



PÂMELLA DE SÁ CAETANO

**INTERFERÊNCIA NO PROCESSO DE QUIMIOTAXIA DOS
JUVENIS DE SEGUNDO ESTÁDIO (J2) DE *Meloidogyne*
javanica POR ISOLADOS BACTERIANOS**

**LAVRAS - MG
2023**

PÂMELLA DE SÁ CAETANO

**INTERFERÊNCIA NO PROCESSO DE QUIMIOTAXIA DOS JUVENIS DE
SEGUNDO ESTÁDIO (J2) DE *Meloidogyne javanica* POR ISOLADOS
BACTERIANOS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Universidade Federal de Lavras como parte
das exigências do Curso de Agronomia, para a
obtenção do título de bacharel.

Prof. Dr. Jorge Teodoro de Souza
Orientador

**LAVRAS – MG
2023**

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras pela oportunidade para a realização da minha graduação.

Aos meus pais por todo apoio.

Ao professor Dr. Jorge Teodoro de Souza pela orientação, dedicação e valiosos ensinamentos para a realização deste trabalho.

A todos do laboratório de Nematologia, Danielle, Letícia, Larissa, Willian, Cléber e Tarlei pela amizade e ajuda nos experimentos.

RESUMO

Meloidogyne javanica é uma das espécies de nematoides das galhas que causa grandes perdas na agricultura tropical. O presente estudo, tem como objetivo avaliar os efeitos de isolados bacterianos sobre a reprodução e quimiotaxia dos juvenis de segundo estágio (J2) de *M. javanica*. Os experimentos foram realizados com tratamentos constituídos de 20 isolados bacterianos com seis repetições e os controles foram tratados com água destilada. Para a avaliação da reprodução de *M. javanica*, determinou-se o número de galhas por grama e ovos por grama de raiz de plantas de tomateiro. O índice de quimiotaxia (IC) foi calculado para determinar a atratividade ou repelência dos J2 aos isolados bacterianos em placas de Petri. As análises estatísticas, incluindo os testes de médias foram feitas por meio do software estatístico R. Os resultados obtidos mostram que três isolados bacterianos causaram as maiores reduções no número de galhas por grama e de ovos por grama de raízes, com médias de 34,7% e 44,8%, respectivamente. Os mesmos isolados atraíram os J2 de *M. javanica*. Reduções médias de 26,2% no número de galhas por grama e de 38,7% no número ovos por grama foram observadas para os isolados bacterianos repelentes, enquanto que estas reduções foram de 31,1% para o número de galhas por grama e de 43,4% no número de ovos por grama para os isolados que atraíram os J2 de *M. javanica*. Portanto, os isolados bacterianos que atraíram os J2 parecem ter maior potencial do que aqueles que repeliram.

Palavras-chave: *Meloidogyne javanica*; Quimiotaxia; Isolados bacterianos.

ABSTRACT

Meloidogyne javanica is one of the root-knot nematode species that causes major losses in tropical agriculture. The present study aims to evaluate the effects of bacterial isolates on the reproduction and chemotaxis of *M. javanica* second-stage juveniles (J2). The experiments were carried out with treatments consisting of 18 bacterial isolates with six replicates and the controls were treated with distilled water. To evaluate the reproduction of *M. javanica*, the number of galls and eggs per gram of tomato roots was determined. The chemotaxis index (CI) was calculated to determine the attractiveness or repellency of J2s to bacterial isolates in Petri dishes. Statistical analyses, including mean comparison were performed using the R statistical software. The results obtained show that three bacterial isolates caused the greatest reductions in the number of galls and eggs per gram of roots, with averages of 34.7 % and 44.8%, respectively. The same isolates attracted the *M. javanica* J2s. Average reductions of 26.2% in the number of galls per gram and 38.7% in the number of eggs per gram were observed for the repellent bacterial isolates, while these reductions were 31.1% for the number of galls per gram and of 43.4% in the number of eggs per gram for the isolates that attracted the J2s of *M. javanica*. Therefore, bacterial isolates that attracted J2s appear to have greater potential than those that repelled them.

Keywords: *Meloidogyne javanica*; Chemotaxis; Bacterial isolates

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	7
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	8
2.1	<i>Meloidogyne</i> spp.....	8
2.2	Quimiotaxia.....	9
2.3	Métodos de controle.....	10
2.4	Mecanismos de ação das bactérias como agentes de controle biológico	11
2.4.1	Mecanismos Diretos.....	11
2.4.2	Mecanismos indiretos.....	12
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1	Isolados bacterianos utilizados neste estudo	13
3.2	Inóculo de <i>M. javanica</i>	13
3.3	Inóculo bacteriano.....	14
3.4	Instalação dos experimentos.....	15
3.5	Ensaio de quimiotaxia.....	15
3.6	Delineamento experimental e análises estatísticas	16
4	RESULTADOS.....	16
4.1	Efeito dos isolados bacterianos sobre a reprodução de <i>M. javanica</i>	16
4.2	Efeito dos isolados bacterianos sobre a quimiotaxia dos J2 de <i>M. javanica</i>	18
5	DISCUSSÃO.....	19
6	CONCLUSÃO.....	20
	REFERÊNCIAS	21

1 INTRODUÇÃO

Os nematoides parasitas de plantas representam uma grande ameaça para a agricultura mundial (Poveda et al., 2020). As perdas agrícolas causadas por eles são de aproximadamente US\$ 173 bilhões ao ano em todo mundo (Elling, 2013). A maioria das perdas são atribuídas ao gênero *Meloidogyne* (Elling, 2013). Quando os nematoides do gênero *Meloidogyne* parasitam as raízes, vários sintomas são observados, entre eles a formação das galhas radiculares (AIOUB et al., 2022). As principais espécies desse gênero são *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* e *M. hapla* (Ferraz e Brown, 2016).

No Brasil as espécies *M. incognita* e *M. javanica* são amplamente distribuídas em todas as regiões e são responsáveis pelos maiores prejuízos dentre os nematoides causadores de galhas (Gao et al., 2016). Por exemplo, a espécie *M. javanica* destaca-se por causar perdas significativas à cultura da soja (Ferraz e Brown, 2016; Vos et al., 2012). Devido aos danos e ao alto impacto econômico, o controle das espécies de *Meloidogyne* é uma demanda global crescente (Poveda et al., 2020). Para controlar as espécies do gênero *Meloidogyne*, ainda são aplicados os nematicidas sintéticos (Mhatre et al., 2019). No entanto, o seu uso excessivo e alta toxicidade tem levado ao banimento de muito deles pelos órgãos competentes (Tariq et al., 2020). Entre eles o brometo de metila, que foi proibido na maioria dos países, fato que afetou as estratégias de controle de nematoides (Oka, 2010).

A busca por novas estratégias de controle tem se intensificado nos últimos anos (Cheng et al., 2017). Dentre as estratégias, podemos citar o controle biológico com microrganismos vivos antagonistas aos nematoides, como as bactérias (Poveda et al., 2020). As bactérias podem controlar os nematoides por meio de vários mecanismos de ação, entre eles a liberação de compostos orgânicos voláteis (COVs) (Cheng et al., 2017). Os COVs podem agir sobre a quimiotaxia dos nematoides (Wang et al., 2021). Os nematoides utilizam a quimiotaxia como o principal meio para localizar a planta hospedeira (Rasmann et al., 2012). Desta forma, estudar a interação dos nematoides com estes COVs liberados no solo pode contribuir para o desenvolvimento de estratégias de controle por meio da interferência na sua orientação (Sikder e Vestergard, 2020).

No presente estudo objetivou-se: 1) selecionar os isolados bacterianos que interferem na reprodução de *M. javanica*; 2) estudar a interferência desses isolados na quimiotaxia dos J2 de *M. javanica*.

Este trabalho é composto de duas partes: 1) um referencial teórico sobre nematoides do gênero *Meloidogyne*, o processo de quimiotaxia e métodos de controle; 2) uma parte experimental onde são relatados os resultados de experimentos de seleção de isolados bacterianos e sua interferência na reprodução e no processo de quimiotaxia dos J2.

PARTE 1: REFERENCIAL TEÓRICO

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Meloidogyne* spp.

Os nematoides das galhas, gênero *Meloidogyne*, são endoparasitas sedentários obrigatórios e de maior importância econômica mundial (Saucet et al., 2016). Até o momento são conhecidas mais de 100 espécies do gênero *Meloidogyne* capazes de parasitar cerca de 3.000 espécies de plantas (Jagdale et al., 2021). As principais espécies são de clima tropical, como *M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria*, e *M. hapla* de clima temperado (Jones et al., 2013). Elas são responsáveis por perdas de 95% da produção agrícola no mundo causadas por nematoides de galhas (Galbieri e Belot, 2016). Os nematoides de galhas são disseminados com o plantio em áreas infestadas, uso de mudas infectadas, água ou equipamentos contaminados (Ferraz e Brown, 2016).

O ciclo de vida dos nematoides do gênero *Meloidogyne* é de aproximadamente 30 dias com as fases de ovo, juvenis (J1, J2, J3 e J4) e adulto (Diyapoglu et al., 2022). As fêmeas de *Meloidogyne* depositam em média 500 ovos em uma massa gelatinosa produzida em suas glândulas retais (Jones et al., 2013). Essas massas são compostas por glicoproteínas, com a função de agregar e proteger os ovos na superfície externa ou no interior da raiz (Saucet, 2016). No ovo ocorre a embriogênese resultando na formação dos juvenis de primeiro estágio (J1) (Jones et al., 2013). O J1 sofre a primeira ecdise dentro do ovo e origina os juvenis de segundo estágio (J2) (Ferraz e Brown, 2016). Os J2 formados eclodem dos ovos, em condições ideais de umidade e temperaturas de aproximadamente 30 °C (Elling, 2013; Goto et al., 2013).

No solo, os J2 seguem os gradientes quimiotáticos em busca da raiz e penetram na região da coifa ou zona de alongamento (Campos et al., 2011; Diypoglu et al., 2022). Após entrar na raiz, os J2 migram de forma intercelular em direção ao cilindro vascular, selecionam de cinco a sete células e estabelecem o sítio de alimentação (Ferraz e Brown, 2016). Os J2 inserem seu

estilete bucal, localizado na extremidade anterior do corpo para perfurar mecanicamente a parede celular da planta hospedeira (Jagdale et al., 2021). Algumas secreções também são injetadas pelo estilete na parede celular da planta (Bartlem et al., 2013). Elas são secretadas para facilitar a penetração, migração interna e parasitismo (Jones et al., 2013). As secreções esofagianas são injetadas induzindo a reprogramação das células para formar estruturas altamente especializadas (Siddique e Grundler, 2018). Essas estruturas são células multinucleadas (células gigantes) que se expandem por meio de várias mitoses na ausência de citocinese (Tapia-Vázquez et al., 2022). Essas células possuem metabolismo ativo, citoplasma denso e núcleos expandidos (Tapia-Vázquez et al., 2022). Elas formam a fonte de alimentação contínua do J2 durante seu desenvolvimento até a fase adulta (Mejias et al., 2019). No sistema radicular surgem as galhas, resultantes de reações de hipertrofia e hiperplasia no tecido cortical adjacente ao corpo do nematoide (Ferraz e Brown, 2016).

Ao se alimentar o J2 fica mais robusto e torna-se sedentário (Tapia-Vázquez et al., 2022). O J2 passa por mais três ecdises (J3 e J4) até o estágio adulto (Ferraz e Brown, 2016). Os estádios J3 e J4 não possuem estilete, portanto não se alimentam (Ferraz e Brown, 2016). O J4 sofre a última ecdise entrando na fase adulta, que apresenta dimorfismo sexual (Tapia-Vázquez et al., 2022). Os machos possuem forma cilíndrica e migram da raiz, enquanto as fêmeas permanecem sedentárias e iniciam o processo de oviposição (Aioub et al., 2022).

2.2 Quimiotaxia

Para iniciar o processo de infecção, os J2 eclodidos precisam localizar a raiz da planta hospedeira (Reynolds et al., 2011). No entanto, a permanência dos J2 no solo depende de suas reservas lipídicas (Tapia-Vázquez et al., 2022). Portanto, a quimiotaxia é fundamental para os J2 encontrarem a planta hospedeira (Jones et al., 2013). A quimiotaxia pode ser definida como a orientação do J2 em direção ou para longe da fonte de estímulos (Rasman et al., 2012). Esses estímulos são produtos químicos vegetais originários de exsudatos radiculares liberados pela planta hospedeira (Dutta et al., 2012). Os estímulos são reconhecidos por meio de órgãos receptores sensoriais, como os anfídeos e fasmídeos (Tsai et al., 2019). Os produtos químicos em exsudatos radiculares atraem nematoides para as raízes ou resultam em repelência, inibição da motilidade ou morte (Yang et al., 2016).

Estudos anteriores relataram que raízes de plantas hospedeiras liberam estímulos que atraem os J2, enquanto substâncias de plantas não hospedeiras podem repeli-los (Reynolds et

al., 2011; Wang et al., 2019). Alguns desses estímulos são formados por atrativos de longa distância (COVs) e por atrativos de curta distância (moléculas químicas solúveis em água) (Reynolds et al., 2011). Os COVs salicilato de metila, d-3-careno, sabineno, 2-isopropil-3-metoxipirazina e tridecano, são exemplos de voláteis atrativos aos J2 (Sikder e Vestergard, 2020). Os compostos vegetais, catecol, ácido cafeico, fenólicos, flavonoides e ácidos graxos, são atrativos aos J2 (Tsai et al., 2019). Por outro lado, outros compostos vegetais presentes nos exsudatos radiculares, como moléculas lipofílicas, podem resultar em repelência (Dutta et al., 2012).

Os microrganismos também liberam compostos no solo que são fontes de estímulos (Reynolds et al., 2011). Dentre esses estímulos, destacam-se os COVs liberados por fungos e bactérias, que podem ser atrativos ou repelentes aos J2 (Wang et al., 2019). Foi relatado que muitos COVs são capazes de influenciar a quimiotaxia dos J2 e causar sua morte (Cheng et al., 2017). A alteração do perfil metabólico dos exsudatos radiculares é outra forma de influenciar a eficácia da quimiotaxia dos J2 (Li et al., 2019). Por exemplo, a colonização de bactérias do gênero *Bacillus* em raízes de tomate causam alterações nos compostos dos exsudatos radiculares que repelem os J2 (Li et al., 2019). Além disso, os próprios nematoides sintetizam moléculas conhecidas como ascarosídeos, que desempenham um papel na atração ou repelência dos J2 (Manosalva et al., 2015).

2.3 Métodos de controle

Os métodos conhecidos incluem rotação de cultura com espécies não hospedeiras, uso de cultivares resistentes, aplicação de nematicidas sintéticos e controle biológico (Silva et al., 2018). Os nematicidas sintéticos apresentam falta de especificidade, alto custo e benefícios de curta duração (Silva et al., 2018). Muitos deles não são seletivos e podem reduzir os microrganismos do solo, incluindo os antagonistas (Silva et al., 2018).

O uso excessivo de nematicidas sintéticos causa riscos de contaminação e danos ambientais, por isso vários deles foram banidos do mercado (Cao et al., 2019). Com todas essas questões ambientais e regulatórias fez-se necessário a busca por outras estratégias consideradas mais eficazes e sustentáveis para o controle de nematoides (Cao et al., 2019). O controle biológico tem sido considerado um método ambientalmente correto e economicamente sustentável (Sasanelli et al., 2021). Portanto, é urgente a busca por agentes de controle biológico para serem utilizados no controle dos nematoides do gênero *Meloidogyne* (Cheng et al., 2017).

O controle biológico de nematoides é o uso de microrganismos antagonistas vivos para suprimir a densidade populacional de nematoides ou reduzir a sua capacidade de causar danos (Poveda et al., 2021). Esses microrganismos são referidos como agentes de controle biológico (BCAs) (Poveda et al., 2021). Vários microrganismos são utilizados como BCAs, entre eles fungos, bactérias, vírus e nematoides predadores de vida livre (Francisco et al., 2021). Os microrganismos são encontrados naturalmente ou por meio da manipulação ou introdução no ambiente (Xiang et al., 2018). Eles utilizam vários mecanismos de ação contra os nematoides, como parasitismo, competição, liberação de toxinas, entre outros (Xiang et al., 2018). Sendo os fungos e as bactérias os principais microrganismos antagonistas com potencial para serem usados como agentes de controle biológico (Francisco et al., 2021). Entre os fungos que apresentam potencial como BCAs estão os do gênero *Trichoderma*, o fungo nematófago *Pochonia chlamydosporia*, *Purpureocillium lilacinum* e os fungos micorrízicos (Chen et al., 2021; Poveda et al., 2021). As bactérias são BCAs promissores devido aos efeitos diretos dos metabólitos que podem causar a mortalidade do J2 ou aumentar os mecanismos de defesa da planta hospedeira (Hu et al., 2017).

Uma variedade de espécies de bactérias exibe atividades antagônicas contra os nematoides (Migunova e Sasanelli, 2021). Elas podem ser encontradas e isoladas de diferentes lugares, como as bactérias da rizosfera (rizobactérias), ou colonizando tecidos internos das plantas (bactérias endofíticas) (Zhao et al., 2018). As bactérias também podem ter efeito no crescimento da planta, mas essa promoção de crescimento não é considerada um mecanismo de controle (Stenberg et al., 2021). Os gêneros mais explorados comercialmente são *Bacillus* e *Pseudomonas*, considerados antagonistas dominantes dos nematoides na rizosfera (Mhatre et al., 2018). Esses gêneros tem espécies com ampla distribuição no solo, que produzem uma variedade de metabólitos e são colonizadoras da rizosfera (Saeed et al., 2021). Os mecanismos de ação das bactérias contra os nematoides são múltiplos, eles podem ser diretos ou indiretos (Ludwig et al., 2013). Entre os mecanismos estão a síntese de enzimas hidrolíticas, metabólitos tóxicos, antibióticos, alterações na quimiotaxia, resistência induzida, entre outros (Ludwig et al., 2013).

2.4 Mecanismos de ação das bactérias como agentes de controle biológico

2.4.1 Mecanismos Diretos

Os mecanismos diretos contra os nematoides podem impedir a eclosão dos juvenis, crescimento e reprodução (Subedi et al., 2020). O efeito antagonico envolve a produção de compostos metabólitos, como os antibióticos (Mhatre et al., 2018). Esse processo é denominado de antibiose, definido como a síntese de compostos bioativos que apresentam efeitos tóxicos ou inibitórios sobre os nematoides (Stenberg et al., 2021). Os compostos antibióticos podem ser difusíveis, como fenazinas, floroglucinóis, pioluteorina, pirrolnitrina, lipopeptídeos cíclicos e o volátil cianeto de hidrogênio (HCN) (Saeed et al., 2021). Sendo que o potencial da bactéria como BCA está associado ao desenvolvimento de um ou mais antibióticos (Saeed et al., 2021).

As enzimas extracelulares são os metabólitos bacterianos mais estudados com ação inibitória contra os nematoides (Turatto et al., 2017). Por exemplo, as enzimas proteases e quitinases causam a hidrólise da camada de quitina do ovo de *M. javanica*, tendo assim um impacto no desenvolvimento do nematoide (Turatto et al., 2017). Já as moléculas tóxicas sintetizadas por *Bacillus thuringiensis* mostram atividades nematicidas ao produzir inclusões cristalinas, uma família de proteínas tóxicas para nematoides (Gao et al., 2016). Os COVs também apresentam atividades nematicidas, sendo que alguns deles apresentam atividades fumigantes (Cheng et al., 2017). O efeito fumigante desses compostos é de grande importância, pois alcança os nematoides que estão mais distantes no solo (Cheng et al., 2017). Esses COVs podem penetrar na cutícula do nematoide e causar sua morte por meio de mecanismos que afetam seu sistema nervoso, faringe, intestino ou outros tecidos (Cheng et al., 2017).

2.4.2 Mecanismos indiretos

As plantas possuem uma série de estratégias inatas para se defenderem do ataque de pragas e patógenos de maneira direcionada (Poveda et al., 2020). Após o ataque de um patógeno biotrófico a resistência adquirida (SAR) é ativada na planta (Poveda et al., 2020). Da mesma forma, as bactérias benéficas são capazes de suprimir a doença nas plantas por meio da resistência sistêmica induzida (ISR) (Van Loon et al., 1998). Para que ocorra a ISR, a planta precisa de uma estimulação adequada (Van Loon et al., 1998).

As bactérias que pertencem aos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* são as mais conhecidas por sua capacidade de gerar ISR (Saeed et al., 2021). A ISR mediada por bactérias e a SAR são reguladas por diferentes vias de sinalização (Pieterse et al., 2014). Os patógenos induzem a resistência por meio da via SAR dependente do ácido salicílico (SA) (Van Loon et al., 1998), e as bactérias induzem a ISR por meio da percepção de ácido jasmônico (JA) e do etileno (ET).

Na planta hospedeira, a mesma bactéria causa resistência a vários patógenos (Saeed et al., 2021). No entanto, em certos hospedeiros ocorre uma falha em induzir ISR (Van Loon et al., 1998). Isso indica que a indução de resistência requer uma sinalização específica entre a planta e a bactéria (Saeed et al., 2021).

Os mecanismos utilizados para ISR incluem modificações estruturais na parede celular e alterações da reação fisiológica e bioquímica do hospedeiro (Ramamoorthy et al., 2001). As bactérias produzem elicitores responsáveis por induzir a ISR (Pieterse et al., 2014). Diversos elicitores foram identificados por suas propriedades ativadoras de defesa (Pieterse et al., 2014), incluindo enzimas como polifenol oxidase (PPO), peroxidase (PO), fenilalanina amônia-liase (PAL) e quitinase (Mhatre et al., 2018). Essas enzimas iniciam a ISR pela produção de fitoalexinas e compostos fenólicos (Mhatre et al., 2018). Os lipopolissacarídeos (LPS) presentes na membrana externa das bactérias são os principais determinantes da ISR (Ramamoorthy et al., 2001). A interferência na quimiotaxia por meio de alterações nos exsudatos radiculares também pode ser considerado um mecanismo indireto de controle (Gao et al., 2016). Essas alterações podem inibir a eclosão dos J2 ou reduzir sua atratividade para as raízes de plantas hospedeiras (Gao et al., 2016).

PARTE 2: TRABALHO EXPERIMENTAL

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Isolados bacterianos utilizados neste estudo

Os isolados utilizados nos ensaios pertencem à coleção do laboratório de Fitopatologia Molecular do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil. As bactérias foram isoladas da rizosfera de plantas de videira (*vitis vinifera*) em viveiro a campo na cidade de Caldas, Minas Gerais. Os isolados foram preservados em microtubos de 2 mL contendo meio líquido formado por peptona bacteriológica e 15% de glicerol, e mantidos em freezer à -20 °C.

3.2 Inóculo de *M. javanica*

Os ovos foram obtidos de populações de *Meloidogyne javanica* multiplicadas em plantas de tomateiro (*Solanum lycopersicum*), cultivar Santa Clara mantidas em casa de vegetação do laboratório de Nematologia. Para obter a suspensão de ovos utilizou-se a técnica de Hussey e Barker (1973). As raízes foram cuidadosamente lavadas em água parada, picadas em pedaços de aproximadamente 2 cm e trituradas em liquidificador com solução de hipoclorito de sódio 0,5% por, aproximadamente, 30 s. A suspensão foi vertida em uma peneira de 0,074 mm sobre à outra de 0,025 mm de abertura, os ovos ficaram retidos na última peneira. A suspensão de ovos foi colocada em tubos de centrifuga com aproximadamente 3g de caulim, para a limpeza dos ovos pela técnica de Coolen e D' Herde (1972). A centrifugação foi feita duas vezes, sendo a primeira em água, por 5 min a 2000 rpm e a segunda em solução de sacarose, por 1 min a 1700 rpm.

Após a centrifugação, os ovos foram colocados em câmara de eclosão, utilizando-se a técnica de funil de Baermann (1917). Os J2 eclodidos utilizados para os ensaios foram coletados entre 48 h – 72 h após a montagem da câmara de eclosão. Para calibrar a suspensão, os J2 foram transferidos para câmara de Peters e quantificados em microscópio de objetiva invertida.

3.3 Inóculo bacteriano

Os isolados bacterianos preservados em meio peptona - glicerol foram cultivados em meio de cultura Tryptic Soy Agar (TSA) em placas de Petri utilizando o método do estriamento para obter as colônias puras. As placas foram vedadas e incubadas em câmara de crescimento (BOD) a 28 °C por 48 h. Após este período, uma colônia de cada isolado bacteriano foi transferida para frascos de vidro contendo 100 mL de meio nutriente líquido formado por peptona e extrato de carne. Os frascos ficaram em um agitador orbital a 170 rpm por 48 h.

Após este período, foram transferidos 30 mL da suspensão bacteriana para tubos e estes foram levados para a centrifugação por 20 min a 4000 rpm. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e cada tubo contendo as bactérias recebeu 30 mL de água destilada. Os tubos foram agitados em um vortex até formar uma suspensão homogênea. Todas as suspensões bacterianas utilizadas nos ensaios foram ajustadas em espectrofotômetro para $OD_{600}=0.7$.

3.4 Instalação dos experimentos

Para a realização dos experimentos, foram transplantadas mudas de tomate, cultivar Santa Clara, para bandejas de isopor limpas contendo substrato comercial. Em plantas de tomate de 15 dias, foram realizados dois orifícios no substrato ao redor do caule, cada um com aproximadamente 4 mm de diâmetro e 3 cm de profundidade, para inocular a suspensão bacteriana calibrada e os J2. Foi inoculado 1 mL de suspensão bacteriana em cada um dos orifícios. Após 24 h, uma suspensão de 1 mL contendo 200 J2 de *M. javanica* foi inoculada. A testemunha recebeu apenas água. Os experimentos foram mantidos em casa de vegetação por 40 dias após as inoculações. Após este período, as raízes foram lavadas e pesadas. Contou-se o número de galhas em cada sistema radicular para determinar o número de galhas por grama de raiz. Para determinar o número de ovos por grama de raiz, a suspensão de ovos foi obtida utilizando o método descrito no item 3.2. Os ovos foram transferidos para câmara de Peters e quantificados em microscópio de objetiva invertida.

3.5 Ensaio de quimiotaxia

O ensaio de quimiotaxia foi realizado de acordo com o método descrito por Wang et al. (2019). Placas de Petri com 9 cm de diâmetro contendo 10 mL de meio ágar-água 2%, foram divididas em área teste (A), neutra (B) e controle (C) (Figura 1). Nas áreas A e C foram abertos orifícios de 1,4 cm de diâmetro no meio ágar-água com um tubo de metal. Na área A foi adicionado aproximadamente 1 mL de meio TSA para o crescimento bacteriano. Na área C o meio TSA recebeu apenas água destilada esterilizada. A distância das áreas A e C até as bordas da área neutra (B) foi de aproximadamente 2,5 cm. Na área A foi transferida uma colônia do isolado bacteriano e um volume de 20 µL contendo 200 J2 de *M. javanica* foi transferido na área B. A testemunha recebeu apenas água. Após 16 h, o número de J2 da área A e C foi quantificado em microscópio óptico invertido.

O índice de quimiotaxia (IC) foi calculado seguindo a metodologia de (Bargmann et al., 1993). Se $IC \geq 0,2$, os COVs serão altamente atrativos e, se $0,1 \leq IC < 0,2$ serão levemente atraentes. Se $-0,1 \leq IC < 0,1$, serão considerados como resposta aleatória. Se $-0,2 < IC < -0,1$, serão considerados repelentes e $IC \leq -0,2$ como altamente repelente (Wang et al., 2019).

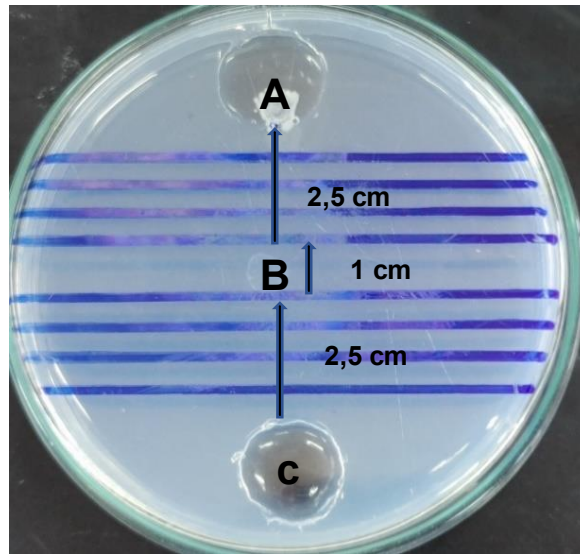


Figura 1. Esquema do ensaio de quimiotaxia para juvenis de segundo estágio (J2) de *M. javanica* em uma placa de Petri. Três áreas distintas foram definidas: (A) área teste; (B) área neutra e (C) área de controle. Foram transferidos no centro da área B 200 J2. Uma colônia de bactéria foi transferida para área A e na área C contém apenas água. Após 16 h, o número de J2 em cada área foi quantificado para o IC. Os J2 que permaneceram na área B não foram contabilizados.

3.6 Delineamento experimental e análises estatísticas

Todos os ensaios foram realizados em delineamento inteiramente casualizados, com 6 repetições para cada tratamento. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade (Shapiro-Wilk) e de homogeneidade (Barlett). Os dados que não atenderam aos pressupostos de normalidade e homogeneidade foram transformados. Os números de galhas por grama e ovos por grama foram transformados para $\sqrt{(x)}$. Os dados transformados foram submetidos ao teste de Scott-Knott ($P < 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas no software R. Para o ensaio de quimiotaxia foi realizado o cálculo de índice de quimiotaxia. $IC = (\text{número de J2 na área A} - \text{o número de J2 na área C}) / (\text{número de J2 na área A} + \text{número de J2 na área C})$.

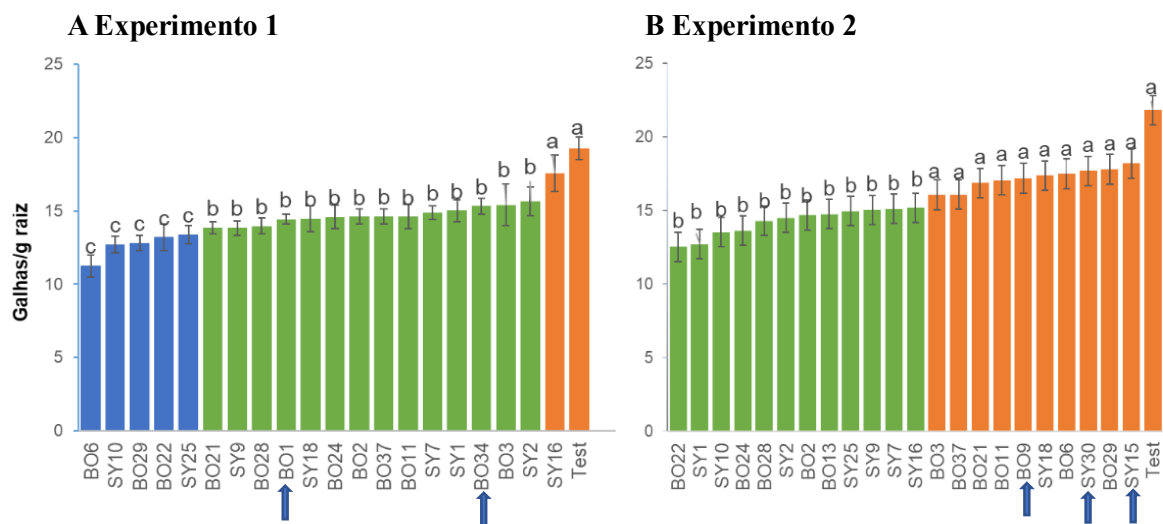
4 RESULTADOS

4.1 Efeito dos isolados bacterianos sobre a reprodução de *M. javanica*

Foram realizados dois experimentos para estudar o efeito de 20 isolados bacterianos sobre a reprodução de *M. javanica* em condições de casa de vegetação. No primeiro

experimento os isolados reduziram ($P < 0,05$) o número de galhas por grama de raiz, variando de 41,5% a 18,8% em relação a testemunha (Figura 2A). No segundo experimento, os isolados reduziram o número de galhas por grama, variando de 42,5% a 30,4% (Figura 2B). O número de ovos por grama foi reduzido pelos isolados, variando de 44,8% a 16,7%, no primeiro experimento (Figura 3C) de 61,4% a 28,7% no segundo experimento (Figura 3D).

Um total de 10 isolados apresentou redução no número de galhas por grama nos dois experimentos, enquanto todos os isolados reduziram o número de ovos em relação a testemunha nos dois experimentos. Observou-se que nos dois experimentos, os isolados SY10, BO22 e SY25 foram os que mais reduziram o número de galhas/g e ovos/g de raízes, com médias de 34,7% e 44,8%, respectivamente.



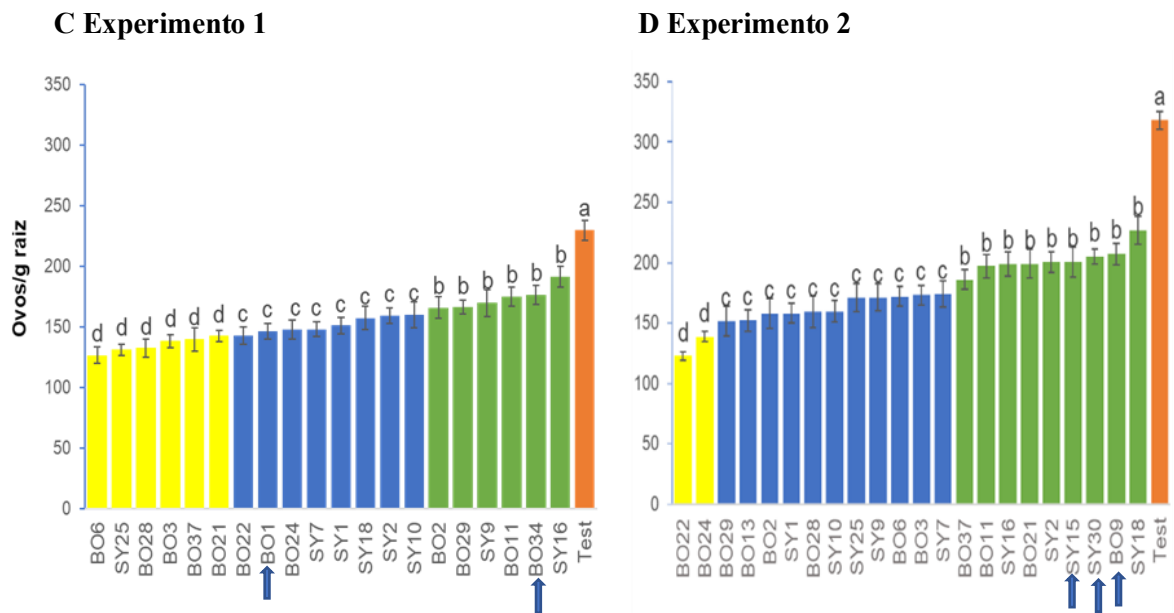


Figura 2. Efeito de isolados bacterianos sobre a reprodução de *M. javanica*. (A e B) número de galhas por grama de raiz. (C e D) número de ovos por grama de raiz. As mudas de tomate foram inoculadas com suspensões de cada isolado bacteriano e a testemunha (Test) foi tratada com água. Após 24 h todos os tratamentos foram inoculados com J2 de *M. javanica*. As plantas foram mantidas em casa de vegetação e avaliadas 40 dias após a inoculação. As setas indicam os isolados que não foram repetidos nos experimentos. Médias com a mesma letra não diferem significativamente ($P < 0,05$) pelo teste de Scott-Knott. Os valores são médias de seis repetições. As barras representam o erro padrão das médias.

4.2 Efeito dos isolados bacterianos sobre a quimiotaxia dos J2 de *M. javanica*

O experimento de quimiotaxia foi realizado para estudar a atratividade dos J2 de *M. javanica* em resposta a 20 isolados bacterianos. Os resultados indicaram que 14 isolados repeliram os J2 de *M. javanica*. Por outro lado, 6 isolados foram levemente atrativos para os J2. A testemunha (água) apresentou uma resposta aleatória (Figura 3A). Os 14 isolados repelentes aos J2 reduziram em média o número de galhas/g em 26,2% e o número de ovo/g em 38,7% nos dois experimentos, enquanto que os 6 isolados atrativos reduziram em média 31,1% e 43,4% o número de galhas por grama e ovos por grama, respectivamente. Os isolados SY10, BO22 e SY25 foram os que apresentaram as maiores reduções no número de galhas e ovos nos experimentos de seleção descritos acima, e também mostraram respostas de atração aos J2 de *M. javanica*.

Para o cálculo do índice de quimiotaxia o número de J2 que permaneceu na área neutra não é considerado. No entanto, quando esse número foi computado notou-se que entre 84 a 120 J2, de um total de 200 adicionados, permaneceram na área neutra em tratamentos contendo

isolados bacterianos, enquanto que na testemunha esse número foi de 55 J2 (Figura 3B). Portanto, uma média de 47.3% dos J2 permaneceu na área neutra em tratamentos contendo isolados bacterianos que atraíram os nematoides e 49.3% deles permaneceram na área neutra em tratamentos com isolados bacterianos repelentes, enquanto que a testemunha reteve 27.8% dos J2 utilizados.

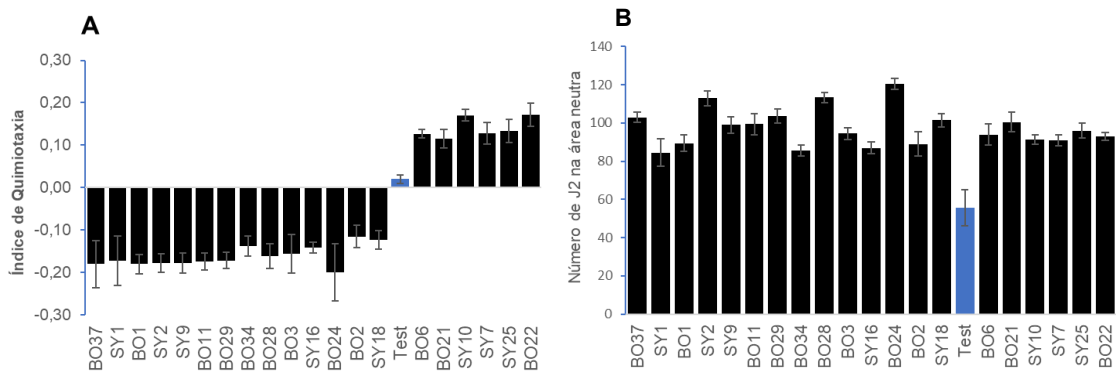


Figura 3. Efeito dos isolados bacterianos sobre a quimiotaxia de *M. javanica*. (A) Índice de quimiotaxia (IC) de J2 de *M. javanica* após exposição dos J2 aos isolados bacterianos em ensaios de quimiotaxia em placas de Petri. Para o cálculo do índice de quimiotaxia foi determinado o número de J2 na área teste e na área controle. (B) Médias dos números de J2 encontrados na área neutra da placa de Petri durante os ensaios de quimiotaxia. Os valores são médias de seis repetições. As barras de representam o erro padrão das médias.

5 DISCUSSÃO

Para iniciar o processo de infecção, os J2 (estádio infectante) eclodem dos ovos e buscam a raiz da planta hospedeira (Oota et al., 2019; Tsai et al., 2019). A busca pela raiz hospedeira ocorre por meio da quimiotaxia (Rasmann et al., 2012). Vários trabalhos já foram realizados para estudar a quimiotaxia dos J2 em relação a microrganismos (Cheng et al., 2017; Li et al., 2019; Pacheco et al., 2022; Zhai et al., 2018).

Neste estudo, realizamos um screening de bactérias para investigar quais isolados apresentam potencial para reduzir a reprodução de *M. javanica* e quais deles possuem efeito sobre a atratividade do J2. Os índices de quimiotaxia encontrados mostram respostas atrativas ou repelentes dos J2 aos isolados bacterianos. Outros estudos de quimiotaxia relataram ICs maiores que os do presente estudo (Cheng et al., 2017; Oota et al., 2020; Zhai et al., 2018). No entanto, comparações entre ICs de diferentes estudos não podem ser feitas, pois os estudos apresentaram diferenças no tempo de exposição dos J2, metodologia e na espécie de nematoide. Por exemplo, foi relatado que a espécie *M. incognita* apresenta maior motilidade que *M.*

javanica (Kihika et al., 2017). Outros estudos de quimiotaxia deverão ser realizados com outras espécies de *Meloidogyne*.

Os isolados que atraíram os J2 apresentaram maiores reduções na reprodução de *M. javanica* que os isolados que os repeliram. Possivelmente, as reduções na reprodução de *M. javanica* ocorreram por dois mecanismos distintos: 1) repelência aos isolados bacterianos e 2) atração dos J2 e posterior uso como fonte de alimento, no caso dos isolados atrativos aos J2. Outros autores relataram que bactérias podem atrair J2 por meio de substâncias voláteis (COVs) e causar sua morte por contato ou fumigação em uma estratégia conhecida como “honey trap” (Cheng et al., 2017).

Os resultados mostraram que tanto os isolados bacterianos repelentes quanto os atrativos produziram COVs tóxicos aos nematoides, que não foram produzidos na testemunha (Figura 3B). Em experimentos futuros, a ação destes COVs poderá ser verificada em experimentos realizados em placas de Petri abertas para a difusão dos mesmos. Além dos COVs, experimentos para investigar substâncias difusíveis no meio de cultura serão realizados por meio do crescimento dos isolados bacterianos por um maior tempo no meio de cultura e posterior transferência dos J2. Sabe-se que as respostas quimiotáticas são influenciadas pela espécie do nematoide (Kihika et al., 2017). Desta forma, nossos estudos futuros empregarão também a espécie *M. incognita* para verificar a especificidade das respostas aos isolados bacterianos em estudo. A capacidade dos isolados bacterianos de colonizar o sistema radicular também deverá ser avaliada. Outro ponto a ser tratado nos estudos futuros é a identificação dos isolados bacterianos ao nível gênero por meio do sequenciamento de um fragmento do gene 16S do RNA ribossomal.

6 CONCLUSÃO

Neste estudo, verificou-se que os isolados bacterianos reduziram a reprodução de *M. javanica*. Os isolados SY10, BO22 e SY25 foram os que mais reduziram o número de galhas por grama e ovos por grama de raiz. Os estudos de quimiotaxia mostraram que 14 isolados repeliram e 6 atraíram os J2. Os isolados mais promissores foram os que atraíram os J2, pois reduziram em média o número galhas por grama e ovos por grama em 31,1% e 43,4%, respectivamente.

REFERÊNCIAS

- AIOUB, Ahmed AA; ELESAWY, Ahmed E.; AMMAR, Esraa E. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) and their role in plant-parasitic nematodes control: a fresh look at an old issue. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 129, n. 6, p. 1305-1321, 2022.
- BAERMANN, Gustav. Eine einfache methode zur auffindung von Ancylostomum (Nematoden) larven in erdproben. **Geneeskd Tijdschr Ned Indie**, v. 57, p. 131-137, 1917.
- BARGMANN, Cornelia I.; HARTWIEG, Erika; HORVITZ, H. Robert. Odorant-selective genes and neurons mediate olfaction in *C. elegans*. **Cell**, v. 74, n. 3, p. 515-527, 1993.
- BARTLEM, Derek G.; JONES, Michael GK; HAMMES, Ulrich Z. Vascularization and nutrient delivery at root-knot nematode feeding sites in host roots. **Journal of experimental botany**, v. 65, n. 7, p. 1789-1798, 2014.
- CAMPOS, H. D et al. Atração e penetração de *Meloidogyne javanica* e *Heterodera glycines* em raízes excisadas de soja. **Ciência Rural**, v. 41, n. 9, p. 1496–1502, 2011.
- CAO, Hongyi et al. Analysis of the activity and biological control efficacy of the *Bacillus subtilis* strain Bs-1 against *Meloidogyne incognita*. **Crop Protection**, v. 122, p. 125-135, 2019.
- CHEN, Wei; HU, Qiongbo. Secondary metabolites of *Purpureocillium lilacinum*. **Molecules**, v. 27, n. 1, p. 18, 2021.
- CHENG, Wanli et al. Volatile organic compounds from *Paenibacillus polymyxa* KM2501-1 control *Meloidogyne incognita* by multiple strategies. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 213, 2017.
- COOLEN, W. A. et al. A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue. **A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue**, p. 77, 1972.
- DIYAPOGLU, Ali; ONER, Muhammet; MENG, Menghsiao. Application Potential of Bacterial Volatile Organic Compounds in the Control of Root-Knot Nematodes. **Molecules**, v. 27, n. 14, p. 355, 2022.
- DUTTA, Tushar K. et al. Effect of small lipophilic molecules in tomato and rice root exudates on the behaviour of *Meloidogyne incognita* and *M. graminicola*. **Nematology**, v. 14, n. 3, p. 309-320, 2012.
- ELLING, Axel A. Major emerging problems with minor *Meloidogyne* species. **Phytopathology**, v. 103, n. 11, p. 92-102, 2013.
- FERRAZ, L. C. C. B.; BROWN, D. J. F. Nematologia de plantas: fundamentos e importância Norma Editora, v. 1 p. 251, 2016.
- FLORES FRANCISCO, Bianca Guadalupe et al. Advances in the biological control of phytoparasitic nematodes via the use of nematophagous fungi. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 10, p. 180, 2021.

- GALBIERI, Rafael; BELOT, Jean Louis (Ed.). **Nematoides fitoparasitas do algodoeiro nos cerrados brasileiros: biologia e medidas de controle**. Instituto Mato-grossense do Algodão, p. 11, 2016
- GAO, H. et al. *Bacillus cereus* strain S2 shows high nematocidal activity against *Meloidogyne incognita* by producing sphingosine v. 6, n. 1, p. 1-11, 2016.
- GHAHREMANI, Zahra. Biological control approaches of *Meloidogyne* spp. in vegetable crops: from application of selected antagonists to suppressive soils. p. 180, 2020.
- GOTO, Derek B. et al. Not to be suppressed? Rethinking the host response at a root-parasite interface. **Plant Science**, v. 213, p. 9-17, 2013.
- HU, Hai-Jing et al. Endophytic *Bacillus cereus* effectively controls *Meloidogyne incognita* on tomato plants through rapid rhizosphere occupation and repellent action. **Plant Disease**, v. 101, n. 3, p. 448-455, 2017.
- HUSSEY, R. S.; BARKER, K. R. Comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. **Plant disease reporter**, v. 57, n.12 p. 25-28, 1973.
- JAGDALE, Shounak; RAO, Uma; GIRI, Ashok P. Effectors of root-knot nematodes: an arsenal for successful parasitism. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, p. 30, 2021.
- JONES, J. T. HAEGEMAN, A., DANCHIN, E.G.J., GAUR, H.S., HELDER, J., JONES, M.G.K., KIKUCHI, T., MANZANILLA-LÓPEZ, R., PALOMARES-RIUS, J.E., WESEMAEL, W.M.L. et al. Top 10 plant parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, New Jersey, v. 14, n. 9, p. 946-961, 2013.
- KIHIKA, Ruth et al. Parasitic nematode *Meloidogyne incognita* interactions with different *Capsicum annum* cultivars reveal the chemical constituents modulating root herbivory. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 203, 2017.
- LI, Xia et al. Effects of the endophytic bacteria *Bacillus cereus* BCM2 on tomato root exudates and *Meloidogyne incognita* infection. **Plant disease**, v. 103, n. 7, p. 551-558, 2019.
- LUDWIG, Juliane; MOURA, Andréa B.; GOMES, Cesar B. Potential of microbiolization of rice seeds with rhizobacteria for root-knot nematode biocontrol. **Tropical Plant Pathology**, v. 38, p. 264-268, 2013.
- MANOSALVA, Patricia et al. Conserved nematode signalling molecules elicit plant defenses and pathogen resistance. **Nature communications**, v. 6, n. 1, p. 95, 2015.
- MEJIAS, Joffrey et al. Plant proteins and processes targeted by parasitic nematode effectors. **Frontiers in plant science**, v. 10, p. 970, 2019.
- MHATRE, Priyank Hanuman et al. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A potential alternative tool for nematodes bio-control. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, v. 17, p. 119-128, 2019
- MIGUNOVA, Varvara D.; SASANELLI, Nicola. Bacteria as biocontrol tool against phytoparasitic nematodes. **Plants**, v. 10, n. 2, p. 389, 2021.

OKA, Y. Mechanisms of nematode suppression by organic soil amendments a review. **Applied Soil Ecology**, v. 44, n. 2, p. 101-115, 2010.

OOTA, Morihito et al. Identification of naturally occurring polyamines as root-knot nematode attractants. **Molecular plant**, v. 13, n. 4, p. 658-665, 2020.

PACHECO, Paulo Victor Magalhães et al. Attraction and toxicity: Ways volatile organic compounds released by *Pochonia chlamydosporia* affect *Meloidogyne incognita*. **Microbiological Research**, v. 255, p. 126925, 2022.

PIETERSE, Corné MJ et al. Induced systemic resistance by beneficial microbes. **Annual review of phytopathology**, v. 52, p. 347-375, 2014.

POVEDA, Jorge; ABRIL-URIAS, Patricia; ESCOBAR, Carolina. Biological control of plant-parasitic nematodes by filamentous fungi inducers of resistance: *Trichoderma*, mycorrhizal and endophytic fungi. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 92, 2020.

RAMAMOORTHY, V. et al. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. **Crop protection**, v. 20, n. 1, p. 1-11, 2001.

RASMANN, Sergio et al. Ecology and evolution of soil nematode chemotaxis. **Journal of chemical ecology**, v. 38, p. 615-628, 2012

REYNOLDS, Andy M. et al. Chemotaxis can take plant-parasitic nematodes to the source of a chemo-attractant via the shortest possible routes. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 8, n. 57, p. 568-577, 2011.

SAEED, Qudsia et al. Rhizosphere bacteria in plant growth promotion, biocontrol, and bioremediation of contaminated sites: A comprehensive review of effects and mechanisms. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 19, p. 529, 2021.

SASANELLI, Nicola et al. Review on control methods against plant parasitic nematodes applied in southern member states (C Zone) of the European Union. **Agriculture**, v. 11, n. 7, p. 602, 2021.

SAUCET, Simon Bernard et al. Resistance to root-knot nematodes *Meloidogyne* spp. in woody plants. **New Phytologist**, v. 211, n. 1, p. 41-56, 2016.

SIDDIQUE, Shahid; GRUNDLER, Florian MW. Parasitic nematodes manipulate plant development to establish feeding sites. **Current opinion in microbiology**, v. 46, p. 102-108, 2018.

SIKDER, Md Maniruzzaman; VESTERGÅRD, Mette. Impacts of root metabolites on soil nematodes. **Frontiers in plant science**, v. 10, p. 92, 2020.

SILVA, Júlio Carlos Pereira da; MEDEIROS, Flávio Henrique Vasconcelos de; CAMPOS, Vicente Paulo. Building soil suppressiveness against plant-parasitic nematodes. **Biocontrol Science and Technology**, v. 28, n. 5, p. 423-445, 2018.

STENBERG, Johan A. et al. When is it biological control? A framework of definitions, mechanisms, and classifications. **Journal of Pest Science**, v. 94, n. 3, p. 665-676, 2021.

- SUBEDI, Pratima et al. Current utility of plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents towards plant-parasitic nematodes. **Plants**, v. 9, n. 9, p. 167, 2020.
- TAPIA-VÁZQUEZ, Irán et al. Root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) a threat to agriculture in Mexico: Biology, current control strategies, and perspectives. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 2, p. 26, 2022.
- TARIQ, Moh et al. Biological control: a sustainable and practical approach for plant disease management. **Acta Agriculturae Scandinavica, Section B—Soil & Plant Science**, v. 70, n. 6, p. 507-524, 2020.
- TSAI, Allen Yi-Lun; OOTA, Morihiro; SAWA, Shinichiro. Chemotactic host-finding strategies of plant endoparasites and endophytes. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 167, 2020.
- TURATTO, Marcielly F. et al. Control potential of *Meloidogyne javanica* and *Ditylenchus* spp. using fluorescent *Pseudomonas* and *Bacillus* spp. **brazilian journal of microbiology**, v. 49, p. 54-59, 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.
- VOS, Christine et al. Mycorrhiza-induced resistance against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* involves priming of defense gene responses in tomato. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 60, p. 45-54, 2013.
- WANG, Jinxing et al. Chemotaxis response of *Meloidogyne incognita* to volatiles and organic acids from root exudates. **Rhizosphere**, v. 17, p. 320, 2021.
- WANG, Pinyi et al. Chemotactic responses of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* to *Streptomyces plicatus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 366, n. 19, p. 234, 2019.
- XIANG, Ni; LAWRENCE, Kathy S.; DONALD, Patricia A. Biological control potential of plant growth-promoting rhizobacteria suppression of *Meloidogyne incognita* on cotton and *Heterodera glycines* on soybean: A review. **Journal of Phytopathology**, v. 166, n. 8, p. 449-458, 2018.
- YANG, Guodong et al. Effects of tomato root exudates on *Meloidogyne incognita* **PLoS One**, v. 11, n. 4, p. 467, 2016.
- ZHAI, Yile et al. Multiple modes of nematode control by volatiles of *Pseudomonas putida* 1A00316 from Antarctic soil against *Meloidogyne incognita* **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 253, 2018.
- ZHAO, Dan et al. Isolation and identification of bacteria from rhizosphere soil and their effect on plant growth promotion and root-knot nematode disease. **Biological control**, v. 119, p. 12-19, 2018.