata*) se desenvolve mais rápido em plantas mais velhas e é mais crítica em cultivos intensivos. Ocorre em regiões de temperaturas amenas, de 16 a 18°C. As plantas são infectadas via sistema radicular, a partir de 30 dias após a germinação, e os sintomas se manifestam no estágio reprodutivo da planta, onde podem se observar folhas carijó e o escurecimento da medula e do sistema vascular. Em casos severos, quando a planta morre antes do enchimento de vagens, há intensa queda destas e as folhas podem murchar rapidamente. O fungo não é transmitido via semente, sobrevive no solo, bem como em restos culturais (ITO, 2013; HENNING, 2014).

A Rizoctoniose, causada pelo fungo *Rhizoctonia solani*, pode ocorrer em qualquer estágio da cultura. O desenvolvimento da doença é favorecido por temperaturas amenas, períodos chuvosos e solos compactados. Plântulas infectadas apresentam estrangulamento do colo da haste e conseqüentemente seu tombamento. Se infectadas após a fase de plântula, no florescimento ocorre a podridão aquosa da haste próximo ao nível do solo, bem como as raízes adquirem coloração castanho-escura e o tecido cortical apresenta-se mole e se solta com facilidade, expondo o lenho da planta. Na lavoura, há a formação de reboleiras. O patógeno sobrevive em sementes, restos culturais, no solo em forma de escleródios, em hospedeiros alternativos e na rizosfera, porém sua disseminação via semente é baixa (ITO, 2013; HENNING, 2014).

O tombamento e a murcha de sclerotium, causadas pelo patógeno *Sclerotium rolfsii*, podem ocorrer em qualquer estágio da cultura, porém, são mais comuns na fase inicial e na fase reprodutiva. Na fase inicial, pode causar tombamento da plântula, resultante de uma podridão mole e aquosa, que geralmente inicia-se abaixo do nível do solo. Em plantas mais velhas, as folhas apresentam clorose e necrose entre as nervuras, que murcham e caem. Em condições de alta umidade, o fungo se desenvolve no decorrer da haste, onde forma uma cobertura branca de micélio, podendo produzir escleródios. As condições ideais para ocorrência da doença são temperaturas entre 25 e 35°C, solo com alta umidade, compactado e com pH baixo. O fungo é comum em todas as regiões brasileiras e pode incidir em mais de 200 espécies vegetais, podendo sobreviver em restos culturais, em sementes e no solo por muitos anos na forma de escleródios (ITO, 2013; HENNING, 2014).

2.2.2. NEMATOIDES

Dentre os patógenos de solo que limitam a produtividade da cultura da soja, destacam-se os nematoides, que causam danos diretos às plantas, reduzindo o crescimento e tornando-as improdutivas ou indiretamente ocasionando a entrada de patógenos oportunistas (PINHEIRO, 2013). A expansão da soja para novas fronteiras agrícolas, a intensificação da monocultura e a adoção de práticas inadequadas de manejo têm aumentado os problemas causados por nematoides na cultura (JUHÁSZ, 2013).

Heterodera glycines caracteriza-se pela formação de cistos, que é o corpo da fêmea adulta morta contendo ovos em seu interior. Estes são altamente resistentes às condições adversas e contêm em média 500 ovos. Plantas parasitadas apresentam clorose, nanismo, poucas vagens no período reprodutivo e, em lavouras com altas populações do nematoide, pode ocorrer a morte prematura das plantas. Na região central do Brasil, em condições de altas populações, a espécie pode causar perdas de até 100%. As perdas são significativas mesmo em lavouras sem sintomas aparentes, como acontece nos estados do Paraná, Rio Grande do Sul e São Paulo (DIAS *et al.*, 2009; HENNING *et al.*, 2014).

O nematoide *R. reniformis* predomina em solos siltosos e argilosos e apresenta tolerância ao estresse hídrico, por meio de um mecanismo de anidrobiose que permite que este suporte a dessecação. As lavouras parasitadas pelo nematoide apresentam-se desuniformes, com extensas áreas de plantas subdesenvolvidas, sem formação de reboleiras típicas, e o sistema radicular da planta é reduzido. Após parasitar o sistema radicular e atingir o parênquima, o nematoide torna-se sedentário, adquirindo o formato de um “rim”, razão pelo qual a espécie é conhecida como reniforme (FERRAZ; MONTEIRO, 2011; SUASSUNA *et al.*, 2006)

2.2.2.1 NEMATOIDES DAS GALHAS

Os nematoides formadores de galhas radiculares pertencem ao gênero *Meloidogyne* e constituem o grupo de maior importância para a agricultura. A ampla distribuição destes parasitas junto ao grande número de hospedeiros e a interação com outros organismos patogênicos faz das espécies deste gênero importantes limitadoras da produção agrícola mundial (ORIGINAL, 2014).

A denominação popular deste gênero vem da formação de “galhas” no sistema radicular da planta parasitada (Figura 3), que correspondem às células gigantes com função de nutrir o parasita. Já foram relatadas cerca de 90 espécies pertencentes a este gênero (PERRY; MOENS e STARR, 2009), dentre as quais *M. incognita* e *M. javanica* apresentam maior importância econômica para a cultura da soja (SILVA *et al.*, 2016).

Os prejuízos causados pelos nematoides das galhas são diversos, podendo variar com o nível de resistência das plantas, com a densidade populacional e com o manejo realizado na área cultivada (DIAS *et al.*, 2010). Nas áreas infestadas

com estes parasitas, são observadas manchas em reboleiras nas lavouras, onde as plantas apresentam-se pequenas e cloróticas. Às vezes pode não ocorrer redução no tamanho, mas no florescimento nota-se intenso abortamento de vagens e senescência prematura das plantas atacadas. Nas raízes, são observadas galhas em números e tamanhos variados, dependendo da suscetibilidade da cultivar e da densidade populacional do nematoide (BRIDA *et al.*, 2016).

Figura 3. Galhas formadas no sistema radicular de planta de soja parasitada por *Meloidogyne* spp.



Fonte: Dall'Agnol e Dias (2019).

Os nematoides das galhas penetram nas raízes das plantas e migram dentro do complexo intercelular para o córtex na região de diferenciação celular, estabelecendo uma relação íntima com as plantas hospedeiras, por meio de um processo altamente especializado. As plantas suscetíveis reagem à alimentação dos juvenis e sofrem mudanças morfológicas e fisiológicas pronunciadas (KARSSSEN; MOENS, 2006).

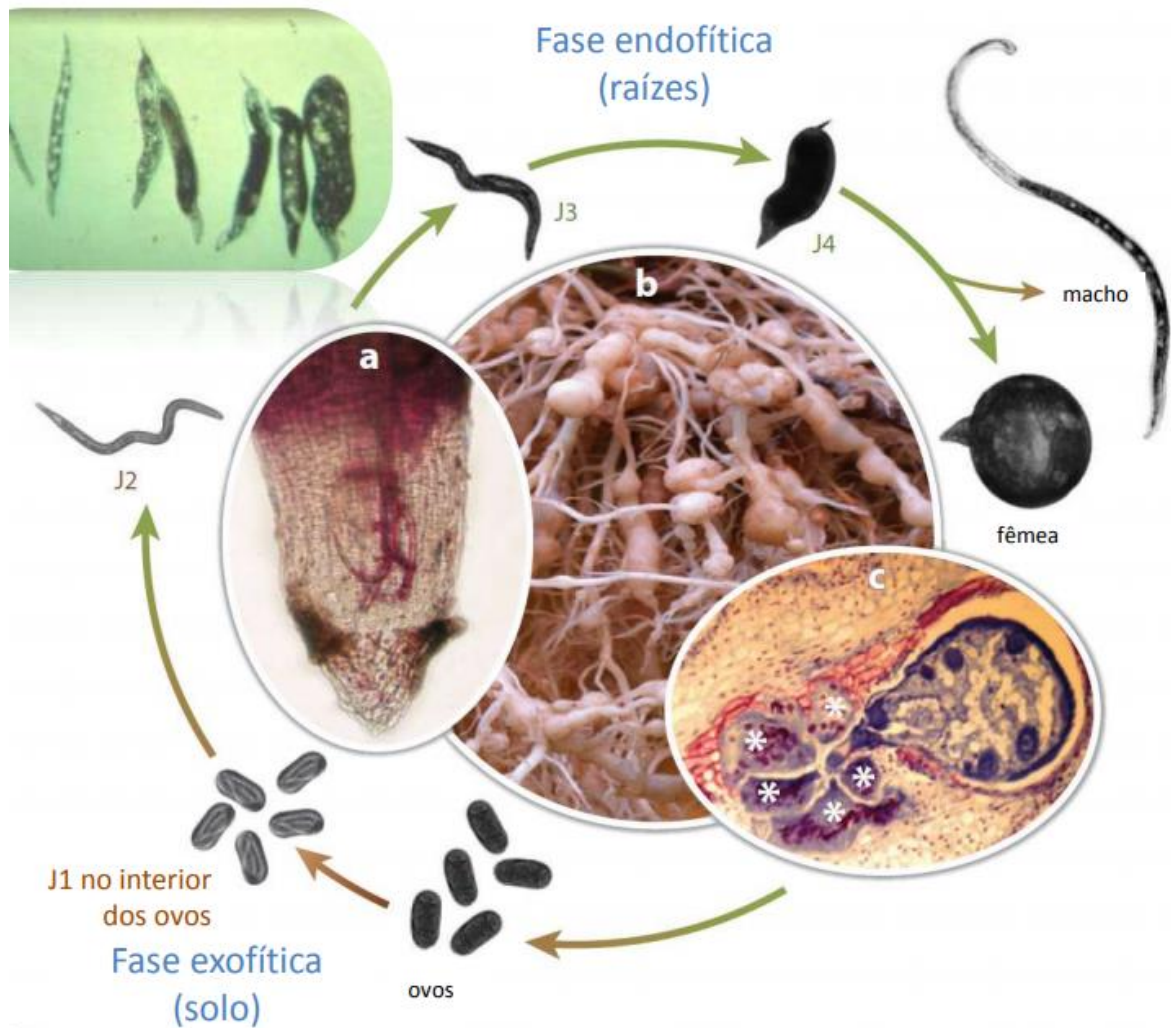
O ciclo de vida de *Meloidogyne* spp. inicia-se pela fase de ovo, passando por mais quatro estádios juvenis até atingir a fase adulta, que ocorre entre três e quatro semanas no verão e, no inverno, pode ser prolongado até sete semanas. As fêmeas geralmente encontram-se parcial ou completamente no interior das raízes, onde podem produzir centenas de ovos (PINHEIRO *et al.*, 2013).

Os ovos são postos pelas fêmeas junto à massa gelatinosa composta de matriz glicoproteica, cuja função é proteger e manter os ovos unidos. Dentro do ovo, forma-se o juvenil de primeiro estágio (J1), que progride para juvenil de segundo estágio (J2) e eclode, em condições ótimas (Figura 4), como temperatura e umidade adequadas e presença de raízes em desenvolvimento (PINHEIRO *et al.*, 2013).

Uma vez no solo, os J2 são atraídos até as raízes pelos exsudados liberados por estas, onde começam a se alimentar assim que as parasitam. São quimioatraídos até o local onde será o início do sítio de alimentação perene, sendo esse sítio localizado nas células do protoxilema ou protofloema. Estas células sofrem um processo de diferenciação e passam a ser chamadas de células gigantes; e o nematoide passa a ser sedentário, assumindo formato de salsicha. Em condições ambientais favoráveis, os J2 continuam seu desenvolvimento para os estágios subsequentes, J3 e J4 (Figura 4), quando passam a não possuir estilete funcional e têm sua alimentação suspensa até a forma adulta. No final do estágio J4, ocorre a diferenciação entre machos e fêmeas e, atingindo a forma adulta, o ciclo recomeça (PERRY; MOENS e STARR, 2009).

A erradicação desses nematoides é extremamente difícil devido à suas características ecológicas. Em uma catalogação, Castro *et al.* (2011) detectaram 78 populações de *Meloidogyne* spp. em nove estados brasileiros produtores de soja. *Meloidogyne javanica* foi detectado em 64,1% e *M. incógnita*, em 23,1% das áreas catalogadas. Dentre os sintomas apresentados pela planta após a infecção de *M. javanica*, dois são mais evidentes e costumam ocorrer associados: galhas radiculares de formatos variáveis, no geral bem visíveis, e escassez de raízes secundárias. Essa combinação resulta em sistemas radiculares rasos, pobres e deformados. Outros órgãos subterrâneos, como os tubérculos (cenoura, beterraba, batata doce etc.) podem exibir galhas, resultando em grandes perdas na produção e despadroneamento do produto (ARAUJO; BRAGANTE, 2012).

Figura 4. Ciclo de vida de *Meloidogyne* spp.



Fonte: CASTAGNONE-SERENO *et al.*, (2013)

Os nematoides das galhas são de difícil controle, o que torna importante a integração de vários métodos para que seu manejo seja efetivo. Os métodos utilizados são a rotação ou sucessão de culturas com espécies não hospedeiras, a utilização de cultivares resistentes ou tolerantes e os controles químico e biológico (PINHEIRO *et al.*, 2014).

2.2.2.2 NEMATOIDES DAS LESÕES RADICULARES

Os nematoides das lesões radiculares recebem esta denominação pelo fato de causarem lesões nas raízes das plantas hospedeiras. Em relação a danos econômicos, ocupam o segundo lugar no Brasil, superados apenas pelos nematoides das galhas. Cerca de 70 espécies do gênero já foram descritas, porém, apenas

Pratylenchus brachyurus (Figura 5) apresenta relevância para a cultura da soja, sendo muito disseminado em quase todas as regiões produtoras (CASTILLO *et al.*, 2012).

O nematoide é um endoparasita migrador que causa danos mecânicos no sistema radicular das plantas no momento da sua alimentação e movimentação no interior dos tecidos. Causa danos por meio da ação tóxica de substâncias que liberam no córtex radicular, bem como ação espoliadora, pela retirada do conteúdo citoplasmático, modificando e destruindo os tecidos, comprometendo a absorção de água e nutrientes pelas plantas (GOULART, 2008). Além dos danos diretos, podem causar danos indiretos, facilitando a entrada e colonização das raízes por fitopatógenos oportunistas, tais como fungos e bactérias (FAVORETO *et al.*, 2019).

Figura 5 – Fêmea de *Pratylenchus brachyurus*.



Fonte: ALVES (2020)

Plantas parasitadas apresentam sistema radicular reduzido, pouco volumoso e escurecido, bem como a parte aérea pouco se desenvolve e as folhas apresentam-se murchas e cloróticas (HENNING *et al.*, 2014; FAVORETO *et al.*, 2019). Em áreas com alta população do nematoide, há formação de reboleiras, onde as plantas apresentam nanismo, mas, em alguns casos, permanecem verdes (DIAS *et al.*, 2010). Os maiores danos ocorrem em regiões de solos com elevados teores de

areia, principalmente se a lavoura de soja for antecedida por pastagem (HENNING *et al.*, 2014). Além de soja, *P. brachyurus* também pode parasitar outras espécies vegetais de importância econômica, tais como milho, cana de açúcar, algodão e amendoim (HENNING *et al.*, 2014).

O ciclo de vida do nematoide compreende a fase de ovo, juvenil (4 estádios, de J1 a J4) e adulto. Todos os estádios móveis são infectantes, podendo invadir e abandonar o sistema radicular. As fêmeas depositam de 70 a 120 ovos no interior das raízes parasitadas, mas também podem fazer a ovoposição diretamente no solo, o que é menos comum. Posteriormente o juvenil de segundo estágio eclode do ovo e migra à procura de raízes para invadi-las e iniciar o parasitismo. O ciclo dura de três a seis semanas sob condições favoráveis, porém pode ser afetado pela espécie de planta hospedeira e temperatura, sendo esta ideal de 29-30°C (FERRAZ e BROWN, 2016).

Ainda não há nenhuma cultivar resistente ao nematoide, bem como as chances de se encontrar fontes de resistência não são muito animadoras, tendo em vista que a relação de *P. brachyurus* com a soja é pouco complexa, não havendo a formação de célula especializada para alimentação, como ocorre para os nematoides de cisto e de galhas (DIAS *et al.*, 2010).

2.3 FORMAS DE CONTROLE DE DOENÇAS DO SOLO

A capacidade dos solos agrícolas em suprimir doenças está relacionada às suas condições físicas, químicas e biológicas, portando, o seu manejo adequado é de fundamental importância para o não estabelecimento de doenças, ou baixa agressividade nas plantas caso ocorram (BELLÉ e FONTANA, 2018). As recomendações de manejo prescritas para aumentar a supressividade do solo se baseiam no aumento de matéria orgânica no solo, rotação de culturas, redução de mecanização, para que o ambiente favoreça o equilíbrio da microbiota e, conseqüentemente, haja competição entre microrganismos benéficos e fitopatogênicos (STIRLING, 2013).

Os patógenos de solo são de difícil controle devido suas características ecológicas, sendo de grande importância a adoção de mais de um método de controle, realizando-se o manejo integrado de doenças. Este consiste na

integração de práticas de cultivo, tais como rotação de culturas, utilização de cultivares resistentes, controle físico, controle químico, controle cultural e controle biológico, as quais, juntas, auxiliam na mortalidade de microrganismos patogênicos, interferindo minimamente no ecossistema natural e reduzindo as chances de patógenos se adaptarem a alguma prática defensiva específica (BELLÉ e FONTANA, 2018).

A rotação de culturas tem como principal objetivo reduzir o contato do patógeno com o hospedeiro suscetível, evitando a infecção e, conseqüentemente, a ocorrência da doença. Neste método, os restos culturais são mineralizados por microrganismos, de modo que o inóculo é eliminado ou mantido abaixo da taxa necessária para infecção. Por meio desta tática, pode-se controlar patógenos que sobrevivem em restos culturais que não possuem estruturas de resistência (BELLÉ e FONTANA, 2018).

A rotação de culturas contribui para o controle de doenças por meio da eliminação de hospedeiros alternativos e de inóculo para a cultura subsequente. Contudo, devido à versatilidade dos patógenos, esse controle não é possível em todas as rotações e, deste modo, esta tática é mais eficiente na alteração qualitativa da microbiota do solo, propiciando o aumento de microrganismos antagonísticos (BERNI et al., 2002).

A utilização de cultivares resistentes é um dos primeiros fatores a ser considerado no planejamento de implantação de uma lavoura, sendo importante a escolha de uma cultivar de amplo espectro de resistência (BOSH e GILLIGAN, 2003). Há dois tipos de resistência de plantas geralmente reconhecidas: Resistência qualitativa, que é condicionada por apenas um gene, enquanto a quantitativa é condicionada por múltiplos genes de efeito parcial (POLAND et al., 2009). Assim, a inclusão de cultivares resistentes em programas de estratégias de controle de doenças é muito importante, pois ajuda na diminuição do inóculo das populações de patógenos, com o intuito de aumentar a eficiência de controle das doenças, além de reduzir a capacidade de adaptação do patógeno para superar a resistência da planta (BELLÉ e FONTANA, 2018).

O princípio do controle físico é a eliminação de microrganismos fitopatogênicos do solo antes do plantio, geralmente por meios drásticos. Porém, devido à natureza radical desse tipo de controle, também são eliminados do solo organismos não-alvos. O controle físico pode ser realizado por meio de vapor, solarização do solo e de biofumigação, porém, o método mais utilizado é a

solarização, apesar da dificuldade de ser realizado em grandes áreas devido aos entraves econômicos. A solarização consiste na cobertura do solo úmido com plástico transparente em períodos com alta radiação solar (GAMLIEL e KATAN, 2012).

O controle químico consiste na utilização de produtos químicos, seja via tratamento de sementes ou sulco de plantio. Esse controle é amplamente utilizado na agricultura, mas, tratando-se de doenças radiculares, o controle químico é um grande desafio devido às características dos patógenos e do ambiente do solo. Saber o momento adequado para realização das aplicações é de fundamental importância, visto que aplicações desenfreadas podem fazer com que o patógeno adquira resistência ao ingrediente ativo utilizado, além de aumentar os custos de produção. Assim, existem critérios existentes para tomada de decisão quanto à aplicação de fitossanitários, como diagnose adequada do patógeno, estágio fenológico da cultura, condições climáticas, análise de custo-benefício e se tem outras formas de controle disponíveis (CAROLINA, LEITE e LOPES, 2018).

Um dos pontos críticos em relação ao controle químico de doenças radiculares é a limitação quanto à eficiência dos produtos para tal finalidade, visto que os produtos funcionam bem quando aplicados de maneira preventiva. Após a infecção do patógeno, as plantas geralmente expressam sintomas críticos rapidamente. A grande dificuldade de controlar essas doenças com produtos fitossanitários deve-se também às características etiológicas dos patógenos, sejam fungos, bactérias ou nematoides, pois muitas espécies apresentam estruturas de resistência, o que dificulta a ação de produtos.

O controle cultural de doenças consiste em medidas adotadas pré-plantio e durante o desenvolvimento da cultura, visando a prevenção ou a interceptação da epidemia. Esse método tem como principal objetivo evitar o contato do inóculo viável com o hospedeiro suscetível, de modo a diminuir a taxa de infecção e o progresso da doença. Há muitas práticas que podem ser adotadas para controle cultural, mas as principais são: rotação de culturas, manejo do solo e dos restos culturais, população adequada de plantas, irrigação, adubação verde, compostagem, fertilização do solo, época de plantio e profundidade de semeadura. Além disso, é de grande importância manter o equilíbrio nutricional das plantas, para que estas tolerem a infecção (BELLÉ e FONTANA, 2018).

2.3.1 CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS DO SOLO

O controle biológico consiste na regulação populacional de plantas ou animais por inimigos naturais, que são os agentes bióticos de mortalidade (PARRA *et al.*, 2002). É uma tática que envolve plantas, espécies fitófagas, parasitoides, predadores e entomopatógenos, bem como suas interações, promovendo o equilíbrio entre os organismos que compõem os ecossistemas. Este controle pode ocorrer naturalmente, por meio do equilíbrio biológico natural, ou de forma induzida (BRAGANTE e BRAGANTE, 2012).

O desequilíbrio biológico do solo estimula a ocorrência de doenças nas plantas, causadas por patógenos que nele habitam. Deste modo, solos com alta diversidade microbiana apresentam maior capacidade de suprimir microrganismos fitopatogênicos e, conseqüentemente, as doenças (BETTIOL e GHINI, 2005). Microrganismos que se adaptam no mesmo habitat e interferem nos processos vitais de fitopatógenos são denominados agentes antagonistas (MORANDI *et al.*, 2014). Assim, a utilização de antagonistas adaptados ao habitat do patógeno é muito importante num programa de controle biológico (MARIANO *et al.*, 2005).

O controle biológico de doenças radiculares é bem sucedido, pois a rizosfera é um ambiente mais manipulável que a filosfera (ANDREWS, 1992). Os patógenos de solo são controlados pelos agentes de biocontrole, que atuam na destruição de propágulo, prevenção de formação ou destruição do inóculo, redução da virulência do patógeno ou por meio da promoção do desenvolvimento da planta (MARIANO *et al.*, 2005). Deste modo, para utilização de microrganismos como biocontroladores é essencial a obtenção de conhecimentos sobre seu potencial antagonico e quais os mecanismos de ação utilizados por estes contra os fitopatógenos. Os mecanismos de ação são caracterizados pela forma com que os microrganismos biocontroladores expressam sua oposição aos patógenos, que podem ser a antibiose, o parasitismo, a competição, a indução de resistência e a predação (LOPES e MICHEREFF, 2018).

A antibiose é uma interação entre microrganismos em que o microrganismo antagonista secreta metabólitos antimicrobianos, também conhecidos como antibióticos, que inibem ou impedem o desenvolvimento do outro organismo (BEDENDO *et al.*, 2011). Muitas espécies de fungos do gênero *Trichoderma* atuam por este mecanismo, secretando compostos químicos ou enzimas específicas com

ação contra fitopatógenos (MORANDI *et al.*, 2014). Já foram relatados mais de 200 metabólitos potencialmente antimicrobianos produzidos por diversas espécies de deste gênero. Muitas espécies de bactérias do gênero *Bacillus* são amplamente estudadas quanto à produção de substâncias antimicrobianas, tais como os lipopeptídeos surfactina, iturina e fengicina, que atuam contra fitopatógenos (LOPES e MICHEREFF, 2018).

A competição é uma estratégia de sobrevivência, em que dois microrganismos que possuem comportamento de desenvolvimento similares se utilizam de competição para inibir o desenvolvimento do outro. Os recursos ecológicos envolvidos nessa competição são: nicho-ecológico, luminosidade, água, temperatura, umidade, íons importantes, oxigênio e nutrientes (LOPES e MICHEREFF, 2018).

O parasitismo é uma relação nutricional em que o organismo parasita se alimenta de outro organismo (LAYTON *et al.*, 2014). Geralmente, o parasita se fixa ou se enrola ao redor do hospedeiro e secreta metabólitos secundários e/ou enzimas líticas sobre ele (MUKHERJEE *et al.*, 2012). Durante esta interação o parasita pode se nutrir a partir de estruturas reprodutivas e vegetativas do hospedeiro (MORANDI *et al.*, 2014).

A indução de resistência caracteriza-se pela ação de microrganismos que induzem as plantas a desencadearem respostas de defesa contra os patógenos (LAYTON *et al.*, 2014). Após a indução de resistência, dentre os vários mecanismos expressos pelas plantas, destacam-se as proteínas relacionadas à patogênese, as barreiras histológicas e a produção de lignina (LOPES e MICHEREFF, 2018).

A predação é uma interação ecológica em que o microrganismo predador se alimenta outro organismo. Nematoides fitoparasitas e fungos nematófagos são os microrganismos predadores mais estudados, por apresentarem grande potencial no controle biológico, reduzindo populações de nematoide em condições de casa de vegetação e campo (BRAGA e ARAÚJO, 2014). Os fungos nematófagos são potenciais agentes de biocontrole de diversos nematoides e são encontrados em ambientes diversos (ARAÚJO *et al.*, 2013). Os fungos predadores desenvolvem estruturas especializadas, denominadas armadilhas, que ficam dispostas ao longo de suas hifas e têm como finalidade capturar nematoides.

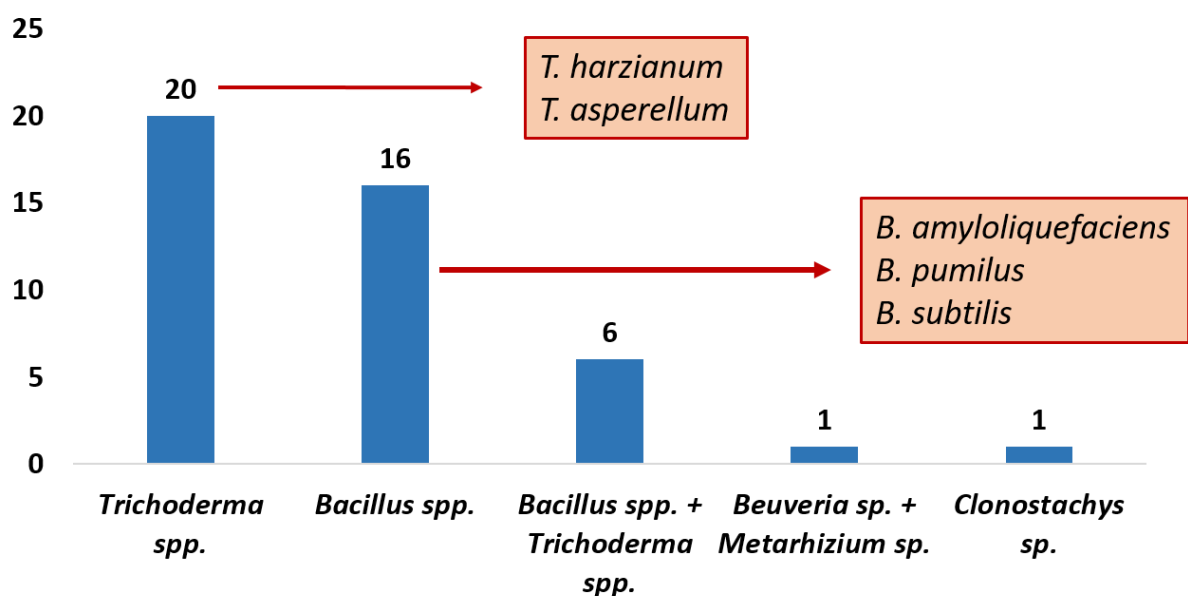
A introdução de microrganismos adaptados ao habitat do patógeno é de grande importância para o sucesso do controle biológico. Assim, diversos microrganismos são isolados, selecionados e utilizados para biocontrole de doenças

de plantas. *Trichoderma* spp. e *Bacillus* spp. são os microrganismos mais explorados para controle de fitopatógenos, pois apresentam grande potencial biotecnológico e industrial (MACHADO *et al.*, 2012).

O gênero *Trichoderma* compreende fungos de vida livre, mais comuns em regiões de clima temperado e tropical, apresentam hábito saprofítico e/ou endofítico, são comumente encontrados em solos orgânicos e os diferentes isolados podem apresentar coloração amarela, branca e verde. O fungo é filamentoso, apresenta rápido crescimento, com hifas que dão origem a conidióforos muito ramificados, gerando vários conídios (MACHADO *et al.*, 2012; MUNIR *et al.*, 2013).

As espécies de *Trichoderma* que apresentam potencial de biocontrole de fitopatógenos são *T. harzianum*, *T. atroviride*, *T. virens* e *T. asperellum*. Como biocontroladores de doenças, muitos mecanismos de ação são utilizados por estes fungos, tais como competição, parasitismo, antibiose e indução de resistência (MACHADO *et al.*, 2012). Este fungo é base da maioria dos biofungicidas existentes no mercado, de modo que, dos 44 produtos registrados, 20 deles são à base de *trichoderma*, 16 à base de *Bacillus* spp., 6 à base da combinação entre *Bacillus* spp. e *Trichoderma* spp., 1 a base de *Beauveria* sp. e 1 à base de *Clonostachys* sp. (figura 6).

Figura 6 - Microrganismos base de biofungicidas comerciais, com destaque a *Bacillus* spp. e *Trichoderma* spp..



Fonte: AGROFIT (2021)

Já foram relatados mais de 200 organismos inimigos naturais de nematoides, como fungos, bactérias, nematoides predadores, tardígrados, colêmbolas e ácaros (KERRY, 2000). Dentre estes, os empregados na agricultura de forma induzida são fungos e bactérias, os quais são base dos bionemáticos comerciais (Figura 7) (VAZ, 2011).

Algumas características são essenciais na escolha desses microrganismos como agentes de controle de nematoides, tais como não ser patogênico a plantas, seres humanos e outros animais; capacidade de reduzir populações de nematoides; sobreviver no solo em condições adversas, até sem a presença do hospedeiro; alta capacidade de disseminação no solo; facilidade de reprodução; compatibilidade com fertilizantes, defensivos e outras práticas culturais e permanecer viável ao longo do tempo de armazenamento do bioproduto (FERRAZ *et al.*, 2010).

Entre os organismos utilizados em programas de manejo, destacam-se as rizobactérias. Estas podem atuar sobre as populações de nematoides de várias formas, como por competição por espaço ou nutrientes; produção de compostos, como antibióticos, enzimas e toxinas; indução de resistência sistêmica nas plantas; dificultar o reconhecimento dos tecidos das plantas pelos nematoides e promoção do crescimento das plantas, tornando-as mais tolerantes ao ataque destes patógenos (ALVES *et al.*, 2011).

Dentre as rizobactérias benéficas para o desenvolvimento das plantas, destacam-se as do gênero *Bacillus* (FERNANDES *et al.*, 2014). O gênero é descrito como um dos principais grupos microbianos com a capacidade de agir no controle de doenças (FERREIRA, 2015).

2.5 *BACILLUS* SPP.

O gênero *Bacillus* foi estabelecido por Cohn em 1872 e apresenta mais de 200 espécies e subespécies já identificadas (LOGAN e DE VOS, 2009). As espécies deste gênero predominam no solo e na rizosfera, onde representam aproximadamente 95% das bactérias gram-positivas (DE SILVA *et al.*, 2017). Este gênero pertence à família Bacillaceae, descrita na literatura científica como uma das famílias com maior atividade bioquímica (LAYTON *et al.*, 2014).

As bactérias do gênero *Bacillus* apresentam formato de bastonete, são gram-positivas, produzem endósporo e podem ser aeróbias ou anaeróbias facultativas. Cada bactéria produz apenas um endósporo, que é resistente a condições adversas, permitindo que estas se desenvolvam em muitos habitats, incluindo os extremos, como areia do deserto, nascentes de água quente e solos do Ártico (CAWOY *et al.*, 2011).

As espécies de bactérias do gênero *Bacillus* se destacam por apresentarem uma multiplicidade de mecanismos antagônicos a fitopatógenos que incidem nas culturas agrícolas (ARAÚJO e MARCHESI, 2009). Os mecanismos envolvem a antibiose, a competição por espaço ou nutrientes, a interação direta com o patógeno e a indução de resistência da planta (LAYTON *et al.*, 2014). Porém, dentre estes mecanismos, antibiose é o mais conhecido e mais estudado (CAWOY *et al.*, 2011).

Remuska e Maristela (2007) avaliaram o efeito dos agentes antagonistas *B. thuringiensis* e *Trichoderma* sp. no crescimento micelial dos fungos fitopatogênicos: *Sclerotium rolfsii*, *Diaporthe phaseolorum*, *Pythium aphanidermatum*, *Monilinia fructicola*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani* e *Bipolaris sorokiniana*. *Bacillus thuringiensis* mostrou-se eficiente no controle de *M. fructicola*, *S. sclerotiorum*, *F. solani* e *S. rolfsii*, impedindo que o fungo *S. sclerotiorum* formasse escleródios, bem como mostrou-se mais eficiente que *Trichoderma* sp. no controle dos fitopatógenos *D. phaseolorum*, *P. aphanidermatum*, *M. fructicola*, *S. sclerotiorum*, *R. solani* e *F. solani*.

Massawe *et al.* (2018) testaram metabólitos secundários produzidos por cinco isolados de *Bacillus* spp. isolados de sementes de milho, no controle *in vitro* de *Sclerotinia sclerotiorum*, e observaram que três dos isolados controlaram o fungo em 33,3; 25,6 e 19,2%. Os voláteis produzidos pelos três isolados foram testados no controle *in vitro* de *S. sclerotiorum* e apresentaram controle de 86,6; 78,1 e 75,4%.

Jain *et al.* (2017) testaram um isolado de *Bacillus* sp. advindo da rizosfera de soja no controle *in vitro* de *Rhizoctonia solani* e *Fusarium oxysporum*. No ensaio de antagonismo direto, o isolado controlou os fungos *R. solani* em 45% e *F. oxysporum* em 63%. No ensaio com os filtrados da cultura, houve controle de 91,73% para *F. oxysporum* e 88,32% para *R. solani*. Plantas de soja inoculadas com os fungos e o isolado bacteriano apresentaram maior atividade enzimática, relacionada à

resposta de defesa da planta, quando comparado com plantas inoculadas somente com os patógenos.

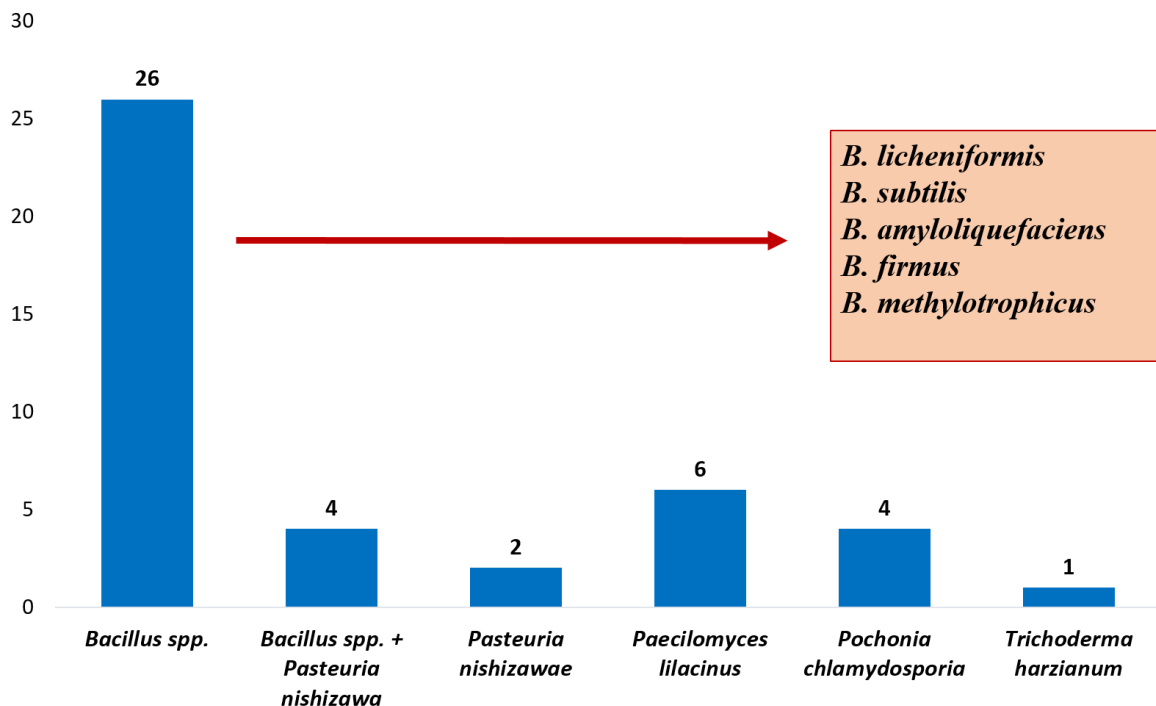
Várias espécies do gênero *Bacillus* apresentam potencial de controle de nematoides, com ação direta, por meio da produção de metabólitos secundários com ação nematicida (MENDOSA, KIEWNICK e SIKORA, 2008), ou indireta, por meio da indução dos mecanismos de defesa das plantas. Dentre os metabólitos secundários produzidos por *Bacillus* spp., as enzimas líticas são os mais estudados para o controle de nematoides, como as quitinases, proteases e glucanases (MARIN-BRUZOS e GRAYSTON, 2019). Além das enzimas líticas, outras moléculas já foram relatadas com ação nematicida, como algumas proteínas Cry produzidas por *B. thuringiensis*: Cry5, Cry6, Cry12, Cry13, Cry14, Cry21 e Cry55 (MARIN-BRUZOS e RAYSTON, 2019).

Tratando-se de ação indireta, tanto *Bacillus* spp. quanto outras rizobactérias produzem metabólitos secundários que são reconhecidos pelas plantas. Após o reconhecimento, as plantas ativam genes relacionados à defesa, e outros compostos que as ajudam a superar o ataque do patógeno, sendo esta resistência denominada resistência sistêmica adquirida (SAR) (BENEDUZI *et al.*, 2012). Compostos indutores de resistência já foram identificados, tais como: lipopolissacarídeos, sideróforos (VAN LOON *et al.*, 1998), N-acil-homoserina, lactonas, antibióticos e exopolissacarídeos (VLEESSCHAUWER e HÖFTE, 2009).

Existem 43 nematicidas microbiológicos registrados à base de bactérias e fungos. Dentre os produtos, 26 são à base de *Bacillus* spp., 4 à base de *Bacillus* spp. em combinação com *Purpureocillium lilacinum*, 6 à base de *Purpureocillium lilacinum*, 2 à base de *Pasteuria nishizawae*, 4 à base de *Pochonia chlamydosporia* e 1 à base de *Trichoderma harzianum* (figura 7).

O número de registros de bionematicidas no Brasil cresce significativamente a cada ano, de modo que, de 2019 a 2021, o crescimento foi de 100%. Estudos em busca de novas cepas com potencial nematicida são constantes, assim como a busca por entender melhor os mecanismos utilizados por estes microrganismos no controle de nematoides (AGRIFIT, 2021).

Figura 7 - Microrganismos-base dos bionemáticos comerciais registrados, destaque para espécies do gênero *Bacillus*.



Fonte: AGROFIT (2021).

Wei *et al.* (2014) testaram uma estirpe de *B. subtilis* da planta medicinal chinesa "*Trichosanthes kirilowii*" no controle de *M. incognita* em plantas de tomate, em condições de casa de vegetação. Após 56 dias da inoculação da bactéria, o número de galhas associado à infecção por *M. incognita* nas raízes dos tomateiros foi significativamente reduzido. Metabólitos produzidos pelo isolado bacteriano foram testados *in vitro* no controle da mesma espécie de nematoide, causando a mortalidade de juvenis e redução significativa da eclosão de J2.

Zhou *et al.* (2016) testaram 19 cepas de rizobactérias no controle *in vitro* de *M. incognita*, três delas do gênero *Bacillus* (*B. amyloliquefaciens*, *B. methylotrophicus* e *B. subtilis*). Todas causaram a morte de 65% de juvenis do nematoides 24 horas após a inoculação. Sete cepas que apresentaram os melhores resultados *in vitro*, incluindo as três cepas de *Bacillus* spp., foram testadas em casa de vegetação em plantas de tomate, quando três destas apresentaram resultados satisfatórios, reduzindo a população de *M. incognita* em mais de 58%.

Chinheya, Yobo e Laing (2017) testaram isolados de *Bacillus* spp. inoculados via tratamento de sementes no controle de *M. javanica* na cultura da soja.

O tratamento com o isolado bacteriano BC29 resultou em maior redução de galhas (83,71%) e maior redução de massas de ovos (86,48%).

El-Nagdi, El-Khair e Dawood (2018) testaram um isolado de *B. subtilis* e um isolado de *B. pumilus* em aplicação pós-emergência na cultura da ervilha, para controle de *M. incognita*. *B. subtilis* e *B. pumilus*, respectivamente, reduziram os J2 do solo (50-80%) e das raízes (57-78%), as fêmeas (55-74%), o número de galhas (65-74%) e massas de ovos (57-70%), assim como ambos, em combinação, também reduziram significativamente os parâmetros citados.

Zhou *et al.* (2019) extraíram isolados de bactérias da rizosfera de plantas de pepino e tomate. Dois destes isolados, um identificado como *Pseudomonas* spp. e outro como *Bacillus* spp., foram inoculados nas raízes de plantas de tomate, que, posteriormente, foram inoculadas com *M. incognita*. As plantas inoculadas com os isolados da bactéria apresentaram menor formação de galhas nas raízes e redução do número de ovos (60%) em relação à testemunha.

3 ARTIGO

3.1 MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1 ORIGEM DA CEPA CMLL06

A cepa bacteriana CMLL06 pertence à coleção de microrganismos do Laboratório de Ecofisiologia e Biotecnologia Agrícola (LEBA) e do Laboratório de Biotecnologia Microbiana (LABIM), na Universidade Estadual de Londrina (UEL). Esta foi isolada de solo rizosférico coletado na fazenda escola da UEL e selecionada para este estudo com base nos resultados de um *screening* realizado para atividade antifúngica e *swarming* com vários isolados bacterianos.

3.4.2 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

A cepa bacteriana foi cultivada por 24 horas em placa de petri contendo meio de cultura Lurian Bertani ágar (LBA: triptona 10 g L⁻¹; extrato de levedura 5,0 g L⁻¹; cloreto de sódio 5,0 g L⁻¹ e ágar bacteriológico 15 g L⁻¹). A biomassa de algumas colônias puras foram utilizadas para extração do DNA genômico utilizando o kit de extração PureLink™ Microbiome DNA Purification kit (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachussetts, USA). A integridade do DNA foi verificada por meio de gel de agarose a 1% e o DNA quantificado por espectrofotometria em NanoDrop 2000/2000c (ThermoFisher Scientific, Wilmington, Delaware, USA).

A reação de sequenciamento foi realizada em volume de 10 µL contendo 2,33 µL de tampão (5x), 10 µM de *forward primer*, 1,0 µL de bigdye (BigDye® *terminator cycle sequencing ready reaction kit*; Perkin-Elmer Applied Biosystems, Califórnia-USA), 1 µL do produto de amplificação purificado e água ultrapura até 10 µL. A reação foi repetida e realizada separadamente para o *primer* reverso. As condições usadas para a reação de sequenciamento seguiram o padrão de amplificação recomendado pela fabricante do sequenciador, Applied Biosystem. A precipitação dos produtos amplificados ocorreu pela adição de 2,5 µL de EDTA (125 mM) e 30 µL de etanol a 100%. Em seguida, as amostras foram incubadas por 15 min

em temperatura ambiente, precipitadas por centrifugação a 3000 \times g por 30 min (4°C), lavadas com 30 μ L de etanol (70%) e secas a 95°C por 30 seg. Para o sequenciamento, as amostras foram ressuspensas em 10 μ L de formamida Hi-Di, desnaturadas a 95°C por três minutos, imediatamente incubadas em gelo e submetidas à eletroforese capilar no sistema automatizado 3500 xL (Applied Biosystems, Califórnia-USA).

A qualidade das leituras, bem como os parâmetros de corte, foram observados e escolhidos usando FastQC (ANDREWS 2010). Com o programa Trimmomatic (BOLGER, LOHSE e USADEL, 2014), as leituras cruas foram filtradas com base nos parâmetros definidos pelo FastQC. Novas análises de qualidade das leituras foram realizadas após as filtrações para checar se os parâmetros escolhidos foram adequados.

Uma série de montagens de novo foram realizadas com softwares diferentes (SPAdes e IDBA hybrid) (PENG *et al.*, 2010) testando parâmetros de montagem diferentes e, depois, comparadas entre si com o programa QUAST (GUREVICH *et al.*, 2013). As principais métricas, como tamanho total de alinhamento, número de contigs, maior contig, valores N50 e números de genes, de acordo com o genoma de referência fornecido no QUAST, foram usadas para escolher o melhor *assembly*. Usando o webserver Contiguator, contigs da melhor montagem foram alinhados com um genoma de referência para geração dos scaffolds. Leituras brutas do sequenciamento foram mapeadas contra os scaffolds gerados no Medusa para solução de gaps, utilizando a GUI do programa CLC Genomics workbench 12 e o programa Bowtie2 (LANGMEAD e SALZBERG, 2012).

Scaffolds gerados com contagem baixa de leituras para suportar a sequência foram descartados. As lacunas no scaffold foram tratadas por curadoria manual com mapeamento de leitura usando Bowtie2 e preenchimento de lacunas usando CLC Genomics Workbench 12 GUI. O início do genoma foi determinado por comparação com uma cepa de referência, assumindo o gene *dnaA* como o primeiro gene.

3.4.3 PREDIÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

A identificação dos possíveis *Biosynthetic gene clusters* (BGCs) foi realizada por meio do Web server antiSMASH 4.0 (WEBER *et al.*, 2015), que combina

diferentes bancos de dados genéticos, moléculas antimicrobianas e BGCs para prever a posição e possível função dos clusters (BLIN *et al.*, 2019).

3.4.4 ENSAIO DE ANTAGONISMO DIRETO POR CULTURA DUPLA

Os fungos *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Macrophomina phaseolina* foram cedidos pela empresa Brasmax[®]. Para o preparo do inóculo, estes foram repicados em placas de petri contendo meio de cultura batata dextrose ágar (BDA) e incubados em B.O.D a 25°C por um período de dois a cinco dias, de acordo com a velocidade de crescimento de cada fungo.

Para o preparo do inóculo bacteriano, a cepa CMLL06 foi ativada em placa de petri contendo meio de cultura LB (item 3.4.2), incubada em B.O.D a 28°C por 24 horas e submetida a um segundo cultivo sob as mesmas condições. Três a cinco colônias foram suspensas em solução salina (0,85%) e a turbidez foi ajustada por meio da escala nefelométrica McFarland 0,5.

Uma alíquota de 5 µL do inóculo da cepa CMLL06 foi espalhada em linha com auxílio de alça bacteriológica a 0,5 cm da extremidade das placas de petri contendo meio de cultura BDA. Em seguida, um disco micelial de 6 mm de diâmetro dos fungos (*R. solani*, *S. sclerotiorum* e *M. phaseolina*) foi inoculado na extremidade oposta ao inóculo da bactéria. Placas somente com os fungos foram utilizadas como controle. A avaliação foi realizada em tempos diferentes, de acordo com a velocidade de crescimento de cada fungo, sendo para *R. solani* 48 horas e para *S. sclerotiorum* e *M. phaseolina*, 96 horas após a montagem. Foi medido o crescimento micelial dos fungos em mm com auxílio de paquímetro e calculada a porcentagem de inibição.

3.4.5 ATIVIDADE DO FERMENTADO AUTOCLAVADO E DO SOBRENADANTE LIVRE DE CÉLULAS DA CMLL06 SOBRE O CRESCIMENTO MICELIAL DE *SCLEROTINIA SCLEROTIORUM*

Um pré-inóculo foi preparado a partir de colônias puras (obtidas conforme descrito no item (3.4.4), as quais foram suspensas em solução salina (0,85% cloreto de sódio) e a turbidez foi ajustada por meio da escala nefelométrica McFarland 0,5. O inóculo foi preparado a partir de 30 μL dessa suspensão bacteriana, que foram transferidos para um erlenmeyer de 125 mL contendo 30 mL de caldo LB e incubados a 28 °C por 24 h a 180 rpm em incubadora (Shaker orbital Tecnal - TE 422, Brasil).

Para fermentação, um erlenmeyer contendo 400 mL de meio de cultura (Glicose 20 g L⁻¹, extrato de levedura 5 g L⁻¹, triptona 5 g L⁻¹, fosfato de potássio monobásico, 1 g L⁻¹, fosfato de potássio dibásico 0,5 g L⁻¹, sulfato de magnésio 0,5 g L⁻¹, sulfato de ferro 0,5 g L⁻¹, cloreto de cálcio 0,5 g L⁻¹ e cloreto de sódio 0,5 g L⁻¹) foi inoculado com uma alíquota de 4 mL do inóculo e incubado a 28°C por 72 horas a 180 rpm em incubadora orbital (Shaker orbital Tecnal - TE 422, Brasil). Após a produção, parte do fermentado foi centrifugado a 9000 rpm por 10 min a 4 °C e posteriormente filtrado em membranas de 0,22 μm para obtenção do sobrenadante livre de células (SLC), enquanto a outra parte foi autoclavada por 15 min a 120°C para obtenção do fermentado autoclavado.

O fungo *S. sclerotiorum* foi cultivado em meio BDA em placa de Petri de 90 mm de diâmetro por cinco dias a 25 °C. Deste cultivo, foi retirado um disco micelial de 6 mm de diâmetro, que foi adicionado ao centro de três placas de petri contendo BDA, com poços de 6 mm de diâmetro, perfurados em duas extremidades. Em um dos poços foram adicionados 200 μL do sobrenadante livre de células, enquanto no poço oposto foram adicionados 200 μL do do fermentado autoclavado. Três placas inoculadas somente com um disco micelial do fungo foram utilizadas como controle. Após 96 horas, o crescimento micelial do fungo foi medido em mm com auxílio de um paquímetro e calculada porcentagem de inibição.

3.4.6 ATIVIDADE DA CEPA CMLL06 SOBRE *SCLEROTINIA SCLEROTIORUM* EM SEMENTES DE SOJA

O fermentado da CMLL06 foi obtido conforme descrito no item (3.4.4), posteriormente congelado a - 80 °C e liofilizado por 48 h a - 60 °C. Para determinação da concentração em unidades formadoras de colônia por grama (ufc/g), 1 g do líofilo foi suspenso em solução salina (0,85% cloreto de sódio) e realizou-se uma diluição seriada, sendo plaqueadas as diluições -6 e -7. Com o líofilo, realizou-se a formulação do produto (pedido de patente pendente) com concentração final de 1×10^{10} ufc/mL.

Além da CMLL06, foram utilizados os seguintes produtos comerciais:

i) Inoculante (*Bradyrhizobium japonicum*), ii) Fungicida microbiológico Serenade® (*Bacillus amyloliquefaciens* + *Trichoderma harzianum*), iii) Fungicida químico Certeza® (Tiofanato metílico + Fluazinan) e iv) Premax® (protetor celular). Para o produto CMLL06, a dose utilizada foi de 500 mL/ 500 kg de sementes, enquanto para os demais produtos seguiu-se a recomendação do fabricante.

Sementes de soja foram desinfectadas por imersão em solução de hipoclorito de sódio (1% v:v) por 1min, depois submetidas à tríplice lavagem (1 min) por imersão em água purificada estéril e secas em cabine de segurança por quatro horas. Lotes de 200 sementes foram separados e tratados com os produtos em sacos plásticos. Após 24 h, as sementes foram infectadas com *S. sclerotiorum*, por meio de contato direto com o micélio fúngico por 24 horas.

Vinte sementes foram dispostas de forma linear em placas de petri (150 mm) previamente forradas com papel filtro estéril umedecido com água purificada estéril. As placas foram acondicionadas em câmara de incubação por sete dias sob temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 h. O delineamento adotado foi o inteiramente casualizado, com seis tratamentos e cinco repetições, sendo cada repetição uma placa com 20 sementes. O primeiro tratamento foi o controle, com sementes sem tratamento e sem infecção, o segundo consistiu em sementes somente infectadas pelo fungo, o terceiro, quarto, quinto e sexto consistiram em sementes tratadas com os produtos (inoculante comercial + premax), (inoculante comercial + CMLL06), (inoculante comercial + Premax + fungicida microbiológico) e (inoculante comercial + Premax + fungicida químico), respectivamente.

Na avaliação, sementes sadias e germinadas foram quantificadas e o resultado expresso em porcentagem de sementes sadias e porcentagem de

germinação. Atendidos os pressupostos, os dados foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste da diferença mínima significativa (LSD).

3.4.7 PREPARO DO INÓCULO PARA O ENSAIO DE CONTROLE DE NEMATOIDES

A cepa bacteriana foi ativada em placa de petri contendo meio de cultura LBA (item 3.4.3), incubada em câmara B.O.D. (SS Scientific) por 24 h a 28 °C. Posteriormente, foi estriada em duas placas contendo o mesmo meio de cultura, que foram incubadas novamente sob as mesmas condições por 24 h.

A biomassa bacteriana formada na superfície da placa foi raspada e suspendida em solução (0,85% cloreto de sódio). 1 mL desta suspensão foi diluído em série em tubos de ensaio contendo 9 mL de solução salina e 100 µL das diluições -5, -6 e -7 foram plaqueados em meio de cultura LB para determinação de ufc/ mL. Posteriormente, a suspensão foi ajustada para $2,0 \times 10^9$ ufc/mL.

3.4.7.1 ENSAIOS PARA CONTROLE DE NEMATOIDES

Foram conduzidos dois experimentos nos meses de setembro a novembro de 2020 para testar o potencial nematicida da cepa CMLL06 de *B. velezensis* na cultura da soja. Um para *Pratylenchus brachyurus*, conduzido no Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná (IDR-PR) e outro para *Meloidogyne javanica*, conduzido na Universidade Estadual de Londrina (UEL).

Os ensaios foram realizados com a cultivar de soja Bônus®, suscetível a *M. javanica* e *P. brachyurus*. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e oito repetições. Os tratamentos consistiram em sementes tratadas com CMLL06, sementes sem tratamento, que foi considerado o controle positivo (planta inoculada somente com o nematoide) e sementes tratadas com três bionematicidas comerciais, separadamente, sendo eles o químico (abamectina) e os biológicos a base de *B. firmus* e outro de uma mistura de *B. subtilis* e *B. licheniformis*.

O tratamento de sementes foi realizado em béqueres de 50 mL, onde foram inoculadas com os produtos separadamente e homogeneizadas até que estivessem secas. Para a cepa CMLL06 foi inoculada uma alíquota de 1,23 µL de

suspensão por semente, enquanto para os produtos comerciais, foi seguida a recomendação do fabricante. As sementes foram semeadas em copos de isopor de 946 mL, contendo areia e solo na proporção 7:1 previamente esterilizados. Acrescentou-se 3 g de Osmocote® (15% N, 9% P₂O₅, 12% K₂O, 1% Mg, 2.3% S, 0.05% Cu, 0.45% Fe, 0.06% Mn, 0.02% Mo) por copo.

Sete dias após a semeadura, as plantas foram inoculadas com 1 mL de uma suspensão contendo 1000 ovos e juvenis de *M. javanica* ou 500 ovos e juvenis de *P. brachyurus*, que foram extraídos de acordo com a metodologia proposta por Boneti e Ferraz (1981) e quantificados em câmara de Peters sob microscópio de luz. Sessenta dias após a semeadura, as raízes das plantas foram lavadas em água corrente, secas com papel absorvente e pesadas em balança semi-analítica. Posteriormente, foram processadas de acordo com a metodologia proposta por Boneti e Ferraz (1981) e os ovos e juvenis foram quantificados em câmara de Peters sob microscópio de luz. Foi determinado o fator de reprodução do nematoide (n° de nematoides na amostra/n° de nematoides inoculados) e o número de nematoides por grama de raiz.

3.5 Resultados

3.5.1 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA

A coloração de Gram mostrou que a cepa CMLL06 é uma bactéria Gram-positiva em forma de bastonete e produz endósporos posicionados na parte terminal da célula.

3.5.3 MONTAGEM E ANOTAÇÃO DO GENOMA

As estratégias de montagem do genoma CLC Genomics Workbench 11 e IDBA Hybrid demonstram os melhores resultados para montagem. Um BLASTN foi realizado usando o maior *contig* para encontrar um genoma de referência para a etapa CONTIGuator. O isolado LABIM 40 de *B. velezensis* (CP023748) (BAPTISTA *et al.*, 2018) foi selecionado para alinhar os *contigs* e para gerar os *pseudoconting* (*scaffold*). O *scaffold* continha 38 *gaps* que foram alinhados manualmente usando Bowtie2 e CLC

Genomics Workbench 11. Quando fechado, o genoma mostrou uma taxa de 98,73% de alinhamento das leituras, um tamanho de 3.981.409 pb (Tabela 1). Pela anotação do genoma, foi verificado um conteúdo de GC de 46,48%, 4047 CDS sendo 24 daqueles relacionados com rRNA e 77 sequências de tRNA.

Tabela 1. Características do genoma de *Bacillus velezensis* CMLL06.

| | |
|-------------------------------|-----------|
| Tamanho do Genoma (bp) | 3.981.409 |
| Conteúdo GC (%) | 46,48% |
| Plasmídeo | - |
| Total CDS preditos | 4047 |
| rRNA operons | 24 |
| tRNA operons | 77 |
| Leitura do alinhamento (%) | 98,73% |
| Nº do Acesso no GenBank | |

3.5.4 IDENTIFICAÇÃO DO ISOLADO E ANÁLISE FILOGENÉTICA

Comparando a cepa CMLL 06 com as principais espécies do grupo *B. subtilis*, foi observado que a identidade média de nucleotídeos (ANI) e hibridização digital DNA-DNA (dDDH) foi superior com os grupos dos isolados da espécie *B. velezensis*, com valores variando de 98,31 – 99,97% para ANI e 55,7 a 92,4% para dDDH (Tabela 2). Quando comparado com *B. amyloliquefaciens* (isolados DSM7 e MT 45) os valores de ANI e dDDH foram de 94,05 - 94,12% e 55,7%, respectivamente, enquanto para *B. subtilis* (isolados 168 e D125) foram de 77,17 - 77,26% e 20,7, respectivamente. Para *B. cereus* (isolado FR135) os valores foram de 66,3 e 38,9%, respectivamente. Na comparação realizada com o Gegenees e orthoANI/GGDC, foi observado que a cepa CMLL 06 está localizada dentro do cluster contendo a maioria das espécies de *B. velezensis* (Figura 8). O genoma circular do isolado CMLL06 está representado na Figura 9.

Figura 8. Árvore filogenômica da similaridade entre os isolados do grupo *Bacillus subtilis*. A matriz foi gerada pelo GENEIES e exportada para SplitsTree.

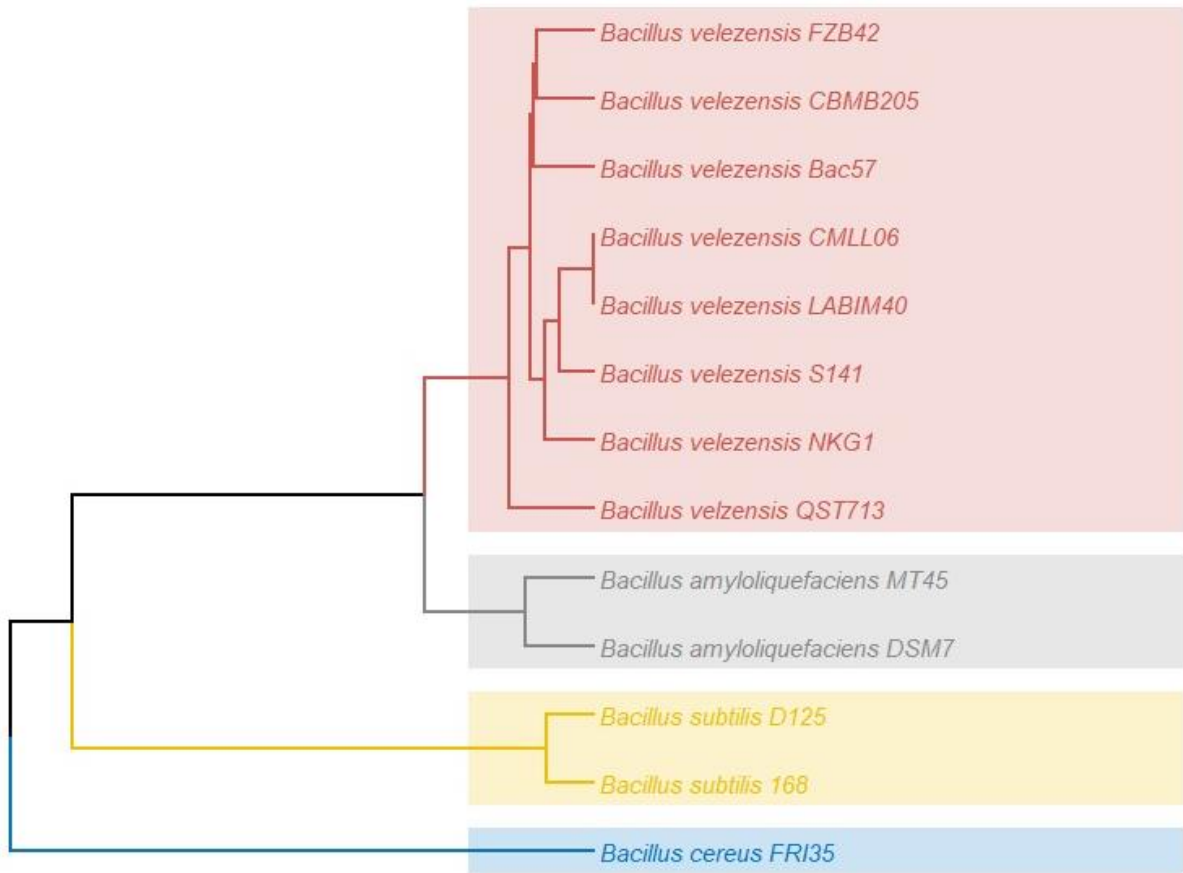
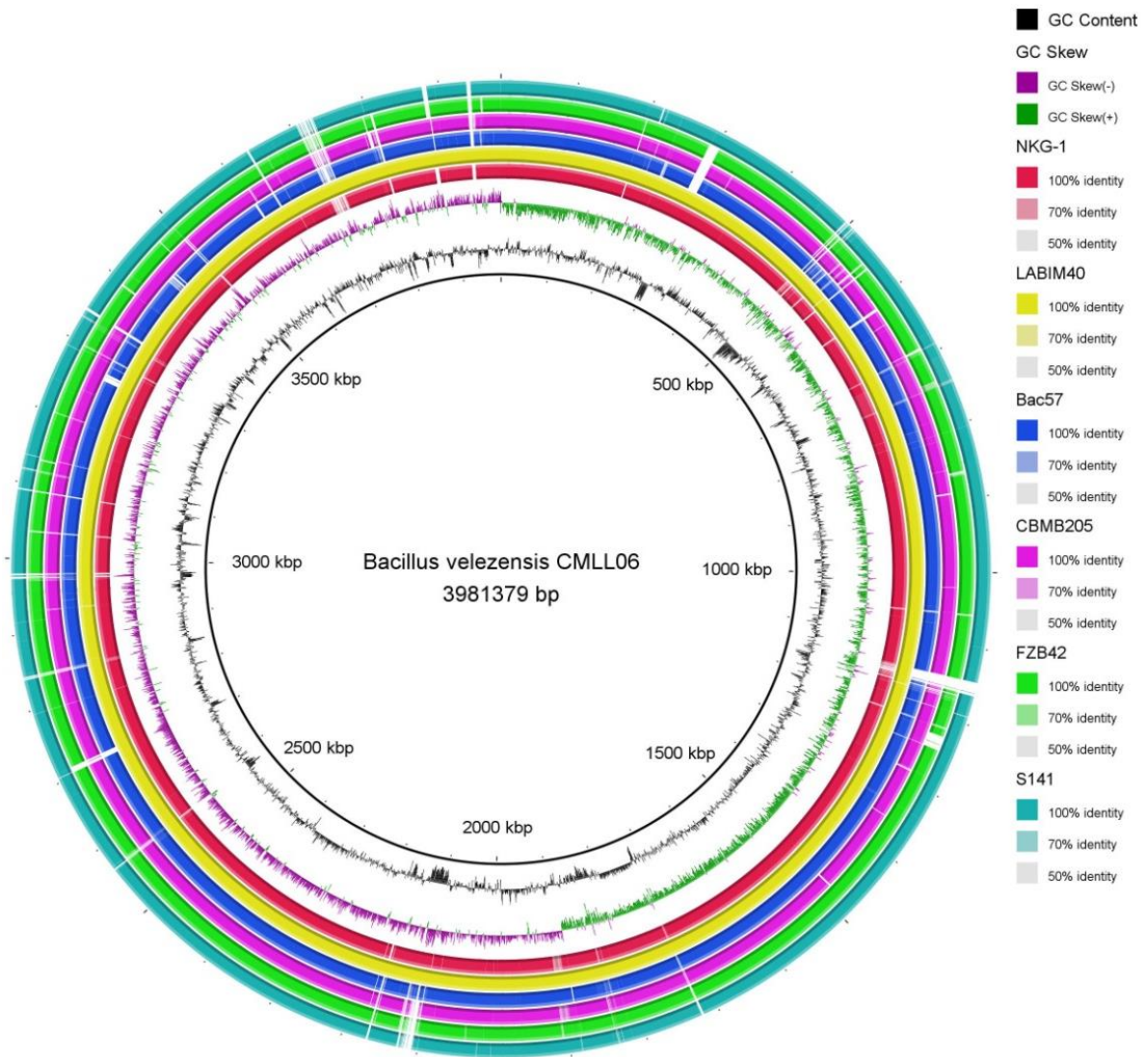


Tabela 2. Comparação do genoma do isolado CMLL 06 com outras espécies de *Bacillus*.

| Isolados | Acesso n° GenBank | dDDH(%) ^{1/} | ANI (%) | GC (%) | Bp (Gp) | Fonte |
|--|-------------------|-----------------------|---------|--------|------------|---|
| <i>Bacillus velezensis</i> | | | | | | |
| CMLL6 | | | | 46,48 | 3,98 | |
| QST713 | CP025079 | 88,1 | 98,51 | 45,9 | 4,23 | Produto Comercial da Bayer (Pandín <i>et al.</i> , 2010) |
| FZB42 | CP000560.2 | 91,0 | 98,93 | 46,5 | 3,92 | Solo (Chen <i>et al.</i> , 2009) |
| CBMB205 | CP011937.1 | 84,3 | 98,31 | 46,5 | 3,93 | Dados não publicados(Lee e Jeon, 2015) |
| Bac57. | CP033054.1 | 84,9 | 98,31 | 45,89 | 4,23 | Lagoa do mar vermelho |
| NKG1 | CP024203.1 | 91,1 | 98,92 | 46,3 | 4,2 | Solos vulcânicos nas montanhas Changbai (Ge <i>et al.</i> , 2016) |
| S141 | AP018402.1 | 92,4 | 99,11 | 46,5 | 3,97 | Rizosfera da soja (Sibponkrung <i>et al.</i> , 2017) |
| LABIM40 | CP025079.1 | 100 | 99,97 | 46,5 | 3,97 | Contaminante (Baptista <i>et al.</i> , 2018) |
| <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> | | | | | | |
| DSM7 | NC_014551.1 | 55,7 | 94,05 | 46,1 | 3,98 | Rizosfera do trigo (Hao <i>et al.</i> , 2012) |
| MT45 | NC_014551.1 | 55,7 | 94,12 | 46,1 | 3,89 | Não especificado |
| <i>Bacillus subtilis</i> | | | | | | |
| D125 | CP020102.1 | 20,7 | 77,26 | 43,6 | 4,14 | Solo (Niazi <i>et al.</i> , 2014) |
| <i>Bacillus cereus</i> | | | | | | |
| FR135 | CP003747.1 | 38,9 | 66,30 | 35,4 | 5,48 | Não especificado |

^{1/}dDDH: Hibridização digital DNA-DNA, ANI: identidade média de nucleotídeos, GC: conteúdo de guanina e citosina no genoma, e Bp: tamanho do genoma em gigabases (10⁶)

Figura 9. Representação circular do genoma do isolado *Bacillus velezensis* CMLL 06 usando o programa BRIG.



3.5.5 ANÁLISE ANTISMASH DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Por meio do webserver antiSMASH 5.1.0 foram identificados 13 *clusters* de genes biossintéticos (BGCs) no genoma da cepa CMLL 06 (Tabela 1). Destes, seis apresentaram 100% de similaridade e estão ligados à síntese de bacilisina, bacilibactina, difficidina, fengicina, bacilaene e macrolactina. Um *cluster* obteve 56% de similaridade com a síntese de surfactina e outro com 7% de similaridade com a síntese de butirósina A e B.

Tabela 3. Genes codificadores de biomoléculas encontrados no genoma do isolado CMLL 06 identificado por meio do webserver antSMASH.

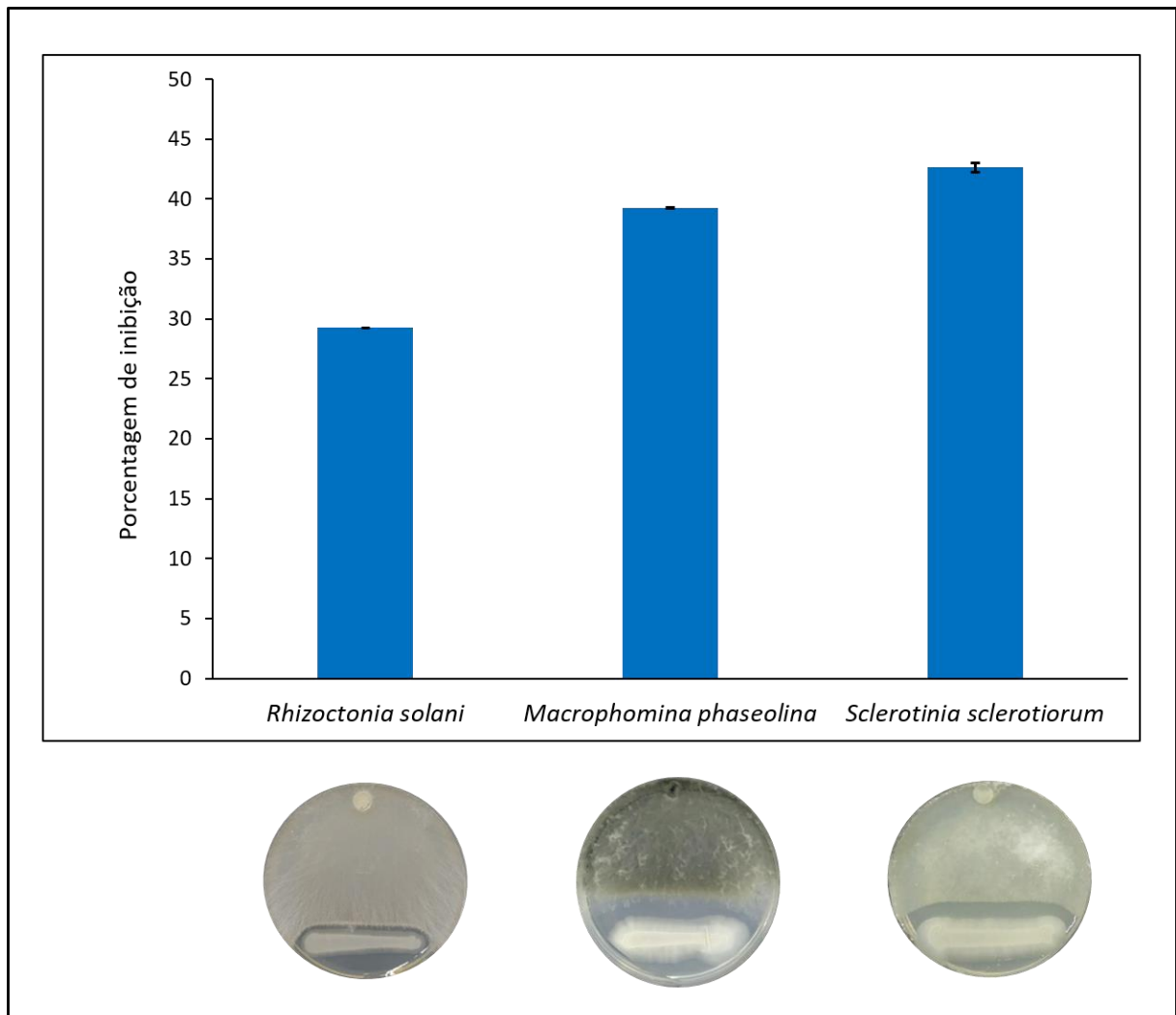
| 11 | Tipo | A partir de (pB) | Até (pB) | Agrupamento conhecido | Similaridade (%) | |
|----|---|------------------|----------|-----------------------|------------------|-----|
| 1 | Outros | 319.241 | 360.659 | bacilisina | Outros | 100 |
| 2 | RiPP-like, NRPS | 887.909 | 938.416 | bacilibactina | NRP | 100 |
| 3 | transAT-PKS, transAT-PKS-like | 1564.019 | 1670.323 | difficidina | Polyketide + NRP | 100 |
| 4 | T3PKS | 1790.886 | 1830.849 | | | |
| 5 | Terpeno | 1924.316 | 1944.443 | | | |
| 6 | NRPS, betalactone, transAT-PKS | 1968.032 | 2107.593 | fengicina | NRP | 100 |
| 7 | transAT-PKS-like, transAT-PKS, NRPS, T3PKS | 2167.353 | 2276.912 | bacilaene | Polyketide + NRP | 100 |
| 8 | transAT-PKS | 2501.255 | 2589.491 | Macrolactina | Polyketide | 100 |
| 9 | Terpeno | 2921.767 | 2942.507 | | | |
| 10 | PKS-like | 3025308 | 3066.552 | Butirosina A e B | Saccharide | 7 |
| 11 | NRPS | 3418.913 | 3462.854 | | NRP:lipopetideo | 43 |
| 12 | NRPS | 3599.344 | 3660.833 | surfactina | NRP:lipopetideo | 56 |
| 13 | LAP, thiopeptide | 3671.549 | 3701.285 | surfactina | | |

NRPS, non-ribosomal peptide synthetase; NRP, non-ribosomal peptide. PKS, polyketide synthetase. AT, acetyltransferase; T3PKS, type 3 Pks.

3.5.6 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

No ensaio por cultura dupla a cepa CMLL06 apresentou atividade antifúngica para *Macrophomia phaseolina*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum*, com porcentagens de controle do crescimento micelial de 39,26, 29,65 e 42,65%, respectivamente (Figura 10). Não foi observado contato entre CMLL06 com os fungos, de modo que o crescimento micelial dos fungos foi paralisado antes de chegar na cultura bacteriana, indicando atividade antagonista da bactéria.

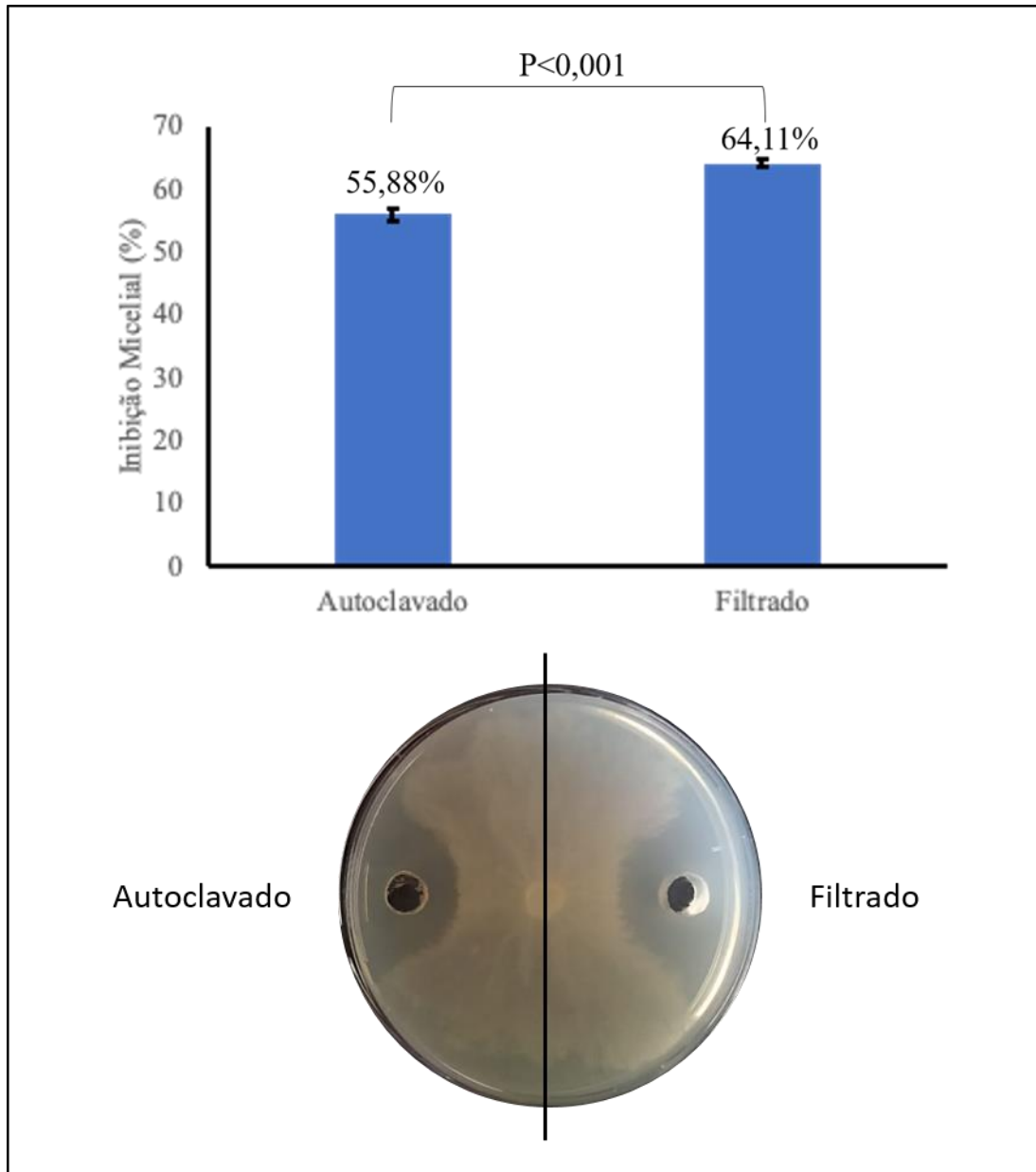
Figura 10. Inibição do crescimento micelial (%) para *Macrophomia phaseolina*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum* pela cepa CMLL 06.



Quando analisado o sobrenadante livre de células (filtrado) do isolado CMLL06 contra *S. sclerotiorum* também foi observado a alta porcentagem de

inibição, com valor de (66%) (Figura 11). Além disso, também foi avaliado o fermentado autoclavado contra *S. sclerotiorum* para avaliação da estabilidade das moléculas, sendo detectado 58% de inibição, indicando o alto potencial de controle dos metabólitos da CMLL06.

Figura 11. Inibição do crescimento micelial (%) de *Sclerotinia sclerotiorum* utilizando o fermentado e o sobrenadante livre de células da cepa *Bacillus velezensis* CMLL 06

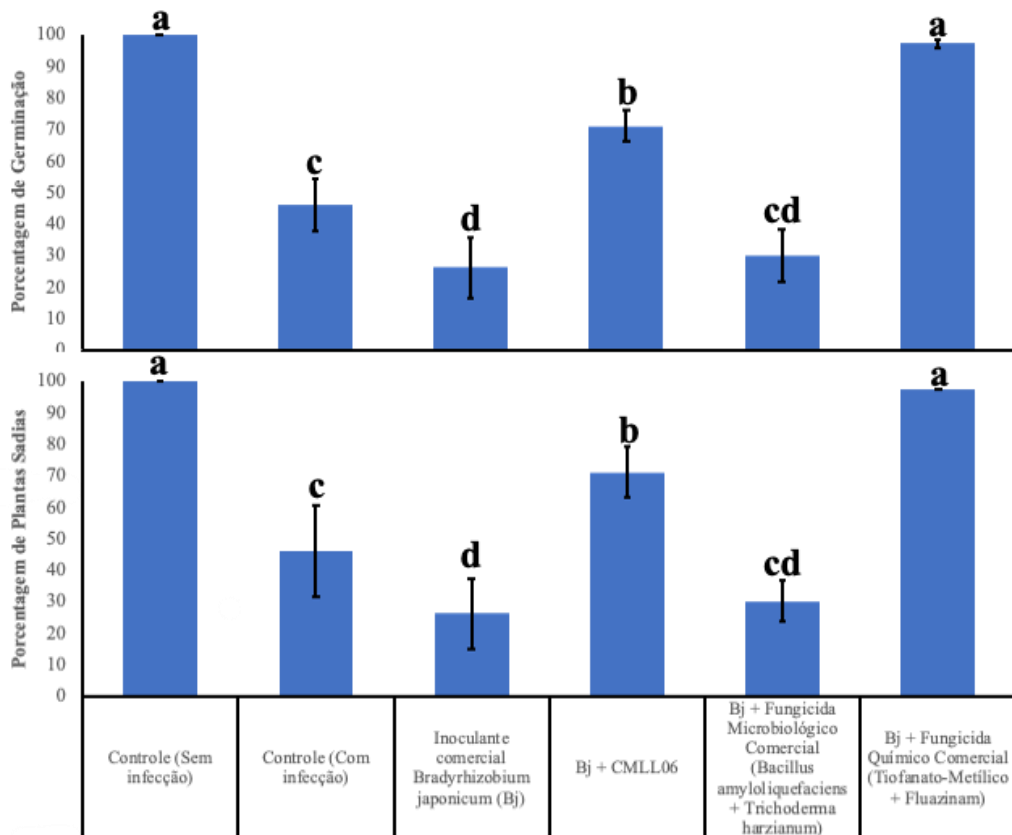


No experimento de infecção de *S. sclerotiorum* em sementes soja, foi observado efeito significativo ($p < 0,01$) dos tratamentos para as características porcentagem de germinação e de plântulas saudias. Para germinação (%), os maiores

valores foram observados para os tratamentos controle (sem infecção) e fungicida químico (100 e 97%, respectivamente), seguido pela cepa CMLL06 com 71% (Figura 12). Os menores valores de germinação (%) foram detectados para o inoculante *Bradyrhizobium japonicum* (Semias 5079 e 5080), para o fungicida microbiológico comercial e para o controle (com infecção), com valores de 26, 30 e 46%, respectivamente (Figura 12).

A porcentagem de plântulas saudias foi concordante com os resultados obtidos na germinação (%), sendo os maiores valores detectados para os tratamentos controle (sem infecção) e químico (100%), seguidos pela CMLL06 com 73%. Os tratamentos *B. japonicum*, fungicida microbiológico comercial e o controle (com infecção) proporcionaram 21, 33 e 58% de plântulas saudias, respectivamente.

Figura 12. Porcentagem de germinação e plântulas saudias de soja inoculadas com diferentes produtos e, posteriormente, infectada com *Sclerotinia sclerotiorum*.

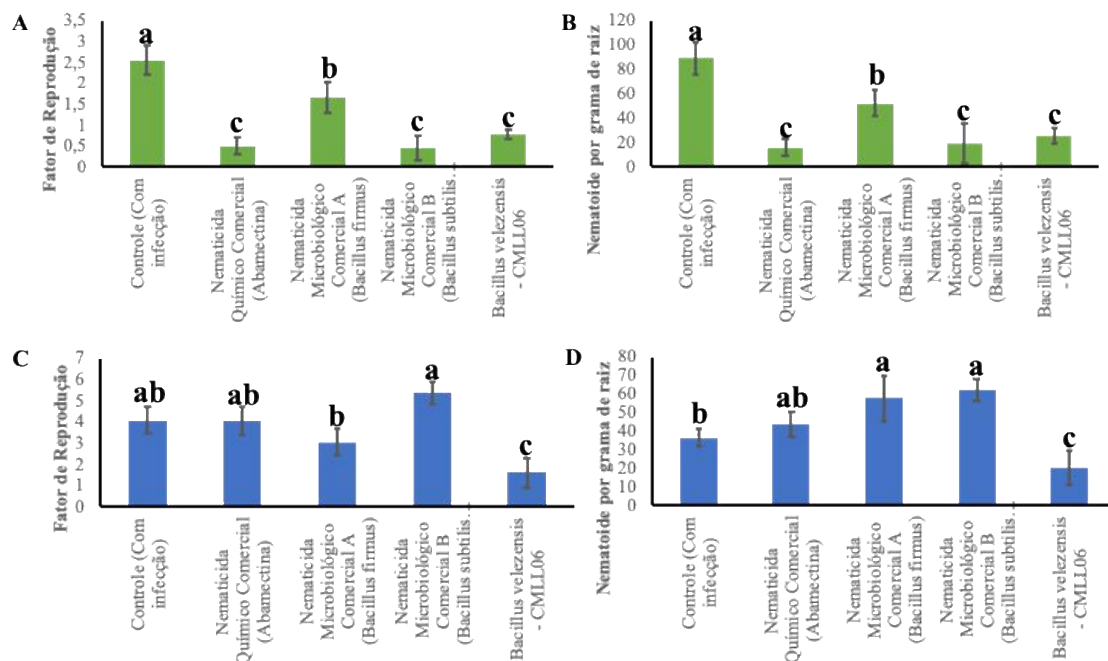


Os tratamentos seguidos de mesma letra não diferem estatisticamente ($p < 0,01$) pelo teste da diferença mínima significativa (LSD).

3.5.7 ATIVIDADE NEMATICIDA

Pela análise de variância foi observado efeito significativo ($p < 0,01$) dos tratamentos para fator de reprodução (FR) e número de nematoides por grama de raiz (NGR) em *M. javanica* e *P. brachyurus* na cultura da soja. Para *M. javanica*, os tratamentos nematicida químico (Abamectina), nematicida microbiológico comercial A (*Bacillus subtilis* + *Bacillus licheniformis*) e cepa CMLL 06 obtiveram os menores valores para FR (0,51, 0,46 e 0,79, respectivamente) e NGR (16,02, 19,51 e 25,35, respectivamente) quando comparado com os demais tratamentos (Figura 6A e B). O nematicida microbiológico comercial B (*Bacillus firmus*) apresentou FR e NGR de 1,65 e 52,35, respectivamente, diferindo do controle (sem tratamento) cujos valores foram de 2,55 e 89,07, respectivamente.

Figura 13. Fator de reprodução (FR) e número de nematoides por grama de raiz (NGR) em soja inoculadas com diferentes produtos via tratamento de semente e, posteriormente, inoculadas com *Meloidogyne javanica* (A e B) e *Pratylenchus brachyurus* (C e D).



Os tratamentos de mesma letra não diferem estatisticamente ($p < 0,01$) pelo teste da diferença mínima significativa (LSD).

Para *P. brachyurus*, o menor valor de FR e NGR foi obtido para a cepa CMLL06 (1,61 e 20,39, respectivamente) (Figura 13 C e D). Para os demais

tratamentos, os maiores valores de FR foram obtidos para os tratamentos nematicida microbiológico A, controle (sem tratamento) e químico (5,37, 4,06 e 4,05, respectivamente), enquanto para NGR os maiores valores foram obtidos para nematicida microbiológico A, nematicida microbiológico B e químico (62,1, 57,59 e 43,48, respectivamente).

3.6 Discussão

As doenças de plantas causadas por patógenos transmitidos pelo solo são reconhecidas mundialmente como um fator crucial devido à perda de produtividade e a dificuldade na erradicação, principalmente em sistemas de cultivo intensivo (CORATO, 2020; PANTH *et al.*, 2020). Diversas medidas de controle vêm sendo recomendadas, sendo o uso de agentes de biocontrole uma importante estratégia para controle dos patógenos do solo. Esses agentes podem atuar através do parasitismo, antibiose, competição pelo hospedeiro e nutrientes, além da indução de resistência em plantas (KOHL *et al.*, 2019). O gênero *Bacillus* é considerado um importante agente de biocontrole e vem sendo amplamente empregado contra diversos patógenos e em diversas culturas (SHAFI *et al.*, 2017; ALOO *et al.*, 2019). No presente trabalho, a equipe identificou uma cepa (número da coleção: CMLL06), proveniente do solo da Fazenda Escola da Universidade Estadual de Londrina (UEL), com alto efeito de antagonismo contra *Sclerotinia sclerotiorum* e de *swarming*. Com base nessas informações, esse isolado foi sequenciado, visando-se identificar genes relacionados ao potencial de biocontrole contra patógenos de solo. Além disso, foram avaliados o potencial desse isolado para o controle de fungos (*M. phaseolina*, *R. solani* e *S. sclerotiorum*) e nematoides (*M. javanica* e *P. brachyurus*).

A cepa CMLL06 foi identificada como *Bacillus velezensis* e, pela análise genômica, foram identificados *clusters* de genes específicos relacionados com a biossíntese de metabólitos secundários, que têm importante papel na supressão de patógenos e na promoção de crescimento da planta. *Bacillus velezensis* tem demonstrado ser um importante agente de biocontrole e promotor de crescimento vegetal em diversas culturas de importância econômica (PAN *et al.*, 2017; CHEN *et al.*, 2018; FAN *et al.*, 2018; AZABOU *et al.*, 2020; ZHU *et al.*, 2020; TEIXEIRA *et al.*, 2021). Por exemplo, o isolado FZB42, que já foi citado em mais de 140 artigos,

relacionados à identificação de compostos antimicrobianos responsáveis pelo efeito de biocontrole, a expressão de genes envolvidos na interação planta-bactéria, no estudo de pequenos RNAs reguladores (sRNAs) e na modificação de enzimas envolvidas em síntese de compostos antimicrobianos. Essas informações estão depositadas no banco de dados 'AmyloWiki' (FAN *et al.*, 2018).

Na cepa CMLL06, foram identificados lipopeptídeos (LP) (surfactina e fengicina), que têm um importante efeito na supressão de patógenos, na estimulação de mecanismos de defesa das plantas e na formação de biofilme, que é um fator chave para o sucesso da colonização de agentes de controle biológico (ONGENA e JACQUES, 2008; ZHAO *et al.*, 2017; PENHA *et al.*, 2020). Seu modo de ação na atividade antifúngica está relacionado com a sua natureza anfílica e sua interação com a membrana da célula alvo, resultando em mudanças na estrutura e na permeabilidade (ZHAO *et al.*, 2017; PENHA *et al.*, 2020). Nesse contexto, essa classe de metabólitos pode estar diretamente relacionada à atividade antifúngica da CMLL06 nos ensaios *in vitro* e *in vivo* contra fungos fitopatogênicos, podendo ser alvo de futuros estudos *in silico* e de *downstream*. Para nematoides, Kavitha *et al.* (2012) verificaram que os LP de surfactina e iturina produzidos por *B. subtilis* foram responsáveis pela supressão da eclosão de ovos de *M. incognita* e desempenharam importante papel na mortalidade dos juvenis.

Outra classe de metabólitos secundários identificada na CMLL06 foi as dos policetídeos (PKS) (diflicidina, bacilaene e macrolactina), que têm importante papel na atividade antimicrobiana, atuando na inibição seletiva da síntese de proteínas (CHEN *et al.*, 2006; CAULIER *et al.*, 2019). Chen *et al.* (2009) verificaram que a diflicidina produzida pelo isolado FZB42 apresentou efeito antagônico significativo a *Erwinia amylovora*, que causa o fogo bacteriano em árvores frutíferas. Por sua vez, Yuan *et al.* (2012) demonstraram o efeito da macrolactina produzida pelo isolado NJN-6 (*B. amyloliquefaciens*) no controle de *Ralstonia solanacearum*, importante patógeno do solo. Nesse contexto, CMLL06 tem potencial para controle de doenças bacterianas do solo ainda não explorado.

Na cepa CMLL06, foi também identificado o metabólito bacilibactina, importante sideróforo (MIETHKE *et al.*, 2006), que é altamente conservado no grupo *B. subtilis*, sendo induzido em resposta à limitação de ferro no meio ambiente. Ele permite que *Bacillus* sp. adquira Fe^{3+} e outros metais de maneira

eficiente, privando assim os fitopatógenos deste elemento essencial (NIEHUS *et al.*, 2017; ANDRIC *et al.*, 2020).

Quatro dos 13 *clusters* identificados na cepa CMLL06 não apresentaram similaridade no banco de dados e, portanto, seus produtos ainda não foram identificados e descritos, abrindo oportunidades para novos estudos. Teixeira *et al.* (2021), minerando o genoma do isolado de *B. velezensis* CMRP 4490, também não identificaram cinco dos 13 *clusters* dos metabólitos secundários, indicando novos *cluster* de metabólitos secundários.

A cepa *B. velezensis* CMLL06 apresentou uma ampla gama de metabólitos antimicrobianos, indicando ser importante agente de biocontrole para proteção das plantas. Esse fato é corroborado nos ensaios *in vitro* contra diversos fungos de solo de importância agrícola e no ensaio *in vivo* contra *S. sclerotiorum*. Nesse ensaio, CMLL06 proporcionou incremento de 54 e 26% na germinação e no número de plantas saudias, respectivamente, quando comparado com o controle (com infecção), enquanto o tratamento microbiológico comercial não apresentou diferença do controle. Quando comparado com sementes tratadas somente com *Bradyrhizobium japonicum* + Premax® (protetor bacteriano), a CMLL06 apresentou incrementos de 173 e 247% na germinação e de plantas saudias, respectivamente, demonstrando a importância desse microrganismo na co-inoculação com *B. japonicum* em áreas infectadas com *S. sclerotiorum*.

CMLL06 também apresentou efeito de supressão contra os principais nematoides da cultura da soja, *M. javanica* e *P. brachyurus*, com redução do FR de 69 e 60%, respectivamente. Os produtos comerciais (químico, microbiológico A e microbiológico B) apresentaram redução de 80, 35 e 82% respectivamente, do FR para *M. javanica*, enquanto para *P. brachyurus*, não foi observado efeito significativo desses tratamentos em relação ao controle. Portanto, CMLL06 tem importante papel para o controle de doenças do solo na cultura da soja, sendo promissor para o desenvolvimento de produtos comerciais.

3.7 Conclusão

A cepa CMLL06 foi identificada como *Bacillus velezensis* e diminuiu o fator de reprodução de *Meloidogyne javanica* e *Pratylenchus brachyurus* e o número de nematoides por grama de raiz na cultura da soja. A atividade antagonista *in vitro*

contra *Rhizoctonia solani*, *Macrophomina phaseolina* e *Sclerotinia sclerotiorum* e *in vivo* contra *S. sclerotiorum* pode estar relacionada aos *clusters* ligados à síntese de surfactina, fengicina e bacillibactina, presentes no genoma da cepa. Levando em consideração os resultados deste estudo, CMLL06 é um microrganismo com potencial biotecnológico para utilização como agente de controle de doenças de solo na cultura da soja.

5 REFERÊNCIAS

- AB RAHMAN, SHARIFAH FARHANA SYED *et al.* Emerging microbial biocontrol strategies for plant pathogens. **Plant Science**, Queensland, v. 267, p. 102-111, 2018.
- ALOO, BECKY N.; MAKUMBA, B. A.; MBEGA, ERNEST R. The potential of Bacilli rhizobacteria for sustainable crop production and environmental sustainability. **Microbiological research**, Eudoret, v. 219, p. 26-39, 2019.
- ALVES, G. C. S. *et al.* Avaliação *in vitro* do efeito de rizobactérias sobre *Meloidogyne incognita*, *M. incognita* e *Pratylenchus zaeae*. **Revista Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 78, n. 4, p. 557-564, dez, 2011.
- ANDREWS, J. H. Biological control in the phyllosphere. **Annual Review of Phytopathology**, Wisconsin, v. 30, p. 603-635, 1992.
- ANDREWS, SIMON. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. 2010.
- ANDRIĆ, SOFIJA; MEYER, THIBAUT; ONGENA, MARC. *Bacillus* responses to plant-associated fungal and bacterial communities. **Frontiers in Microbiology**, Gembloux v. 11, p. 1350, 2020.
- ARAUJO, F. F. de.; BRAGANTE, R. J.; BRAGANTE, C. E. Controle genético, químico e biológico de meloidoginose na cultura da soja. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia v. 42, n. 2, p. 220-224, 2012.
- ARAUJO, J. M.; *et al.* Predatory activity of *chlamydospores* of the fungus *Pochonia chlamydosporia* on *Toxocaracanis* eggs under laboratory conditions. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 22, p. 171-174, 2013.
- AZABOU, MANEL CHEFFI *et al.* The endophytic strain *Bacillus velezensis* OEE1: An efficient biocontrol agent against *Verticillium* wilt of olive and a potential plant growth promoting bacteria. **Biological Control**, Tunísia, v. 142, p. 104168, 2020.
- BAPTISTA, JULIA PEZARINI *et al.* Complete genome sequence of *Bacillus velezensis* LABIM40, an effective antagonist of fungal plant pathogens. **Genome announcements**, Londrina, v. 6, n. 25, 2018.

BARROS, Ricardo. Doenças da cultura da soja. **Tecnologia e produção de soja e milho**, p. 109-122, 2009.

BEDENDO, I. P.; MASSOLA JÚNIOR, N. S.; AMORIM, L. Controles cultural, físico e biológico de doenças de plantas. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. Manual de Fitopatologia. 4. ed. **Ouro Fino: Agronômica Ceres**, 2011, p. 367-388.

BENEDUZI, ANELISE; AMBROSINI, ADRIANA; PASSAGLIA, LUCIANA MP. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents. **Genetics and molecular biology**, Porto Alegre, v. 35, n. 4, p. 1044-1051, 2012.

BERNI, R. F; DA SILVEIRA, Marques P; DA SILVA J. L. C. Influência do preparo de solo e da rotação de culturas na severidade de podridões radiculares no feijoeiro comum. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiás, p. 69-74, 2002.

BETTIOL, W.; GHINI, R. Solos supressivos. In: MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; MENEZES, M. (Eds.). Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais. Recife: **Imprensa Universitária da Universidade Federal Rural de Pernambuco**, Pernambuco, p. 125-152, 2005.

BLANCO, ANGEL JOSÉ VIEIRA *et al.* Diversity and pathogenicity of *Rhizoctonia* species from the Brazilian Cerrado. **Plant disease**, v. 102, n. 4, p. 773-781, 2018.

BLIN, KAI *et al.* antiSMASH 5.0: updates to the secondary metabolite genome mining pipeline. **Nucleic acids research**, v. 47, n. W1, p. W81-W87, 2019.

BOLGER, ANTHONY M.; LOHSE, MARC; USADEL, BJOERN. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, p. 2114-2120, 2014.

BONETI, J. I. S.; FERRAZ, S. Modificação do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Porto Alegre, v. 6, n. 3, 1981.

BRAGA, F. R.; ARAÚJO, J. V. Nematophagous fungi for biological control of gastrointestinal nematodes in domestic animal. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Viçosa, v. 98, p. 71 – 82, 2014.

- BRIDA, A. L.; *et al.* Variabilidade espacial de *Meloidogyne javanica* em soja. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 42, p. 75–179, 2016.
- CASTAGNONE-SERENO, P.; DANCHIN, E. G.; PERFUS-BARBEOCH, L.; ABAD, P. Diversity and evolution of root-knot nematodes, genus *Meloidogyne*: new insights from the genomic era. **Annual review of phytopathology**, v. 51, p. 203-220, 2013.
- CASTILLO, P. *et al.* *Pratylenchidae*: the lesion nematodes. In: MANZANILLA-LÓPEZ, R. H.; MARBÁN-MENDOZA, N. Practical plant nematology. Montecillo, Mexico: **Editorial Colegio de Postgraduados**, cap.12, p.411-478, 2012.
- CASTRO, A. A. *et al.* Comparação entre as técnicas de Baermann modificada e Donald utilizadas para recuperar larvas infectantes de nematóides gastrintestinais de ruminantes da pastagem. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 12, p. 88-91, 2011.
- CAULIER, Simon *et al.* Overview of the antimicrobial compounds produced by members of the *Bacillus subtilis* group. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 302, 2019.
- CAWOY, H. *et al.* *Bacillus*-based biological control of plant diseases. In: CAWOY, H. *et al.* **Pesticides in the modern world-pesticides use and management**, p. 273-302, 2011.
- CHEN, LIANG *et al.* A comprehensive understanding of the biocontrol potential of *Bacillus velezensis* LM2303 against *Fusarium* head blight. **PLoS One**, v. 13, n. 6, p. e0198560, 2018.
- CHEN, X. H. *et al.* Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 reveals its potential for biocontrol of plant pathogens. **Journal of biotechnology**, v. 140, n. 1-2, p. 27-37, 2009b.
- CHEN, Xiao-Hua *et al.* More than anticipated—production of antibiotics and other secondary metabolites by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. **Journal of molecular microbiology and biotechnology**, v. 16, n. 1-2, p. 14-24, 2009.
- CHEN, XIAO-HUA *et al.* Structural and functional characterization of three polyketide synthase gene clusters in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB 42. **Journal of bacteriology**, v. 188, n. 11, p. 4024-4036, 2006.

CHINHEYA, C. C; YOBO, K. S; LAING, M D. Biological control of the rootknot nematode, *Meloidogyne javanica* (Chitwood) using *Bacillus* isolates, on soybean. **Biological control**, v. 109, p. 37-41, 2017.

CONAB. Acompanhamento da safra brasileira de grãos. Disponível em: <https://www.conab.gov.br>. Acesso em: 31 jan 2021.

CONAB. Perspectivas para agropecuária. Disponível em: <https://www.conab.gov.br>. Acesso em: 05 out 2020.

CORATO, UGO. Disease-suppressive compost enhances natural soil suppressiveness against soil-borne plant pathogens: A critical review. **Rhizosphere**, v. 13, p. 100192, 2020.

COSTA, SARAH S. *et al.* *Fusarium paranaense* sp. nov., a member of the *Fusarium solani* species complex causes root rot on soybean in Brazil. **Fungal biology**, v. 120, n. 1, p. 51-60, 2016.

DE SILVA, N. I. *et al.* Use of endophytes as biocontrol agents. **Fungal Biology Reviews**, v.33, n. 2, p. 133-148, 2017.

DERAL. Prognóstico Cultura SOJA - Dezembro de 2020. Paraná, 2021. Disponível em: <http://www.agricultura.pr.gov.br/Pagina/Departamento-de-Economia-Rural-Deral>. Acesso em: 31 jan 2021.

DIAS, W. P. *et al.* Nematóides em soja: identificação e controle. **Embrapa Soja-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2010.

EL-NAGDI, W. M. A; ABD-EL-KHAIR, H; DAWOOD, M. G. Nematicidal Effects of *Bacillus subtilis* and *Bacillus pumilus* Against *Meloidogyne incognita* infecting Pea. **Adv Agric Sci**, v. 6, n. 4, p. 52-59, 2018.

EMBRAPA. Tecnologias de produção de soja – região central do Brasil. Londrina: Embrapa Soja: Embrapa Cerrados: **Embrapa Agropecuária Oeste**, p. 225, 2007.

FAN, BEN *et al.* *Bacillus velezensis* FZB42 in 2018: the gram-positive model strain for plant growth promotion and biocontrol. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 2491, 2018.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT. 2020. Acesso em: 5 jan. de 2021. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en>>.

- FAVORETO, L. *et al.* Diagnose e manejo de fitonematóides na cultura da soja. **Informe Agropecuário**, *Belo Horizonte*, v. 40, n.306, p.18-29, 2019.
- FERNANDES, R. H. *et al.* *Pochonia chlamydosporia* e *Bacillus subtilis* no controle de *Meloidogyne incognita* e *M. javanica* em mudas de tomateiro. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 1, p. 34-38, 2014.
- FERRAZ, L. C. C. B.; BROWN, D. J. F. Nematologia de plantas: fundamentos e importância. **Manaus: Norma Editora**, v. 1, p. 251, 2016.
- FERRAZ, L. C. C. B.; MONTEIRO, A R. Nematoides. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**, 2011.
- FERRAZ, S.; FREITAS, L. D.; LOPES, E. A; DIAS-ARIEIRA, C. R. Manejo sustentável de fitonematóides. **Viçosa: UFV**, v. 245, 2010.
- FERREIRA, R. J. **Espécies de *Bacillus* no controle de *Meloidogyne incognita* e *Meloidogyne javanica* in vitro e na cana de- açúcar**. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Agronomia (produção Vegetal), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Unesp, 196 Jaboticabal, 2015.
- FIRA, DJORDJE *et al.* Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. **Journal of biotechnology**, v. 285, p. 44-55, 2018.
- GAMLIEL, A.; KATAN, J. Soil solarization: Theory and practice. **APS Press/The American Phytopathological Society**, 2012.
- GODOY, C. V. *et al.* Doenças da soja. **Manual de Fitopatologia**, v. 2, p. 657-676, 2016.
- GOULART, A. M. C. Aspectos gerais sobre nematóides-das-lesões-radiculares (gênero *Pratylenchus*). Planaltina: **Embrapa Cerrados**. (Embrapa Cerrados. Documentos, 219), p. 30, 2008.
- GUREVICH, Alexey *et al.* QUASt: quality assessment tool for genome assemblies. **Bioinformatics**, v. 29, n. 8, p. 1072-1075, 2013.
- HARTMAN, GLEN LEE *et al.* (Ed.). Compendium of soybean diseases and pests. St. Paul, MN: American **Phytopathological Society**, 2015.

- HENNING, A. A. *et al.* Manual de identificação de doenças de soja. **Embrapa Soja-Documentos (INFOTECA-E)**, 2014.
- ITO, M. F. Principais doenças da cultura da soja e manejo integrado. **Nucleus**, v. 10, n. 3, p. 83-101, 2013.
- JUHÁSZ, A. C. P. *et al.* Desafios fitossanitários para a produção de soja. **Embrapa Agrossilvipastoril-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, v. 34, n. 276, p. 66-75, 2013.
- KARSSSEN, G.; MOENS, M. Root-knot nematodes. In: PERRY, R.N.; MOENS, M. **Plant Nematology**. Wallingford: CABI, p. 59-90, 2006.
- KATAN, J. Diseases caused by soilborne pathogens: biology, management and challenges. **Journal of Plant Pathology**, p. 305-315, 2017.
- KAVITHA PG, JONATHAN EI, NAKKEERAN S. Effects of crude antibiotic of *Bacillus subtilis* on hatching of eggs and mortality of juveniles of *Meloidogyne incognita*. **Nematol Medit** 40:203–206, 2012.
- KERRY, B. R. Rhizosphere interactions and the exploitation of microbial agents for the biological control of plant - parasitic nematodes. **Annual review of phytopathology**, v. 38, p. 423 - 441, 2000.
- KIM, D. S.; SANIFZADEH, M.; KUMAR, A. Trend of biodiesel feedstock and its impact on biodiesel emission characteristics. **Environmental Progress e Sustainable Energy**, v. 37, n. 1, p. 7 - 19, 2018.
- KÖHL, JÜRGEN; KOLNAAR, ROGIER; RAVENSBERG, WILLEM J. Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: relevance beyond efficacy. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 845, 2019.
- LANGMEAD, BEN; SALZBERG, STEVEN L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. **Nature methods**, v. 9, n. 4, p. 357, 2012.
- LAYTON C.*et al.* *Bacillus spp.*; perspectiva de su efecto biocontrolador mediante antibiosis en cultivos afectados por fitopatógenos. **Ciencias biomédicas**, v. 9, p. 113-214, 2014.

- LEHNER, M, S. *et al.* Meta-analytic modelling of the incidence–yield and incidence–sclerotial production relationships in soybean white mould epidemics. **Plant Pathology**, v. 66, n. 3, p. 460-468, 2017.
- LOPES, U. P.; MICHEREFF, S. J. Desafios do Manejo de Doenças Radiculares Causadas por Fungos. **Recife: Edufrpe**, 2018.
- MACHADO, D. F. M. *et al.* *Trichoderma* no Brasil: o fungo e o bioagente. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 35, p. 274-288, 2012.
- MARIANO R. L. R.; SILVEIRA, E. B.; GOMES, A. M. A. Controle biológico de doenças radiculares. In: MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; MENEZES, M. **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**. Recife: Imprensa Universitária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, p. 303-321, 2005.
- MARIN-BRUZOS, M.; GRAYSTON, S. J. Controle biológico de nematóides por rizobactérias promotoras de crescimento de plantas: Metabólitos secundários envolvidos e aplicações potenciais. In: MARIN-BRUZOS, M.; RAYSTON, S. J. **Secondary Metabolites of Plant Growth Promoting Rhizomicroorganisms**, Springer, Cingapura, p. 253-264, 2019.
- MASSAWE, V. C. *et al.* Volatile compounds of endophytic *Bacillus* spp. have biocontrol activity against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Phytopathology**, v. 108, n. 12, p. 1373-1385, 2018.
- MIETHKE, MARCUS *et al.* Ferri-bacillibactin uptake and hydrolysis in *Bacillus subtilis*. **Molecular microbiology**, v. 61, n. 6, p. 1413-1427, 2006.
- MIETHKE, MARCUS *et al.* Ferri-bacillibactin uptake and hydrolysis in *Bacillus subtilis*. **Molecular microbiology**, v. 61, n. 6, p. 1413-1427, 2006.
- MORANDI, M. A.; BETTIOL, W.; PAULA JÚNIOR, T. J. Controle biológico de doenças de plantas. In: ZAMBOLIM, L.; JESUS JÚNIOR, W. C.; RODRIGUES, F. A. **O essencial da fitopatologia: controle de doenças de plantas**. Viçosa: UFV, p. 175-234, 2014.
- MUKHERJEE, M *et al.* *Trichoderma*–plant–pathogen interactions: advances in genetics of biological control. **Indian Journal of Microbiology**, v. 52, p. 522-529, 2012.

MUNIR, S. *et al.* Biocontrol ability of *Trichoderma*. **International Journal of Agriculture and Crop Sciences**, v. 6, p. 1246-1252, 2013.

OLIVEIRA, CAMILLA MARTINS *et al.* Biological control of *Pratylenchus brachyurus* with isolates of *Trichoderma* spp. on soybean. **Biological Control**, v. 152, p. 104425, 2021.

ONGENA, Marc; JACQUES, Philippe. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. **Trends in microbiology**, v. 16, n. 3, p. 115-125, 2008.

ORIGINAL, A. **Radiculares Reaction of soybean cultivars to root lesion nematodes**, p. 439 – 444, 2014.

PANTH, MILAN; HASSLER, SAMUEL C.; BAYSAL-GUREL, FULYA. Methods for management of soilborne diseases in crop production. **Agriculture**, v. 10, n. 1, p. 16, 2020.

PARRA, J. R. P. Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores. **Editora Manole**, 2002.

PENG, YU *et al.* IDBA—a practical iterative de Bruijn graph de novo assembler. In: **Annual international conference on research in computational molecular biology**. Springer, Berlin, Heidelberg. p. 426-440, 2010.

PENHA, RAFAELA O. *et al.* *Bacillus* lipopeptides as powerful pest control agents for a more sustainable and healthy agriculture: recent studies and innovations. **Planta**, v. 251, n. 3, p. 1-15, 2020.

PERRY, R. N; MAURICE M; JAMES L; STARR, E. D. S. Nemátodos das galhas. CABI, 2009.

PINHEIRO, J. B. *et al.* Manejo de nematoides na cultura da alface. **Embrapa Hortaliças-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2013.

PINHEIRO, J. B.; PEREIRA, R. B.; SUINAGA, F. A. Manejo de nematoides na cultura do tomate. **Embrapa Hortaliças-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2014.

POLAND, J. A. *et al.* Shades of gray: the world of quantitative disease resistance. **Trends in plant science**, v. 14, n. 1, p. 21-29, 2009.

- RAM, RATUL M. *et al.* Biocontrol technology: eco-friendly approaches for sustainable agriculture. In: **Omics technologies and bio-engineering**. Academic Press, p. 177-190, 2018.
- REIS, ERLEI MELO; BOARETTO, CRISTIANE; DANELLI, ANDERSON LUIZ DURANTE. *Macrophomina phaseolina*: density and longevity of microsclerotia in soybean root tissues and free on the soil, and competitive saprophytic ability. **Summa Phytopathologica**, v. 40, n. 2, p. 128-133, 2014.
- REIS, RAFAELA RIBEIRO *et al.* Differential gene expression in response to water deficit in leaf and root tissues of soybean genotypes with contrasting tolerance profiles. **Genetics and Molecular Biology**, v. 43, n. 2, 2020.
- SAVARY, SERGE *et al.* The global burden of pathogens and pests on major food crops. **Nature ecology & evolution**, v. 3, n. 3, p. 430-439, 2019.
- SEDIYAMA, T.; TEIXEIRA, R. C.; BARROS, H. B. Tecnologias de produção e uso da soja. **Editora Macenas**. Londrina, p.77-91, 2009.
- SHAFI, JAMIL; TIAN, HUI; JI, MINGSHAN. Bacillus species as versatile weapons for plant pathogens: a review. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 31, n. 3, p. 446-459, 2017.
- SILVA, M. C. L.; SANTOS, C. D. G.; SILVA, G. S. Species of *Meloidogyne* associated with vegetables in microregions of the state of Ceará. **Revista Ciência Agronômica**, v. 47, n. 4, p. 710-719, 2016.
- SINCLAIR, J. B.; BACKMAN, P. A. Compendium of soybean diseases. **American Phytopathological Society**, 1989.
- SUASSUNA, N. D. *et al.* Manejo de doenças do algodoeiro. **Embrapa Algodão-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2006.
- TEIXEIRA, GUSTAVO MANOEL *et al.* Genomic Insights Into the Antifungal Activity and Plant Growth-Promoting Ability in *Bacillus velezensis* CMRP 4490. **Frontiers in microbiology**, v. 11, 2021.
- TORAL, LAURA *et al.* Antifungal activity of lipopeptides from *Bacillus* XT1 CECT 8661 against *Botrytis cinerea*. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 1315, 2018.

- VAN-LOON, L. C.; BAKKER, P. A. H. M.; PIETERSE, C. M. J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual review of phytopathology**, v. 36, n. 1, p. 453-483, 1998.
- VAZ, M. V. *et al.* Controle biológico de *Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne incognita* com *Bacillus subtilis*. **Perquirere**, v. 8, p. 203-212, 2011.
- WEBER, Tilmann *et al.* antiSMASH 3.0—a comprehensive resource for the genome mining of biosynthetic gene clusters. **Nucleic acids research**, v. 43, n. W1, p. W237-W243, 2015.
- WEI, L. *et al.* Isolation and characterization of a rhizobacterial antagonist of root-knot nematodes. **PloS one**, v. 9, n.1, p. e85988, 2014.
- WEN, L. *et al.* Suppression of soilborne diseases of soybean with cover crops. **Plant disease**, v. 101, n. 11, p. 1918-1928, 2017.
- WHEELER, T.; RUSH, C. M. Soilborne diseases. In: MALOY, O. C.; MURRAY, T. D. **Encyclopedia of Plant Pathology**. New York. JohnWiley & Sons, p.935-947, 2001.
- WILLBUR, JAIME *et al.* An overview of the *Sclerotinia sclerotiorum* pathosystem in soybean: impact, fungal biology, and current management strategies. **Tropical Plant Pathology**, v. 44, n. 1, p. 3-11, 2019.
- YORINORI, J. T. Situação atual das doenças potenciais no Cone Sul. In: **Congresso Brasileiro de Soja**, p. 171 - 186, 2002.
- YUAN, JUN *et al.* Production of bacillomycin-and macrolactin-type antibiotics by *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 for suppressing soilborne plant pathogens. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 60, n. 12, p. 2976-2981, 2012.
- ZHAO, HAOBIN *et al.* Biological activity of lipopeptides from *Bacillus*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 101, n. 15, p. 5951-5960, 2017.
- ZHOU, D. *et al.* Rhizosphere Microbiomes from Root Knot Nematode Non-infested Plants Suppress Nematode Infection. **Microbial ecology**, v. 78, n. 2, p. 470 - 481, 2019.
- ZHOU, L. *et al.* Evaluation of bacterial biological control agents for control of root-knot nematode disease on tomato. **Crop Protection**, v. 84, p. 8-13, 2016.

ZHU, ZHEYUAN *et al.* Analysis of the antifungal properties of *Bacillus velezensis* B-4 through a bioassay and complete-genome sequencing. **Frontiers in Genetics**, v. 11, 2020.