

**INTERAÇÃO DE *Trichoderma asperellum* E *Bacillus* spp. UTILIZADOS NO
CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS NA SOJA**

por

ADELIANE FERREIRA BRAGA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioenergia e Grãos do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano - Campus Rio Verde, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Bioenergia e Grãos.

Rio Verde – Goiás

Maio – 2021

**INTERAÇÃO DE *Tichoderma Asperellum* E *Bacillus* spp. UTILIZADOS NO
CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS NA SOJA**

por

ADELIANE FERREIRA BRAGA

Comitê de Orientação:

Orientador: Prof. Dr. Leonardo de Castro Santos

Coorientador: Prof. Dr. Alaerson Maia Geraldine

Coorientador: Prof. Dr. Eugenio Miranda Sperandio

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

BB813i Braga, Adeliane Ferreira
INTERAÇÃO DE *Trichoderma asperellum* E *Bacillus*
spp. UTILIZADOS NO CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS DA
SOJA / Adeliane Ferreira Braga; orientador Leonardo
de Castro Santos; co-orientador Alaerson Maia
Geraldine. -- Rio Verde, 2021.
35 p.

Dissertação (Mestrado em Bioenergia e Grãos) --
Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde, 2021.

1. *Trichoderma*. 2. *Bacillus subtilis*. 3.
Compatibilidade. 4. Controle Biológico. I. Santos,
Leonardo de Castro, orient. II. Geraldine, Alaerson
Maia, co-orient. III. Título.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO

Documentos 63/2021 - NREPG-RV/CPG-RV/DPGPI-RV/CMPRV/IFGOIANO

INTERAÇÃO DE *Trichoderma aperellum* E *Bacillus* spp. UTILIZADOS NO CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS NA SOJA

Autora: Adeliane Ferreira Braga
Orientador: Leonardo de Castro Santos

TITULAÇÃO: Mestre em Bioenergia e Grãos - Área de Concentração Agroenergia

APROVADA em 31 de maio de 2021.

Prof.^a Dr.^a Gleina Costa Silva Alves
Avaliadora externa - IF Goiano -
Campus Urutaí

Prof.^a Dr.^a Priscila Ferreira Batista
Avaliadora externa - IF Goiano -
Campus Rio Verde

Prof. Dr. Alaerson Maia Geraldine
Avaliador interno - IF Goiano / Polo
de Inovação

Prof. Dr. Leonardo de Castro Santos
Presidente da Banca - IF Goiano /
Polo de Inovação

Documento assinado eletronicamente por:

- Priscila Ferreira Batista, 2020102341360020 - Discente, em 02/06/2021 13:23:31.
- Alaerson Maia Geraldine, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO, em 02/06/2021 11:29:27.
- Gleina Costa Silva Alves, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO, em 01/06/2021 10:04:32.
- Leonardo de Castro Santos, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO, em 31/05/2021 15:00:10.

Este documento foi emitido pelo SUAP em 26/05/2021. Para comprovar sua autenticidade, faça a leitura do QRCode ao lado ou acesse <https://suap.ifgoiano.edu.br/autenticar-documento/> e forneça os dados abaixo:

Código Verificador: 272709
Código de Autenticação: 504e5e27fc



AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de alguma forma somaram forças comigo para que mais esta etapa de minha vida pudesse ser cumprida com êxito. A Deus, por me conceder o dom da vida e me abençoar em cada jornada enfrentada durante a graduação. À minha mãe Eliane e ao meu padrasto, pelo total apoio e incentivo durante toda minha trajetória nos estudos, também agradeço ao meu pai que não pôde estar aqui para ver mais uma conquista, mas de onde ele estiver ele está vendo. Ao meu irmão Divino Augusto, por fazer meus dias mais felizes.

Ao meu orientador, Leonardo de Castro Santos, pela ajuda e incentivo para finalizar mais uma etapa. A equipe do Laboratório de Fitopatologia, pela ajuda, pelos momentos de risadas, em especial a Suellen Polyana, Francisco Vicente e Francielly Abrenhosa. A todos os amigos, em especial, Natalia Marques, Weder Nunes, Geovana Ramos, Patrícia Gomes, Anna Izabella e Rosilda Moraes, pelos momentos vividos juntos, companheirismo, risadas, conselhos, enfim, pelo apoio.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano por proporcionar um curso de alta qualidade com professores muito capacitados e ao Grupo Associado de Pesquisa do Sudoeste Goiano (Gapes), pelo auxílio na obtenção dos produtos usados neste trabalho.

Muito obrigada a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste sonho!

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	2
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. Cultura da soja no Brasil.....	5
2.2. Fitonematoides de importância na cultura da soja.....	6
2.3. Agentes de controle biológico	8
2.3.1. Bactérias no controle biológico	9
2.3.2. Fungos no controle biológico	10
3. MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1. Obtenção e multiplicação dos agentes de controle biológico	13
3.2. Avaliação em laboratório (<i>in vitro</i>)	13
3.3. Avaliação em casa de vegetação.....	14
3.4. Análises Estatísticas.....	15
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	16
5. CONCLUSÃO	25
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26

INTERAÇÃO DE *Trichoderma asperellum* E *Bacillus* spp. UTILIZADOS NO CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS NA SOJA

por

ADELIANE FERREIRA BRAGA

RESUMO: Um dos principais problemas fitossanitários das grandes culturas são os fitonematoides, que, por sua vez, caracterizam-se pela dificuldade de manejo. Diante disso, o biocontrole tornou-se uma ferramenta propulsora no controle desses patógenos pelo uso de agentes biológicos. Sendo assim, objetiva-se com o presente estudo avaliar a compatibilidade entre microrganismos, detectando a possibilidade de efeitos antagônicos, a influência no crescimento e a atuação sinérgica quando aplicados de forma conjunta na cultura. Para isso, foram feitas análises microbiológicas com o intuito de observar a interação do fungo *Trichoderma asperellum* com as bactérias *Bacillus subtilis* e *Bacillus methylotrophicus*. Observou-se que a interação entre os gêneros *Bacillus* e *Trichoderma* não promoveu ganhos na massa seca e massa fresca das raízes e na parte aérea das plantas de soja, porém se mostrou promissora em razão dos resultados observados na análise microbiológica de fungos e bactérias, especialmente na avaliação feita no sétimo dia. Considerando a quantidade de esporos viáveis, a interação entre *B. subtilis* e *T. asperellum* apresentou melhores resultados do que entre *B. methylotrophicus* e *T. asperellum*. A interação entre os gêneros *Bacillus* e *Trichoderma* mostrou potencial para utilização conjunta no controle biológico de nematoides na cultura da soja.

Palavras-chave: *Trichoderma*, *Bacillus subtilis*, Compatibilidade, Controle biológico.

***Trichoderma asperellum* AND *Bacillus* spp. INTERACTION TO BIOLOGICAL
CONTROL OF DISEASES IN SOYBEAN**

by

ADELIANE FERREIRA BRAGA

Adviser Prof. Dr. Leonardo de Castro Santos

ABSTRACT: One of the main phytosanitary problems in large cultures are plant-parasitic nematodes, which in turn are characterized by difficulty in handling and management. Therefore, biological control has become a propelling tool to control these pathogens by using biological agents. Thus, the aim of this study is to evaluate the compatibility of microorganisms, detecting the possibility of antagonistic effects, the influence on growth and synergistic performance when applied together in the culture. For this, microbiological analyzes were carried out to observe the interaction of fungus *Trichoderma asperellum* with bacteria *Bacillus subtilis* and *B. methylotrophicus*. It was observed that the interaction between the genera *Bacillus* and *Trichoderma* did not promote increase in the dry mass and green fresh mass of roots and in the aerial part of soybean plants, however, it was promising due to the results observed in the microbiological analysis of fungi and bacteria, especially in the evaluation carried out on the seventh day. Considering the amount of viable spores, the interaction between *B. subtilis* + *T. asperellum* showed better results than *B. methylotrophicus* + *T. asperellum*. The interaction between *Bacillus* and *Trichoderma* showed potential for use together in the biological control in soybean agriculture.

KEY WORDS: *Trichoderma*, *Bacillus subtilis*, Compatibility, Biological Control.

1.

1. INTRODUÇÃO

A soja é uma importante cultura, com relevância em âmbito mundial, e o Brasil figura como maior produtor do grão, responsável por 125 milhões das 337 milhões de toneladas produzidas na safra 2019/2020 (EMBRAPA SOJA, 2021). Há tendência de crescimento expressivo na demanda do grão para os próximos anos e, nesse contexto, enfatiza-se a importância de produzir mais e com maior eficiência, superando os entraves das doenças parasitárias de plantas, que podem ser de origem bacteriana, fúngica, viral ou causada por nematoides.

O manejo biológico é evidenciado pela diminuição dos riscos à saúde humana e maior sustentabilidade ambiental (RUFINO; ARAÚJO; NOGUEIRA, 2018) e surge como uma alternativa pela utilização de microrganismos antagonistas (SILVA *et al.*, 2014). A grande diversidade desses microrganismos bem como suas relações antagônicas vêm mostrando interessantes resultados no controle em doenças de plantas (BRAGA JUNIOR *et al.*, 2017; HELING *et al.*, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2017). Se comparado aos métodos químicos, o biocontrole é uma alternativa viável e de menor dano ambiental. Estudos mostram que algumas bactérias têm considerável potencial sobre os fitonematoides, como, por exemplo, *Bacillus subtilis* e *B. thuringiensis* (BAVARESCO, GUALBERTO e ARAUJO, 2020; MAZZUCHELLI, MAZZUCHELLI e ARAUJO, 2020; MACHADO e COSTA, 2017). Nesse mesmo raciocínio, pode-se citar o uso dos fungos dos gêneros *Penicillium*, *Trichoderma* e *Myrothecium*, que, por sua vez, têm exibido bons resultados no controle de nematoides pela produção de substâncias tóxicas aos patógenos (MUKHTAR; TARIQ-KHAN; ASLAM, 2021; SIKANDAR *et al.*, 2020; MIAO *et al.*, 2019; NGUYEN *et al.*, 2018; EAPEN *et al.*, 2005).

Na busca por potencializar resultados, os agricultores passaram a utilizar vários produtos biológicos de diferentes espécies de microrganismos de forma concomitante, em uma mesma aplicação. O conhecimento da compatibilidade entre microrganismos utilizados para o controle biológico é de grande importância no desenvolvimento de estratégias de manejo de fitonematoides. Entretanto, as análises das interações são complexas, e os resultados com comportamento compatível e sinérgico são raros, o que torna necessário comprovar não somente a interação, como também o antagonismo entre eles.

Nesse sentido, apesar da existência de estudos que avaliam as interações das combinações de produtos químicos e biológicos aplicados em uma só calda, as interações entre fungos e bactérias para controle biológico necessitam de mais pesquisas, considerando a escassez de informações relacionadas à compatibilidade dos microrganismos. Objetiva-se com o presente estudo avaliar a compatibilidade dos microrganismos, detectando a possibilidade de efeitos antagônicos, a influência no crescimento e a atuação sinérgica quando aplicados de forma conjunta na cultura.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Cultura da soja no Brasil

A cultura da soja é bastante relevante na balança comercial, tem alto valor socioeconômico e ampla utilização dos seus produtos, subprodutos e grande expressão no mercado interno e externo, sendo considerada a principal *commodity* agrícola nacional (MAURÍCIO FILHO *et al.*, 2018). A soja se destaca-se como um dos principais cultivos da agricultura mundial e brasileira pelo seu potencial produtivo, sua composição química e seu valor nutritivo (YASMIN *et al.*, 2020).

Na safra 2019/2020, o Brasil consolidou-se como maior produtor mundial do grão, tendo uma safra recorde com produção estimada de 124,8 milhões de toneladas, área plantada de aproximadamente 37 milhões de hectares e produtividade média de 3.379 kg/ha (EMBRAPA SOJA, 2021). Na safra 19/20, a produção brasileira obteve ganho de cerca de 4,3% e a tendência é que na safra 20/21 o aumento seja de cerca de 7,2%, com produção recorde de 133,8 milhões de toneladas de soja (CONAB, 2020; CONAB, 2021). Os principais estados produtores na safra 19/20 foram Mato Grosso (28,7%), Paraná (17,3%) e Goiás (10,5%) (EMBRAPA SOJA, 2021).

A cultura da soja é sujeita a um grande número de patologias de importância econômica que incidem principalmente em suas folhas, tendo sua frequência e intensidade variando de acordo com a região produtora (GODOY *et al.*, 2010). As perdas causadas por nematoides na cultura da soja são variáveis conforme a espécie presente, mas podem chegar até a 100% nas piores áreas. Diversos fatores contribuem para o aumento populacional dos nematoides, incluindo textura do solo, manejo, sistema de plantio, entre outros (SILVA *et al.*, 2018). Os nematoides estão entre os problemas fitossanitários de maior importância na cultura da soja. No Brasil, *Meloidogyne javanica* e *M. incognita*, *Heterodera glycines*, *Pratylenchus brachyurus*, *Helicotylenchus* sp., e *Rotylenchulus reniformis* são as espécies de maior importância e interesse econômico pelos danos provocados por elas, como redução do crescimento da planta (dano direto) e porta de entrada para outros patógenos de solo (dano indireto). As perdas de produtividade de grãos podem atingir 90% em combinação com o grau de infestação e a raça do nematoide, fertilidade do solo e suscetibilidade da cultivar (ALMEIDA *et al.*, 2016).

2.2. Fitonematoides de importância na cultura da soja

Os nematoides normalmente são classificados de acordo com seu hábito nutricional (KIMPINSKI & STURZ, 2003). Entre os grupos de nematoides, destacam-se os parasitas de plantas, causando perdas econômicas para grande variedade de culturas. Esses patógenos se alimentam e se reproduzem em plantas vivas, podendo migrar para a rizosfera, dentro das raízes ou parte aérea (SIKOTA & FERNANDEZ, 2005). Fisiologicamente, os nematoides são atraídos para as raízes das plantas por meio de exsudatos liberados, com entrada através das células da epiderme. Antes da penetração do estilete, ocorre uma sondagem para a seleção da célula na qual irá penetrar e se nutrir, ocorrendo, desta forma, as etapas de inserção do estilete, salivagem e ingestão de nutrientes (DROUCH *et al.*, 2013).

No Brasil, os maiores problemas em relação à cultura da soja têm sido relacionados às espécies *Meloidogyne* sp., *Pratylenchus brachyurus* e *Heterodera glycines* (DIAS *et al.*, 2010). Machado, Amaro e Silva (2019) destacam ainda que outras espécies como *Helicotylenchus dihystera* (Cobb) Sher e *Scutellonema brachyurus* Andrassy aparecem como potenciais patógenos para a soja no Brasil, com sua disseminação e densidade populacional aumentando nas áreas de cultivo de soja.

Uma das características que permitiram aos fitonematoides se sobressair em áreas cultivadas foi sua capacidade de sobreviver em condições adversas, pelo uso de variadas estratégias de sobrevivência, além de especificidade ao hospedeiro. Nematoides do gênero *Meloidogyne* não lesionam as estruturas das raízes, todavia formam sítios de alimentação, causando hiperplasia e hipertrofia nestas células nutritoras (ALMEIDA *et al.*, 2016). Em contrapartida, alguns gêneros se caracterizam por apresentar menores graus de especificidade, sendo evolutivamente mais recentes que os anteriormente citados. Os nematoides pertencentes a estes gêneros são classificados como endoparasitas migratórios, sendo sua quantificação mais complexa, portanto menos precisa pelo fato de os endoparasitas migradores depositarem seus ovos tanto nas raízes, quanto no solo (DEBIASI *et al.*, 2016).

Os gêneros *Pratylenchus* e *Aphelenchoides* são exemplos de endoparasitas migradores. Ainda dentro das características que tornaram o filo tão importante a nível de agricultura mundial, destaca-se o efeito sinérgico, que se refere ao dano resultante de a interação do nematoide com outro patógeno superar o dano resultante do somatório dos efeitos individuais de cada um (MACHADO *et al.*, 2019).

Estando presente na área de cultivo, o manejo do fitonematoide é muito complexo, tornando a erradicação praticamente impossível. Devido a isso, quando a introdução é feita em

determinada área, deve-se priorizar a redução das populações, utilizando métodos de controle integrados (DIAS *et al.*, 2010).

A prevenção constitui o princípio mais importante e a melhor linha de defesa para o controle de nematoides. Significa impedir a disseminação do nematoide de uma área para outra. O solo é importante carreador de nematoide a longa e curta distância. O solo infectado pode ser transportado pelo homem, aderido a implementos agrícolas, maquinários, veículos, ferramentas. É de grande importância lavar cuidadosamente máquina, implementos e ferramentas depois de trabalhar em área infestadas (RIBEIRO *et al.*, 2013).

O uso de cultivares resistentes a nematoides também surge como uma alternativa viável, quando integrada a outras (BELLÉ *et al.*, 2017). A resistência geralmente é direcionada a umas poucas espécies de nematoides considerados mais importantes para determinadas culturas. Contudo, a semeadura de cultivares resistente não deve ser a única opção (DIAS *et al.*, 2010).

O manejo de nematoides através de nematicidas químicos ainda é uma forma de controle amplamente utilizada, mas a diminuição da eficácia por uso inadequado do produto vem possibilitando cada vez mais uma abertura a outras alternativas de controle com custos mais baixos (VITTI *et al.*, 2014). A utilização de nematicidas é o principal método de manejo e visa à mitigação de perdas de produção, entretanto, apesar do seu efeito imediato, o poder de ação é limitado e não garante a erradicação de nematoides no solo, reduzindo apenas a infestação enquanto persistir o princípio ativo do produto (FONSECA *et al.*, 2018). A nutrição vegetal também é considerada um importante fator na relação patógeno-hospedeiro, visto que aumenta a resistência a doenças e a tolerância em função do maior vigor, diminuindo a predisposição das plantas à infecção, colonização e reprodução do fitopatógeno (SILVA *et al.*, 2021).

Entretanto, a prática isolada de somente uma técnica de manejo não é suficiente no controle de fitonematoides, sendo necessária a implantação de ferramentas inseridas em um programa de manejo integrado (BARBOSA *et al.*, 2019). Nos últimos anos, o controle biológico vem se tornando uma importante ferramenta para o controle de nematoides. É uma prática sustentável e, atualmente, são disponibilizados, pela indústria, organismos eficientes na redução dos danos causados por esses patógenos (BARBOSA *et al.*, 2019). Uma grande quantidade de organismos é capaz de repelir, inibir ou mesmo levar à morte os fitonematoides. Mais de 200 inimigos naturais de fitonematoides têm sido reportados, entre eles, fungos, bactérias, nematoides predadores, ácaros e outros (LARRIBA *et al.*, 2014).

2.3. Agentes de controle biológico

Uma importante estratégia para o desenvolvimento integrado de práticas sustentáveis é a utilização de microrganismos no manejo agrícola com o objetivo de melhorar o aproveitamento de nutrientes, reduzir doenças e pragas, diminuir o uso de produtos químicos, bem como melhorar a produtividade das culturas (BHATTACHARYYA, GOSWAMI & BHATTACHARYYA, 2016). Ressalta-se, porém, que a interação entre microrganismos e plantas é altamente complexa, simultânea e dependente de uma série de fatores, sendo seu estudo de fundamental importância (BARBOSA *et al.*, 2015).

O manejo de nematoides na cultura da soja é uma tarefa complexa e deve associar diversos métodos, visando a diminuir a intensidade do parasita nas culturas (KATH *et al.*, 2017). Os principais métodos de manejo de nematoides são a destruição de resíduos de culturas, rotação de culturas, uso de cultivares ou híbridos resistentes, controle químico e biológico com nematicidas (BRITO *et al.*, 2018). O controle químico é o mais utilizado, entretanto, apesar de sua eficiência, muitas vezes, esses produtos são altamente tóxicos. Alguns nematicidas químicos vêm sendo retirados do mercado ou tendo seu uso restringido, impulsionando assim o crescente uso do controle biológico, aumentado também pela preocupação com o meio ambiente (BORTOLINI *et al.*, 2013). Esses produtos podem também persistir no solo, contaminar lençóis freáticos, representar um risco à saúde humana e à fauna, além de apresentarem alto custo e eficiência temporária (OLIVEIRA *et al.*, 2019).

O controle biológico apresenta uma série de vantagens em relação ao químico, pois não contamina, não desequilibra o meio ambiente, nem deixa resíduos, além de ser barato e de fácil aplicação (SOARES, 2006). Uma grande quantidade de organismos é capaz de repelir, inibir ou mesmo levar à morte os fitonematoides. Podem reduzir as populações de nematoides fitopatogênicos e geralmente estão associados ao sistema radicular das plantas em solos com alto teor de matéria orgânica, favorecendo a degradação dos resíduos vegetais e a ciclagem de nutrientes (OLIVEIRA *et al.*, 2019). Mais de duzentas espécies para o controle de fitonematoides têm sido reportadas, entre elas, fungos, bactérias, outros nematoides, ácaros predadores e outros (STIRLING, 1991). Os principais microrganismos para o controle biológico de nematoides são as bactérias e os fungos (VAZ, 2011).

2.3.1. Bactérias no controle biológico

Microrganismos da rizosfera como as rizobactérias têm mostrado defesa contra o ataque de patógenos de solo, inclusive os fitonematoides (MHATRE *et al.*, 2018). Alguns isolados de rizobactérias promovem o crescimento de plantas, além de aumentar o desenvolvimento vegetal. Esses microrganismos também podem ser utilizados no controle biológico de fitonematoides. Os principais mecanismos de ação das rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (*Plant growth-promoting rhizobacteria* - PGPRs) são a redução da eclosão dos ovos do patógeno em função da produção de toxinas e da alteração dos exsudatos radiculares da planta. Isso dificulta a localização das raízes por parte dos nematoides, além da capacidade de induzirem resistência sistêmica nas plantas (MHATRE *et al.*, 2018).

Os principais gêneros de bactérias associadas ao biocontrole de nematoides são *Pseudomonas* e *Bacillus* (GOMEZ *et al.*, 2018). Espécies de *Bacillus* têm sido utilizadas tanto para o controle de patógenos foliares quanto de solo. Este gênero pertence ao grupo de bactérias gram-positivas, cuja característica é a produção de endósporos (NORONHA *et al.*, 1995). As endotoxinas produzidas por *B. subtilis* interferem no ciclo de reprodução dos nematoides, principalmente na ovulação e eclosão de juvenis (SHARMA *et al.*, 2011). Algumas espécies de *Bacillus* apresentam bom uso por utilizarem, para sua nutrição, exsudatos das plantas, colonizando as raízes após a emergência das plântulas, produzindo compostos com atividade antimicrobiana. Para *Bacillus*, sua eficiência foi comprovada inicialmente para os nematoides *Meloidogyne incognita* e *Rotylenchulus reniformis*, com reduções populacionais entre 60 e 65% (FERREIRA, 2015). No entanto, a substituição de um sistema consolidado com produtos químicos por um com controle biológico deve ser gradual, visando a um sistema de cultivo sustentável cada vez menos dependente do uso de nematicidas químicos (FERREIRA, 2015).

As bactérias do gênero *Bacillus* estão entre as mais abundantes na rizosfera e podem estimular mecanismos desejáveis aos cultivos, como a nodulação de leguminosas, fixação biológica de nitrogênio e absorção de nutrientes. Adicionalmente, apresentam potencial de ação na germinação e emergência de plântulas, crescimento aéreo e radicular, na produtividade, no auxílio à superação das plantas frente às adversidades abióticas (OLIVEIRA, 2016). A exploração comercial de *B. subtilis* para a formulação de bionematicidas é alta, principalmente aquelas produtoras de substâncias tóxicas para os fitonematoides que alteram os exsudatos radiculares, aliada à habilidade de sobreviver no solo. Há evidências de que produtos químicos utilizados nas culturas podem ter efeitos antagônicos,

nulos ou sinérgicos sobre a atividade de fungos utilizados no controle biológico (MOURÃO, 2003). Assim, conhecer a compatibilidade destes produtos sobre as diversas fases de desenvolvimento dos fungos é essencial em programas de manejo de pragas e doenças.

As bactérias do gênero *Bacillus*, principalmente *B. subtilis*, além de componentes da população microbiana do solo, rizoplano e filoplano, também apresentam características atrativas para os estudos de controle biológico de doenças de plantas (NORONHA *et al.*, 1995). Os principais mecanismos de biocontrole incluem microparasitismo, antibiose, competição e resistência induzida; mecanismos adicionais são a hipovirulência mediada por viroses fúngicas e inibição de enzimas envolvidas na patogenicidade (XU *et al.*, 2011). Porém, para a comercialização desses antagonistas, são necessárias muitas pesquisas preliminares, tanto em laboratório quanto no campo (DONG & ZHANG, 2006). Estudo de Ortiz *et al.* (2018) mostrou que cepas bacterianas de *Bacillus thuringiensis*, *Sphingobacterium* sp e *S. maltophilia* são parasitas de juvenis e ovos de nematoides, reduziram danos às raízes das plantas e representam alternativas potenciais para o controle biológico de *Meloidogyne* spp. O mesmo estudo mostrou ainda aumento do peso da planta de abóbora-menina (*Cucurbita máxima*) em cerca de 17% no tratamento com *Bacillus thuringiensis*.

2.3.2. Fungos no controle biológico

Estratégias de biocontrole para nematoides parasitas de plantas constituem uma alternativa válida para seu controle. Os fungos atuam no controle de nematoides por meio de dois tipos principais de mecanismos de ação. Os fungos reduzem o ataque dos nematoides parasitas de plantas pelo parasitismo, pela paralisação, pela antibiose, pela produção de enzimas líticas e também pela competição espacial. O segundo grupo de mecanismos de ação leva a defesas da planta com a modificação de exsudatos de raízes, produção de estrigolactonas, metabólitos secundários de plantas, produção de enzimas, indução de resistência sistêmica adquirida ou induzida e o transporte de componentes de defesa química através da planta (POVEDA, ABRIL-URIAS & ESCOBAR, 2020).

Fungos nematófagos têm capacidade de capturar, parasitar ou paralisar em qualquer estágio do seu ciclo de vida. Para isso, a preservação da viabilidade dos conídios é de extrema importância por serem estas estruturas as responsáveis pela sobrevivência e desenvolvimento posterior do fungo (DUARTE *et al.*, 1992). Cerca de 75% dos antagonistas de nematoides identificados são fungos habitantes de solo que apresentam potencial para serem parasitas de ovos, juvenis, adultos ou cistos, ou ainda para produzirem metabólitos tóxicos aos nematoides

(Jatala, 1986). Alguns fungos nematófagos também podem ser capazes de colonizar endofiticamente raízes de plantas e, além disso, controlar doenças causadas por fungos de solo (MONFORT *et al.*, 2005). Estes bioagentes são divididos em ectoparasitas ou predadores, endoparasitas, parasitas de ovos e fêmeas e produtores de metabólitos tóxicos (JANSSON *et al.*, 1997).

Os ovos são mais susceptíveis à infecção, nesse sentido, os principais fungos parasitas de ovos têm obtido maior quantidade de estudos devido aos resultados promissores, como ocorre com *Pochonia chlamydosporia* e *Paecilomyces lilacinus* (ATKINS *et al.*, 2003; JATALA *et al.*, 1980). *Paecilomyces lilacinus* é um fungo oportunista que parasita ovos e cistos, saprófita, capaz de utilizar grande quantidade de substratos, tendo ainda pouca especificidade de hospedeiro (DOMSCH *et al.*, 1980; GOETTEL *et al.*, 2001). A aplicação do fungo no solo possibilita seu estabelecimento, crescimento e disseminação em um curto espaço de tempo. Em testes conduzidos em laboratório com *P. lilacinus*, observou-se que os ovos de *Meloidogyne incognita* foram infectados e inviabilizados rapidamente (JATALA, 1986), confirmando sua eficiência como agente de biocontrole.

Os fungos predadores aprisionam nematoides móveis presentes no solo com estruturas ou armadilhas formadas ao longo do crescimento das hifas. A morfologia e a função das armadilhas são diferentes em função da espécie do fungo. Elas são divididas de acordo com o tipo de armadilha, podendo ser redes adesivas, ramos adesivos, nódulos adesivos e anéis constritores (AHREN & TUNLID, 2003). Já os fungos endoparasitas usam conídios que liberam suas estruturas para infectar os nematoides. A maior parte dessas espécies de fungos são parasitas obrigatórios e passam grande parte de sua vida dentro de nematoides infectados. No solo, sobrevivem por meio dos conídios (JANSSON *et al.*, 1997).

Larriba *et al.* (2014) observaram que o fungo nematófago *P. chlamydosporia* se mostrou capaz de colonizar as raízes da soja. A habilidade de os fungos nematófagos colonizarem raízes é uma grande vantagem no combate aos nematoides se estes fungos apresentarem bom potencial de controle. *Purpureocillium lilacinum* foi relatado como um potencial agente de controle biológico de nematoides (RAJINIKANTH *et al.*, 2013). Anteriormente, *P. lilacinum* era conhecido como *P. lilacinus* (GOETTEL *et al.*, 2001). *P. lilacinus* infecta ovos e fêmeas de espécies de nematoides através dos mecanismos de parasitismo dos ovos, causando diminuição da eclosão e também provocando a morte de embriões de 5 a 7 dias. Produz também toxinas que afetam o sistema nervoso do nematoide e causam deformações no estilete naqueles que sobrevivem. O fungo tem dado excelentes

resultados em diversas condições de clima e solo (MOOSAVI & ZARE, 2012; MUHKTAR *et al.*, 2015).

O fungo *Trichoderma harzianum* foi apresentado como um agente biológico eficaz para o controle de cistos e galhas. O mecanismo de controle de *T. harzianum* se baseia em dois métodos: parasitismo direto de ovos e larvas pelo aumento da atividade de quitinases e proteases, sendo este um indicativo da capacidade de infectar ovos; e indução dos mecanismos de defesa do hospedeiro (MUHKTAR *et al.*, 2015; MEYER *et al.*, 2019). Estudo de Pocurull *et al.* (2020) mostrou que as cepas T34 de *T. asperellum* e T22 de *T. harzianum* induziram resistência contra *M. incognita* em tomate. Mukhtar, Tariq-Khan & Aslam (2021) também observaram que sete espécies testadas de *Trichoderma* causaram reduções significativas no número de galhas, ovos e no fator reprodutivo do *M. javanica*, aumentaram o comprimento da parte aérea e da raiz, além de influenciar positivamente no peso da parte aérea, mas houve diminuição no peso da raiz.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado *in vitro* compondo dois ensaios em condições de casa de vegetação do Laboratório de Cultura de Tecidos (LCTV), tendo as análises microbiológicas sido feitas no Laboratório de Fitopatologia e Nematologia, todos localizados no Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde (Latitude: 17° 48' 24.231", Longitude: 50° 54' 23.634", Altitude: 748 m).

3.1. Obtenção e multiplicação dos agentes de controle biológico

Inicialmente, os microrganismos foram obtidos de produtos comerciais utilizados para o controle biológico: isolado SF 04, à base de *T. asperellum*, obtido do produto comercial Quality®, da empresa Lallemand; isolado SF 267, à base de *B. methylotrophicus*, obtido do produto comercial Onix® OG, da empresa Lallemand; e isolado QST 2808, à base de *B. subtilis*, obtido do produto comercial Rizos® OG, da empresa Lallemand. As amostras para análise microbiológica e para condução do experimento foram retiradas de embalagens lacradas, garantindo que a viabilidade e a composição dos produtos não fossem alterados por condições externas, tendo sido todos eles submetidos à análise microbiológica.

3.2. Avaliação em laboratório (*in vitro*)

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, por duas vezes, com 3 tratamentos, sendo eles: 1. *Trichoderma asperellum* (fungo); 2. *Bacillus subtilis* (bactérias) + *T. asperellum* (fungo); 3. *Bacillus methylotrophicus* (bactérias) + *Trichoderma asperellum* (fungo), 4 repetições, compondo 24 unidades experimentais.

Para o teste de germinação dos conídios dos fungos, as formulações dos produtos à base de fungos foram diluídas em concentrações de $1,0 \times 10^6$ esporos.mL⁻¹ e misturadas às suspensões bacterianas na concentração de $1,0 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹. Em seguida, foram retiradas alíquotas de 15 µL da suspensão, e adicionadas quatro gotas em meio de cultura BDA (Batata Dextrose e Ágar). As diluições foram escolhidas pela melhor avaliação em microscópio óptico (BETTIOL *et al.*, 2012).

Os produtos biológicos comerciais foram submetidos à análise microbiológica. Para os produtos constituídos por fungos, foi feita contagem de esporos em Câmara de Neubauer,

em seguida, plaqueados em meio de cultura BDA, mantidos em câmara climatizada BOD à temperatura de 25 ± 1 °C, por 20 horas, para verificar sua viabilidade, segundo metodologia de Bettioli *et al.* (2012). Após iniciar a germinação, foi adicionada uma gota de azul de lactofenol (8 µL) em cada ponto. Os conídios foram considerados não viáveis quando não corados e viáveis quando entumescidos ou germinados, A porcentagem de conídios viáveis e não viáveis foi quantificada sob microscópio óptico na objetiva de 40x (quatro campos por placa de Petri), sendo avaliados 100 esporos por placa (BETTIOLI *et al.*, 2012).

Os produtos constituídos por bactérias foram examinadas segundo metodologia de diluição em série e feito plaqueamento de alíquotas em meio Nutriente Ágar (NA) para bactéria, em seguida armazenado na câmara de crescimento bacteriológico a $\pm 35^\circ$ C por 24 horas e posterior contagem de unidade formadora de colônia (UFC.ml⁻¹) (ALFENAS, 2007).

3.3. Avaliação em casa de vegetação

O experimento em condições de casa de vegetação foi conduzido em delineamento em blocos casualizados (DBC). Foram avaliados 6 tratamentos, sendo eles: 1. Controle negativo (ausência de microrganismo); 2. *B. subtilis* (bactérias); 3. *B. methylotrophicus* (bactérias); 4. *T. asperellum* (fungo); 5. *B. subtilis* (bactérias) + *T. asperellum* (fungo); 6. *B. methylotrophicus* (bactérias) + *T. asperellum* (fungo), com 5 repetições.

O solo para condução do experimento foi coletado em área experimental do Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde. Posteriormente, o solo foi peneirado e misturado com areia na proporção 2:1, em seguida, autoclavado por 40 minutos a 120°C (SANTOS *et al.* 2019). Foi acomodados em vasos plásticos com capacidade de 3 litros. Em seguida, foi feita a adubação conforme a análise de solo (Tabela 1). Foram semeadas 8 sementes de soja Monsoy 7110 IPRO, em vasos de polietileno, em seguida, foram aplicadas as soluções aquosas dos produtos biológicos seguindo as recomendações comerciais para 500 mL/ha, simulando uma aplicação em sulco. O ensaio em casa de vegetação foi avaliado aos 0, 7, 30 e 45 dias após o plantio (DAP).

Tabela 1: Caracterização química do solo usado nos ensaios.

pH	P	K	S	H+Al	Al	Ca	Mg	K	SB	T	m	V	MO
H ₂ O	--- mg dm ⁻³ ---			----- cmol _c dm ⁻³ -----						%		dm ⁻³	
5,84	6,6	97	4,6	2,5	0,0	5,1	1,4	0,25	6,8	9,2	0,0	73	13,1

pH em água; P=fósforo; S=enxofre; H + Al=hidrogênio + alumínio; Al=alumínio; Ca=cálcio; Mg=magnésio; K=potássio; SB=Soma de Bases Trocáveis; T=CTC efetiva; m=Índice de Saturação de Alumínio; V=Índice de Saturação de Bases; e MO=Matéria Orgânica. Laboratório Solotech Cerrado LTDA – ME, Rio Verde, GO.

As amostras de solo coletadas foram submetidas a análises microbiológicas para quantificação de UFC.mL⁻¹. Para as análises microbiológicas, foram pesados 10g de solo, adicionados em um erlenmeyer com 90 mL de água autoclavada, em seguida, foi feita a diluição seriada e pipetados 100 µL da suspensão no meio NA (Ágar Nutriente) para avaliação das bactérias. Para avaliar o fungo, foi feito plaqueamento profundo no meio BDA (Batata Dextrose Ágar; Triton X-100), condicionado por 7 dias em BOD a 25 °C. As avaliações foram feitas pela contagem das colônias (UFC.mL⁻¹). Aos 45 dias após o plantio (DAP), foi avaliada a massa fresca e seca da parte aérea e massa fresca e seca da raiz.

3.4. Análises Estatísticas

Os dados da avaliação em laboratório (*in vitro*) foram submetidos à análise de variância e quando significativos, foi feito o teste de Tukey ($P < 0,05$) a fim de comparar as médias e identificar os tratamentos com interação sinérgica ou antagônica. O experimento em casa de vegetação foi organizado em delineamento em blocos casualizados, seguindo o esquema fatorial 6 x 4 (6 tratamentos e 4 tempos de avaliação), em 5 blocos. Os dados foram submetidos à análise de variância e, quando significativos, foram avaliados pelo teste de Tukey ($P < 0,05$), e por análise de regressão, o fator tempo. As análises estatísticas foram feitas no programa Sisvar, versão 5.6.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No experimento conduzido em laboratório, *in vitro*, foram observadas diferenças entre os tratamentos (Figura 1). No ensaio 1, o tratamento com *T. asperellum* apresentou a maior média de esporos viáveis e sua contagem não diferiu da contagem de esporos do tratamento *B. subtilis* + *T. asperellum*, que se mostrou igual à combinação de *B. methylotrophicus* + *T. asperellum*, que apresentou a menor média. A contagem de esporos inviáveis foi inversamente proporcional, ou seja, as maiores contagens de esporos inviáveis foram avaliadas para os tratamentos *B. methylotrophicus* + *T. asperellum* e *B. subtilis* + *T. asperellum*.

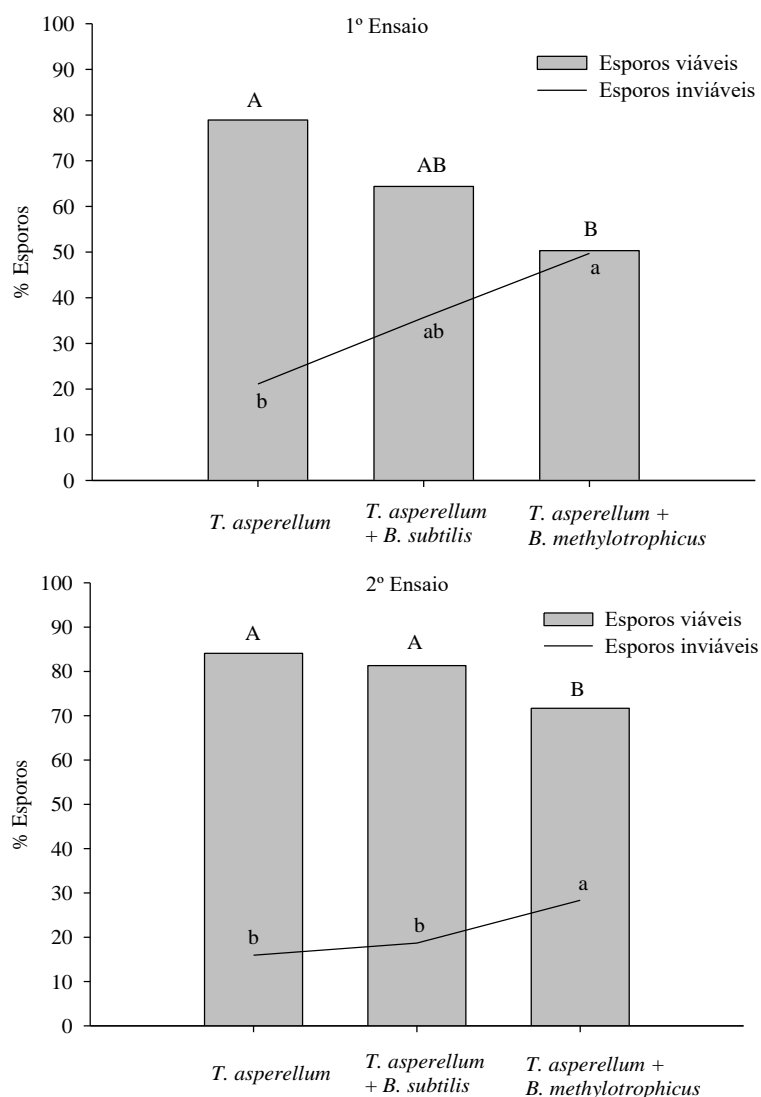


Figura 1: Quantidade de esporos viáveis e inviáveis avaliados em laboratório envolvendo a interação entre o fungo *T. asperellum* e as bactérias *B. subtilis* e *B. methylotrophicus* em dois ensaios.

No 2º ensaio, as diferenças ficaram evidenciadas, sendo os tratamentos *T. asperellum* e *B. subtilis* + *T. asperellum* os melhores, e o tratamento *B. methylotrophicus* + *T. asperellum* o pior estatisticamente. Ou seja, o segundo ensaio mostra que a contagem de esporos viáveis foi inferior para o tratamento *B. methylotrophicus* + *T. asperellum*, que, conseqüentemente, apresentou maior contagem de esporos inviáveis, devendo ser ressaltado que, para este 2º ensaio, os valores de esporos viáveis para tal tratamento foram superiores a 71%.

De acordo com Kupper et al. (2013), algumas vezes a eficácia dos antagonistas *in vitro* ou em casa de vegetação pode ser insuficiente para estabelecer o limiar de população exigido para um biocontrole no campo, mas pode servir como indicativo da viabilidade no controle de fitopatógenos sob condições naturais de infecção. Ou seja, a elevada redução encontrada para o tratamento da interação *B. methylotrophicus* + *T. asperellum* (Figura 1), embora apresente valores inferiores significativamente aos demais tratamentos, não invalida sua utilização em campo em programas de biocontrole, pois os dados não sugerem uma alarmante interação negativa entre os dois microrganismos.

O revestimento de sementes de tomate com *B. subtilis* e *T. asperellum* se mostrou eficiente para o manejo do *Pythium aphanidermatum*, fungo causador do tombamento, segundo estudo de Kipngeno et al. (2015). Os autores observaram que, em condições simuladas de alta pressão da doença, as sementes revestidas com *B. subtilis* e *T. asperellum* apresentaram mortalidade de 20,19% e 24,07%, respectivamente, enquanto o controle (não revestido) teve mortalidade de plântulas de 65,89%, sendo assim, constata-se que as espécies podem ser úteis no manejo da doença no tomateiro.

Oliveira (2006) destaca que o gênero *Bacillus* tem grande vantagem em relação aos outros gêneros de bactérias utilizados no biocontrole, principalmente pela sua capacidade formadora de esporos, os quais são tolerantes ao calor, frio, condições extremas de pH, pesticidas, fertilizantes e tempo de estocagem. *B. subtilis* é uma bactéria móvel que forma esporos centrais com formato cilíndrico ou elipsoidal, enquanto a *B. methylotrophicus* é aeróbica, móvel, com endósporos em formato de bastão (MNNERAT et al., 2020).

Lutz et al. (2004) destacam que a verificação de misturas de cepas eficazes é essencial para explorar o máximo potencial de controle, selecionando cepas que complementam, ao invés de atuar como antagonistas umas das outras. Shanmugan, Gupta e Dohroo (2013) observaram em estudo com a cultura do gengibre que o desempenho das misturas de cepas (*Burkholderia cepacia* e *Bacillus subtilis* com *Trichoderma harzianum*) apresentou melhor controle, resultando em menor incidência da podridão de rizoma de gengibre.

A interação entre os tratamentos e os tempos de avaliação foi significativa pelo teste da ANOVA. Foi feita a contagem microbiológica dos fungos e bactérias (Tabela 2) e, para ambos, evidenciada interação fatorial em função dos tratamentos avaliados e dias após a implantação do experimento.

Tabela 2: Contagem microbiológica de fungos e bactérias (\log_{10} UFC ml^{-1}) em função dos tratamentos avaliados.

Fungos				
Tratamentos	Dias			
	0	7	30	45
Testemunha	0,54 Aa	0,18 Ac	0,18 Ab	0,18 Ac
<i>B. subtilis</i>	0,48 Aa	0,18 Ac	0,18 Ab	0,18 Ac
<i>B. methylotrophicus</i>	0,18 Ba	0,18 Bc	1,28 ABb	1,55 Abc
<i>T. asperellum</i>	0,18 Ba	1,50 Bbc	4,24 Aa	4,55 Aa
<i>B. subtilis</i> + <i>T. asperellum</i>	0,18 Ba	3,14 Aa	4,06 Aa	4,38 Aa
<i>B. methylotrophicus</i> + <i>T. asperellum</i>	0,18 Ca	2,09 Bab	3,96 Aa	1,88 Bb

Bactérias				
Tratamentos	Dias			
	0	7	30	45
Testemunha	0,18 Aa	0,18 Ac	2,70 Aa	0,18 Aa
<i>B. subtilis</i>	0,18 Ba	3,78 Aab	1,46 ABa	0,18 Ba
<i>B. methylotrophicus</i>	0,18 Aa	1,77 Abc	2,54 Aa	0,18 Aa
<i>T. asperellum</i>	0,18 Aa	2,65 Aabc	0,18 Aa	0,18 Aa
<i>B. subtilis</i> + <i>T. asperellum</i>	0,18 Ba	4,95 Aa	0,18 Ba	0,18 Ba
<i>B. methylotrophicus</i> + <i>T. asperellum</i>	0,18 Ba	4,44 Aab	2,45 ABa	0,18 Ba

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si segundo teste de Tukey ($P < 0,05$). Letras maiúsculas comparam os mesmos tratamentos dentro dos diferentes tempos na linha, letras maiúsculas comparam diferentes tratamentos dentro do mesmo tempo na coluna.

Não houve diferença entre os tratamentos na primeira contagem microbiológica para fungos e bactérias no dia 0 (Tabela 2). No dia 7, os tratamentos diferiram, sendo que o tratamento com *B. subtilis* + *T. asperellum* apresentou as melhores médias, mas se mostrando igual estatisticamente ao *B. methylotrophicus* + *T. asperellum*, tanto na contagem de bactérias,

quanto na de fungos. Em relação aos tratamentos utilizando apenas as cepas das bactérias *B. subtilis* e *B. methylotrophicus*, observou-se que para contagem de bactérias os tratamentos *B. subtilis* + *T. asperellum* e *B. methylotrophicus* + *T. asperellum* não diferiram dos tratamentos de associação com o *T. asperellum*, respectivamente.

Aos 30 dias, os tratamentos *T. asperellum*, *B. subtilis* + *T. asperellum* e *B. methylotrophicus* + *T. asperellum* apresentaram os melhores resultados na contagem microbiológica de fungos, enquanto do dia 45 os melhores tratamentos foram *T. asperellum*, *B. subtilis* + *T. asperellum* (Tabela 2). Ainda aos 30 e 45 dias, não houve diferença entre os tratamentos na contagem microbiológica de bactéria.

Os efeitos individuais das bactérias do gênero *Bacillus* e dos fungos do gênero *Trichoderma* já são bastante conhecidos (CHOWDAPPA et al., 2013; ABDULLAH; ALI; SULEIMAN, 2008). Em relação à interação desses dois microrganismos, os resultados encontrados no presente estudo reforçam os encontrados por Izquierdo-Garcia et al. (2020), Morsy, Abdel-Kawi e Khalil (2009), Yobo, Laing e Hunter (2009), Maketon, Apisitsantikul e Siriraweekul (2008), em que os autores observaram interação positiva na utilização combinada entre *Bacillus* e *Trichoderma*.

Yobo, Laing e Hunter (2009) ressaltaram, em estudo com feijão, o potencial no uso de misturas de *Trichoderma* e *Bacillus* para melhorar o crescimento das plantas e o controle de *Rhizoctonia solani*. Também Izquierdo-García et al. (2020) atestaram em seus resultados a compatibilidade entre *T. virens* GI006 e *B. velezensis* Bs006 para controle da murcha de *Fusarium*, causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *physalis* (Foph), em groselha-do-cabo (*Physalis peruviana*). Acredita-se que a combinação entre *B. subtilis* + *T. asperellum* tenha apresentado interação positiva.

Em relação ao comportamento dos tratamentos, no que concerne aos tempos de avaliação (Tabela 2), nota-se que para contagem dos fungos os tratamentos *T. asperellum* e *B. methylotrophicus* + *T. asperellum* apresentaram maiores contagens a partir dos 30 dias, o tratamento *B. subtilis* + *T. asperellum* apresentou maior contagem a partir dos 7 dias de avaliação, sendo que os valores não diferiram dos dias seguintes da avaliação. Analisando os dados de contagem de bactérias, ainda na Tabela 3, todos os tratamentos apresentaram contagens significativamente maiores à época 0 a partir dos 7 dias de avaliações. Em relação ao comportamento das contagens dos microrganismos ao longo da avaliação, foi feita análise de regressão para descrever o comportamento dos tratamentos.

Os tratamentos *B. methylotrophicus*, *T. asperellum*, *B. subtilis* + *T. asperellum* e *B. methylotrophicus* + *T. asperellum* apresentaram comportamento quadrático quanto à análise

microbiológica de fungos (Figura 2), os demais tratamentos não apresentaram tal comportamento, ou seja, não foi possível descrever seu comportamento a partir de uma equação. Já os tratamentos testemunha e *B. subtilis* não apresentaram esse comportamento, estando suas médias experimentais apresentadas na Tabela 3.

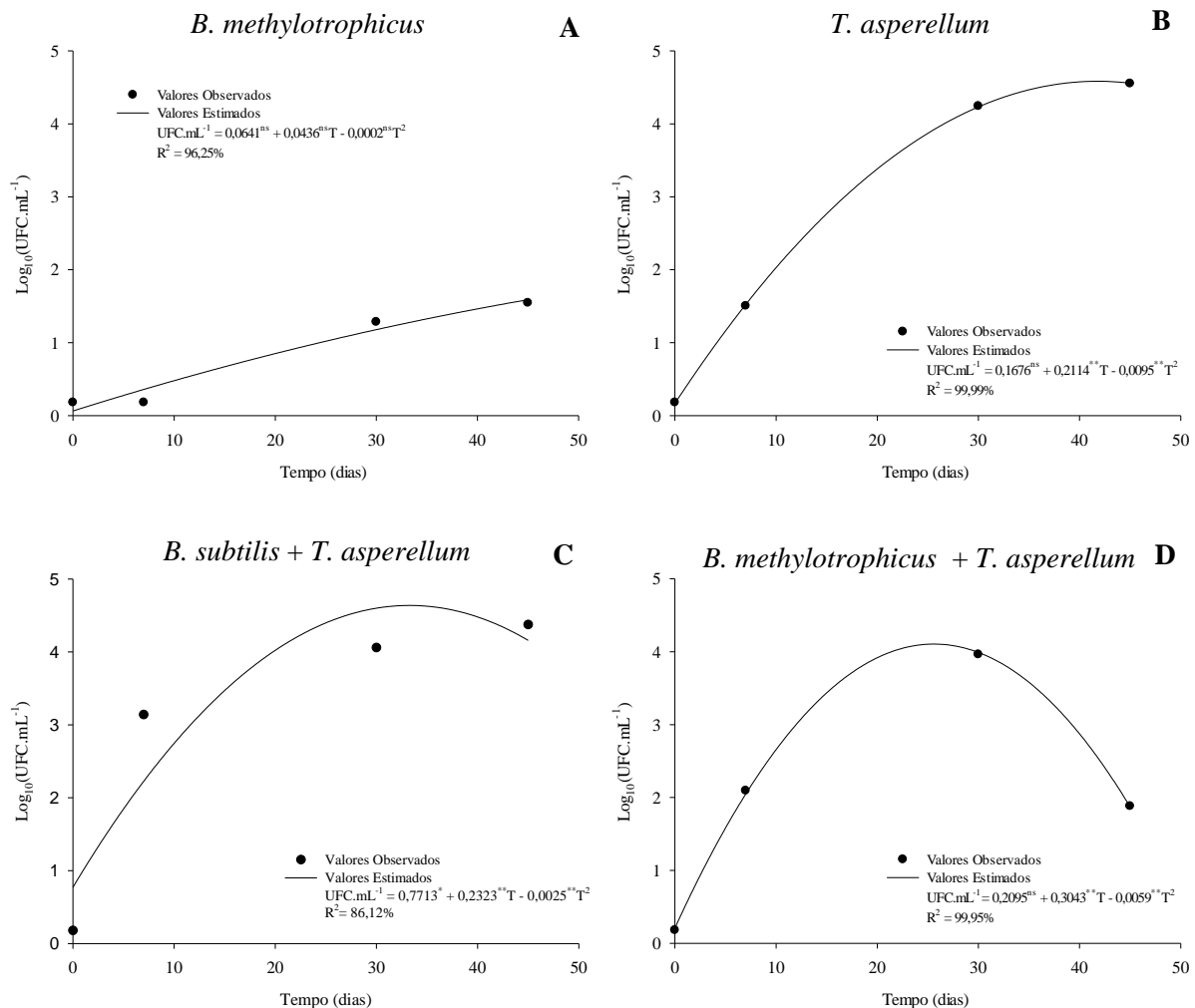


Figura 2: Comportamento da contagem de fungos em função dos tratamentos avaliados durante diferentes tempos. A: Tratamento *B. methylotrophicus*; B: *T. asperellum*; C: *B. subtilis* + *T. asperellum* e D: *B. methylotrophicus* + *T. asperellum*.

Observa-se que no tratamento com o *T. asperellum* houve aumento aos 45 dias de 96% em relação ao tempo 0. Já o tratamento *B. methylotrophicus* + *T. asperellum* apresentou aumento aos 30 dias de 94,74% em relação ao tempo 0, entretanto, aos 45 dias observou-se redução de 46,91% em relação aos 30 dias (Figura 2). Entre os diversos metabólitos produzidos por *Bacillus* spp., os principais responsáveis pela ação antagonica são os antibióticos peptídicos que controlam fungos e bactérias (ABO-ELDAHAB & EL-GOORAMI, 1964). Estudos com *B. subtilis* mostram atividade *in vitro* contra diferentes tipos

de patógenos para várias espécies cultivadas, em razão da produção de antibióticos como iturina A e surfactina, capazes de inibir o crescimento micelial de fungos (ASAKA & SHODA, 1996).

Maketon, Apisitsantikul e Siriraweekul (2008) avaliaram *B. subtilis* e *T. harzianum*, isoladamente e em combinação, no controle de três doenças do tabaco: murcha bacteriana, causada por *Ralstonia solanacearum*; podridão radicular e de colo, causada por *Pythium aphanidermatum*; e mancha foliar do olho-de-rã, que tem como agente causal a *Cercospora nicotiana*. Os resultados mostraram que a combinação entre espécie de *B. subtilis* e espécies de fungo como *T. asperellum* contribui de forma direta ou indireta, possibilitando, assim, aumentar a produtividade.

Os tratamentos *B. subtilis*, *T. asperellum*, *B. subtilis* + *T. asperellum* e *B. methylotrophicus* + *T. asperellum* não apresentaram comportamento quadrático quanto à análise microbiológica de bactérias, enquanto os tratamentos testemunha e *B. methylotrophicus* apresentaram tal comportamento (Figura 3). Embora tenha apresentado comportamento quadrático, no tratamento *B. methylotrophicus*, ao longo dos tempos de avaliação, as contagens de bactérias não diferiram entre si (Tabela 2).

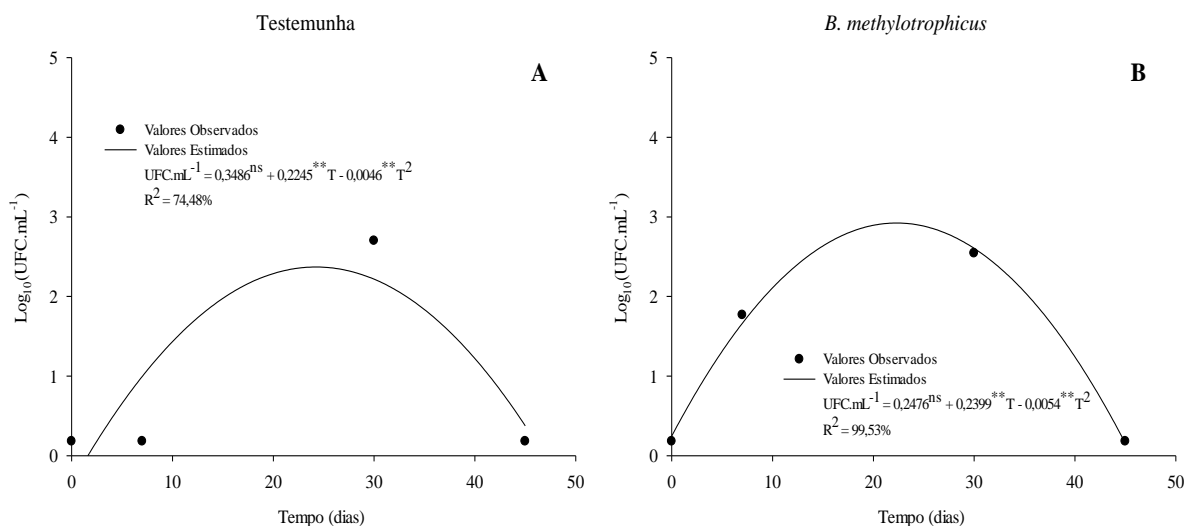


Figura 3: Comportamento da contagem de bactérias em função dos tratamentos avaliados durante diferentes tempos. A: Tratamento testemunha; B: *B. methylotrophicus*.

Oliveira *et al.* (2017) avaliaram que um produto comercial à base de *B. subtilis*, com aplicação via tratamento de semente (350 mL ha⁻¹) e via foliar (2,0 L ha⁻¹), controlou significativamente nematoides aos 30 dias após a semeadura na cultura do feijoeiro. A microbiolização das sementes de soja com *B. subtilis* foi efetiva também na redução do

número de nematoides *Pratylenchus brachyurus* nas raízes e no solo, sem afetar a germinação (MACHADO & COSTA, 2017), e melhorou a qualidade das sementes em função do aumento na concentração de proteínas totais de reserva, porcentagem de emergência de plântulas e vigor de sementes, pelo teste de envelhecimento acelerado (TAVANTI *et al.*, 2020).

A microbiolização de sementes de soja com *B. methylophilus* e *B. subtilis* estimulou redução significativa no número de ovos e no fator de reprodução de *M. javanica*, importante nematoide causador de danos na cultura da soja, em comparação com a testemunha (ALCEBIADES *et al.*, 2019). Em estudo com a cultura do café, utilizando dois genótipos (Mundo Novo IAC 376-4 e IPR-100), três nematicidas biológicos (*B. methylophilus*, *B. subtilis* e *T. asperellum*) e tratamento incluindo os três nematicidas juntos, as misturas de biológicos foram eficientes no controle de *M. exigua* (TOLARDO *et al.*, 2019).

Oliveira *et al.* (2019), estudando a eficiência de produtos biológicos associados à adubação biológica no biocontrole de *P. brachyurus* na cultura da soja, observaram que, aos 60 dias após a semeadura (DAS), os tratamentos *T. asperellum*, *B. subtilis*, *P. lilacinum*, *B. subtilis* + *T. asperellum*, *B. subtilis* + *P. lilacinum*, *T. asperellum* + *P. lilacinum*, *B. subtilis* + *T. asperellum* + *P. lilacinum* e abamectina promoveram eficiência no controle do nematoide e ressaltam ainda que, aos 120 DAS, os produtos biológicos apresentaram maior eficiência no controle de *P. brachyurus* que a abamectina.

Derikvand; Bazgir e Mirzaei-Najafgholi (2018), em estudo objetivando avaliar os efeitos controladores de agentes biológicos *T. harzianum*, *T. virens*, *B. subtilis* e *Pseudomonas fluorescence*, em condições de laboratório e casa de vegetação, sobre bactérias da requeima do feijoeiro (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*), constataram que o uso de agentes biológicos pode reduzir, em grande medida, a incidência da doença da requeima do feijoeiro, podendo ser utilizado como método eficiente e ecologicamente correto. Os resultados mostraram que a combinação entre agentes biológicos reduziu até 79,4% os sintomas da doença.

Em relação aos dados morfométricos analisados, não houve diferenças significativas entre tratamentos em relação à massa seca e massa fresca das raízes e parte aérea das plantas de soja analisadas (Tabela 3).

Tabela 4. Massa fresca (MV) e massa seca (MS) das raízes e parte aérea de plantas de soja avaliadas em condições de casa de vegetação envolvendo o fungo *T. asperellum* e as bactérias *B. subtilis* e *B. methylotrophicus*, isoladamente e em interação.

Tratamentos	Raiz		Parte Aérea	
	MV	MS	MV	MS
Testemunha	38,00	12,81	21,36	10,27
<i>B. subtilis</i>	30,24	11,79	27,16	10,65
<i>B. methylotrophicus</i>	37,93	11,82	26,05	11,34
<i>T. asperellum</i>	24,59	8,62	21,97	10,31
<i>B. subtilis</i> + <i>T. asperellum</i>	23,97	8,18	21,06	9,65
<i>B. methylotrophicus</i> + <i>T. asperellum</i>	30,51	9,81	25,32	10,91
Média	30,87	10,51	23,82	10,52
CV (%)	25,06	28,08	27,22	13,86

Confirmando partes dos resultados, Santos *et al.* (2019) observaram que os tratamentos de biocontrole utilizados, como, por exemplo, o *Trichoderma*, não apresentaram efeitos significativos de aumento da massa seca de parte aérea das plantas de soja, no entanto, tal tratamento influenciou no incremento de massa fresca da raiz das plantas de soja. Acredita-se que a aplicação de agentes de biocontrole no manejo de patógenos só surgirá efeito favorável por parte das plantas quando houver capacidade de o isolado interagir com o hospedeiro (KERRY & BOURNE, 2002).

Costa *et al.* (2019), avaliando o efeito de diferentes concentrações de inoculantes à base de *B. subtilis* no desenvolvimento inicial das variedades comerciais de soja M8210 e TMG132, observaram que a variedade TMG132 apresentou incremento na massa fresca da parte aérea após 30 dias da semeadura e no volume de raízes aos 45 dias após a semeadura em razão da inoculação, via tratamento de sementes, com *B. subtilis*, enquanto a variedade M8210 não obteve incrementos em nenhuma das variáveis analisadas, reforçando os resultados encontrados no presente estudo.

Sendo assim, observou-se que, neste estudo, a interação entre os gêneros *Bacillus* e *Trichoderma*, apesar de não promover ganhos na massa seca e massa fresca das raízes e na parte aérea das plantas de soja, mostrou-se promissora em razão dos resultados observados na análise microbiológica de fungos e bactérias, especialmente na avaliação feita a partir do

sétimo dia. Considerando a quantidade de esporos viáveis, a interação entre *B. subtilis* + *T. asperellum* apresentou melhores resultados do que *B. methylotrophicus* + *T. asperellum*.

5. CONCLUSÃO

A interação entre os gêneros *Bacillus subtilis* e *Trichoderma asperellum* mostrou potencial para utilização conjunta no controle biológico de doenças em soja, com potencial efeito sinérgico. Já a interação entre *Bacillus methylotrophicus* e *Trichoderma asperellum* apresentou redução dos esporos viáveis, o que indica possibilidade de efeito antagônico na utilização conjunta desses microrganismos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abo-Eldahab, M.K.; El-Goorani, M.A. 1964.** Antagonistic Effect of a *Bacillus subtilis* Strain upon *Erwinia amylovora*. *Phytopathological Notes*, v. 54, p. 1285-1286.
- Alcebiádes, M.L., L.G. Galdino, E.J.N. Cnossen, J. Sodr e Filho, G.C.S. Alves. 2019.** Utiliza o de método químico e biológico no manejo de *Meloidogyne javanica* na cultura de soja sob cultivo protegido. *Enciclopédia Biosfera*. 16(30): 630-639.
- Alfenas, A.C & R.G. Mafia. 2007.** Métodos em fitopatologia. UFV. 151-152p.
- Almeida, J.A., J.C. Souza, F.G. Araújo. 2016.** Tratamento de sementes com abamectina e *Paecilomyces lilacinus* no manejo de *Heterodera glycines* na cultura da soja. *Multi-Science Journal*, 1(4): 62-65.
- Asaka, O.; Shoda, M. 1996.** Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14. *Applied and environmental microbiology*, v. 62, n. 11, p. 4081-4085.
- Barbosa, J.Z., R. Consalter, F.M. Vezzani, A.C.V. Motta. 2015.** Bactérias e fungos benéficos na endosfera das plantas. *Revista Agrogeoambiental*. 7(3): 99-116.
- Barbosa, R.T., T.S.A. Monteiro, R.R. Coutinho, J.G. Silva, L.G. Freitas. 2019.** *Pochonia chlamydosporia* no controle do nematoide de galhas em bananeira. *Nematropica* 49:99-106.
- Bhattacharyya, P.N., M.P. Goswami, L.H. Bhattacharyya. 2016.** Perspective of beneficial microbes in agriculture under changing climatic scenario: A review. *Journal of Phytology*. 8: 26-41.
- Bavaresco, L.G., L.M. Guaberto, F.F. Araujo. 2020.** Interaction of *Bacillus subtilis* with resistant and susceptible tomato (*Solanum lycopersicum* L.) in the control of *Meloidogyne incognita*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. 53: 1-16.
- Bettiol, W. et al.** Avalia o da qualidade de produtos   base de *Trichoderma*. Embrapa Meio Ambiente, 2012. Disponível em: <http://www.cnpma.embrapa.br/down_site/forum/2012/trichoderma/Apostila_Trichoderma_2012.pdf>. Acesso em: 10 de out. 2019.
- Bortolini, G.L, V.D. Araújo, F. D. Zavislak, J. Romano-Junior, W. Krause. 2013.** Controle de *Pratylenchus brachyurus* via tratamento de semente de soja. *Enciclopédia Biosfera*. 9: 818-830.
- Braga Junior, G.M., A.F. Chagas Junior, L.F.B. Chagas, M.R. Carvalho Filho, L.O. Miller, G.R. Santos. 2017.** Controle biológico de fitopatógenos por *Bacillus subtilis* *in vitro*. *Biota Amazônia*. 7(3): 45-41.
- Chowdappa, P., S.P.M. Kumar, M.J. Lakshmi, K.K. Upreti. 2013.** Growth stimulation and induction of systemic resistance in tomato against early and late blight by *Bacillus subtilis* OTPB1 or *Trichoderma harzianum* OTPB3. *Biological Control*. 65(1): 109-117.

- CONAB - Companhia Nacional De Abastecimento. 2020.** Acompanhamento da safra brasileira de grãos 2019/2020: 12º levantamento. 7(12): 68p. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos>>. Acesso em: 15 fev. 2020.
- CONAB - Companhia Nacional De Abastecimento. 2021.** Acompanhamento da safra brasileira de grãos 2020/2021: 5º levantamento. 8(5): 95p. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos>>. Acesso em: 15 fev. 2020.
- Costa, L.C., R.F.R. Tavanti, T.R. Tavanti, C.S. Pereira. 2019.** Desenvolvimento de cultivares de soja após inoculação de estirpes de *Bacillus subtilis*. 7(2): 126-132.
- Derikvand, F., E. Bazgir, H. Mirzaei-Najafgholi. 2018.** Effect of fungal and bacterial biological agent against bean common blight caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *Phaseoli*.
- Dias, W.P., J.F.V. Silva, A. Garcia & G.E.S. Carneiro. 2010.** Nematoides em Soja: Identificação e Controle. Comunicado Técnico 76, Embrapa Soja, Londrina, abril. 8 p.
- Eapen, S.J., B. Beena & K.V. Ramana. 2005.** Tropical soil microflora of spice-based cropping systems as potential antagonists of root-knot nematodes. Journal of Invertebrate Pathology. 3:218-225.
- Embrapa Soja. 2021.** Soja em números (safra 2019/20). Disponível em: <<https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>>. Acesso em: 10 fev. 2021.
- Ferreira, R.J. 2015.** Espécies de *Bacillus* no controle de *Meloidogyne incognita* e *Meloidogyne javanica in vitro* e na cana-de-açúcar. Dissertação de mestrado, UNESP, Jaboticabal, 59p.
- Fonseca, W.L., F.A. Almeida, M.L.T. Leite, A.M. Oliveira, J.T. Prochnow, L.L. Ramos, T.P. Rambo, F. Alcântara Neto, F.F. Pereira, R.M. Carvalho. 2018.** Influência de manipueira sobre *Meloidogyne javanica* na soja. Revista de Ciências Agrárias. 41(1): 182-192.
- Heling, A.L., O.J. Kuhn, J.R. Stangarlin, N.P. Henkemeier, S. Coltro-Roncato, E.D.V. Gonçalves. 2017.** Controle biológico de antracnose em pós-colheita de banana “Maçã” com *Saccharomyces* spp. Summa Phytopathologica. 43(1): 49-51.
- Izquierdo-García, L.F., A. González-Almario, A.M. Cotes, C.A. Moreno-Velandia. 2020.** *Trichoderma virens* GI006 and *Bacillus velezensis* Bs006: a compatible interaction controlling Fusarium wilt of cape gooseberry. Scientific reports, 10(1), 1-13.
- Kath, J., C.R. Dias-Arieira, J.C.A. Ferreira, J.A. Homiak, C.R. Silva, C.R. Cardoso. 2017.** Control of *Pratylenchus brachyurus* in soybean with *Trichoderma* spp. and resistance inducers. Journal of Phytopathology. 165(11-12): 791–799.
- Kerry, B.R., Bourne, J.M. 2002.** A manual for research on *Verticillium chlamydosporium*, a potential biological control agent for root-knot nematodes. Gent: International Organization for Biological and Integrated Control for Noxious Animals and Plants, 84 p.

- Kipngeno, P., T. Losenge, N. Maina, E. Kahangi, P. Juma. 2015.** Efficacy of *Bacillus subtilis* and *Trichoderma asperellum* against *Pythium aphanidermatum* in tomatoes. *Biological Control*. 90: 92-95.
- Kupper, K.C.; Cervantes, A.L.L.; Klein, M.N.; Silva, A. C. da. 2013.** Avaliação de microrganismos antagonísticos, *Saccharomyces cerevisiae* e *Bacillus subtilis* para o controle de *Penicillium digitatum*. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 47(3):425-436.
- Lutz, M.P., S. Wenger, M. Maurhofer, G. Defago, B. Duffy. 2004.** Signaling between bacterial and fungal biocontrol agents in a strain mixture. *FEMS Microbiology Ecology*. 48(3): 447-455.
- Machado, A.C.Z., P.M. Amaro, S.A. Silva. 2019.** Two novel potential pathogens for soybean. *PloS One*. 14(8): e0221416.
- Machado, A.P., M.J.N. Costa. 2017.** Biocontrole do fitonematoide *Pratylenchus brachyurus* *in vitro* e na soja em casa de vegetação por *Bacillus subtilis*. *Revista Biociências*. 23(1): 83-94.
- Maketon, M., J. Apisitsantikul, C. Siriraweeikul. 2008.** Greenhouse evaluation of *Bacillus subtilis* AP-01 and *Trichoderma harzianum* AP-001 in controlling tobacco diseases. *Brazilian Journal of Microbiology*. 39(2): 296-300.
- Mauricio Filho, J., C.H.S. Silva, J.E.B. Souza. 2018.** Desempenho agrônômico e produtividade da cultura da soja com a coinoculação de *Bradyrhizobium* e *Azospirillum brasilense*. *Ipê Agronomic Journal*. 2(2): 48-59.
- Mazzuchelli, R.C.L., E.H.L. Mazzuchelli, F.F. Araujo. 2020.** Efficiency of *Bacillus subtilis* for root-knot and lesion nematodes management in sugarcane. *Biological Control*. 143 (104185): 1-6.
- Miao, G., J. Han, Z. Zhang, S. Wang, C. Wang. 2019.** Protection of melon against *Fusarium* wilt-root knot nematode complex by endophytic fungi *Penicillium brefeldianum* HS-1. *Symbiosis*. 77: 83-39.
- Monnerat, R., S.C.L. Montalvão, E.S. Martins, P.R. Queiroz, E.Y.Y. Silva, A.R.M. Garcia, M.T. Castro, G.T. Rocha, A.D.C.L. Ferreira, A.C.M.M. Gomes. 2020.** Manual de produção e controle de qualidade de produtos biológicos à base de bactérias do gênero *Bacillus* para uso na agricultura. Documentos 369, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, maio. 47 p.
- Morsy, E.M., K.A. Abdel-Kawi, M.N.A. Khalil. 2009.** Efficiency of *Trichoderma viride* and *Bacillus subtilis* as biocontrol agents gainst *Fusarium solani* on tomato plants. *Egyptian Journal of Phytopathology*. 37(1): 47-57.
- Mukhtar, T., M. Tariq-Khan, M.N. Aslam. 2021.** Bioefficacy of *Trichoderma* Species Against Javanese Root-Knot Nematode, *Meloidogyne javanica*, in Green Gram. *Gesunde Pflanzen*. 1: 1-8.
- Nguyen, L.T.T., J.Y. Jang, T.Y. Kim, N.H. Yu, A.R. Park, S. Lee, C. Bae, J.H. Yeo, J. Hur, H.W. Park, J. Kim. 2018.** Nematicidal activity of verrucarín A and roridin A isolated

from *Myrothecium verrucaria* against *Meloidogyne incognita*. Pesticide Biochemistry and Physiology. 148: 133-143.

Oliveira, C.M., N.O. Almeida, M.V.C.B. Côrtes, M. Lobo Júnior, M.R. Rocha, C.J. Ulhoa. 2021. Biological control of *Pratylenchus brachyurus* with isolates of *Trichoderma* spp. on soybean. Biological Control. 152: 104425.

Oliveira, C.M.G, M.A. Santos, L.H.S. Castro. 2016. In: Importância dos fitonematoides na agricultura. Diagnose de Fitonematoides. Campinas, sp, Millennium Editora, 5:1-10.

Oliveira, F.H.P.C. 2006. Fisiologia de *Bacillus subtilis* R14: crescimento e produção de lipopeptídeos em cultivos descontínuos. Dissertação de mestrado, UFPE, Recife, 83p.

Oliveira, G.R.F., M.S. Silva, S.L. Proença, J.W. Bossolani, J.A. Camargo, F.S. Franco, M.E. Sá. 2017. Influência do *Bacillus subtilis* no controle biológico de nematoides e aspectos produtivos do feijoeiro. Brazilian Journal of Biosystems Engineering. 11(1): 47-58.

Oliveira, K.C.L., D.V. Araújo, A.C. Meneses, J.M. Silva, R.L.C. Tavares. 2019. Biological management of *Pratylenchus brachyurus* in soybean crops. Revista Caatinga. 32(1): 41-51.

Ortiz, E.M., J. Duchicela, A. Debut. 2018. Scanning electron microscopic observations of early stages of interaction of *Trichoderma harzianum*, *Gliocladium virens* and *Bacillus subtilis* with *Acaulospora colombiana*. Revista Argentina de Microbiología. 50(2): 227-229.

Pocurull, M., A.M. Fullana, M. Ferro, P. Valero, N. Escudero, E. Saus, T. Gabaldón, F.J. Sorribas. 2020. Commercial formulations of *Trichoderma* induce systemic plant resistance to *Meloidogyne incognita* in tomato and the effect is additive to that of the Mi-1.2 resistance gene. Frontiers in microbiology. 3042(10): 1-10.

Poveda, J., P. Abril-Urias, C. Escobar. 2020. Biological control of plant-parasitic nematodes by filamentous fungi inducers of resistance: *Trichoderma*, mycorrhizal and endophytic fungi. Frontiers in Microbiology. 11(992): 1-14.

Ribeiro, N. T., A.V.M. Resende, E. L. Araújo & A.V. Pomella. 2013. Potencial nematicida de *Bacillus subtilis* e *Paecilomyces lilacinum* na cultura do Quiabo (*Abelmoschus esculentus*). Décimo Terceiro Sincobiol. Bonito, Mato Grosso do Sul.

Rufino, C.P.B., C.S. Araújo, S.R. Nogueira. 2018. Desafios na utilização do controle biológico de doenças de plantas na Amazônia. South American Journal of Basic Education, Technical and Technological. 5(1): 248-262.

Santos, A.R.B., Almeida, F.A., Leite, M.L.T., Fonseca, W.L., Alcântara Neto, F., Pereira, F.F., Carvalho, R.M., Barreto, A.F., Santos, T.S. 2019. Biocontrole no manejo de *Pratylenchus brachyurus* na soja. Revista de Ciências Agrárias. 42(3): 776-785.

Shanmugam, V., S. Gupta, N.P. Dohroo. 2013. Selection of a compatible biocontrol strain mixture based on co-cultivation to control rhizome rot of ginger. Crop Protection. 43(1): 119-127.

Sharma, S., M. Kaur, R. Goyal, B.S. Gill. 2011. Physical characteristics and nutritional composition of some new soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) genotypes. *Journal of Food Science and Technology*. 51(3): 551–557.

Sikandar, A., M. Zhang, Y. Wang, X. Zhu, X. Liu, H. Fan, Y. Xuan, L. Chen, Y. Duan. 2020. In vitro evaluation of *Penicillium chrysogenum* Snef1216 against *Meloidogyne incognita* (root-knot nematode). *Scientific Reports*. 10(8342).

Silva, J.B., J.S.B. Oliveira, C.J.B. Ferreira, A.J.S. Solino, K.R.F. Schwan-Estrada. 2021. Biofertilizante de esterco bovino na indução de mecanismos de defesa à *Meloidogyne incognita* na cultura da soja. *Acta Ambiental Catarinense*. 18(1): 181-195.

Silva, M.S.B.S., A.A.C. Rodrigues, L.J.M.G. Oliveira, E.K.C. Silva, T.S. Pereira. 2014. Sanidade de sementes de arroz, biocontrole, caracterização e transmissão de *Curvularia lunata* em semente-plântula de arroz. *Revista Ceres*. 61(4): 511-517.

Silva, R.A., N.A. Nunes, T.F.S. Santos, F.K. Iwano. 2018. Efeito da rotação e sucessão de culturas no manejo de nematoides da soja em área arenosa. *Nematropica*. 48: 198-206.

Sikora, R.A., E. Fernandez. 2005. Nematode parasites of vegetables. *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*. 2: 319-392.

Tavanti, T.R., R.F.R. Tavanti, F.S. Galindo, I. Simões, L.S. Dameto, M.E. Sá. 2020. Yield and quality of soybean seeds inoculated with *Bacillus subtilis* strains. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*. 24(1): 65-71

Tolardo, A.L., G.C.S. Alves, G.F. Silva, W.J. Pereira, D.Z. Silva, S.A.S. Silva. 2019. Biological control: isolated and in mixtures and genetic control of *Meloidogyne exigua* in coffee. *Coffee Science*. 14(2): 147-156.

Yasmin, H., S. Naeem, M. Bakhtawar, Z. Jabeen, A. Nosheen, R. Naz, R. Keyani, S. Mumtaz, M.N. Hassan. 2020. Halotolerant rhizobacteria *Pseudomonas pseudoalcaligenes* and *Bacillus subtilis* mediate systemic tolerance in hydroponically grown soybean (*Glycine max* L.) against salinity stress. *PLoS One*. 15(4): e0231348.

Yobo, K.S., M.D. Laing, C.H. Hunter. 2011. Effects of single and combined inoculations of selected *Trichoderma* and *Bacillus* isolates on growth of dry bean and biological control of *Rhizoctonia solani* damping-off. *African Journal of Biotechnology*. 10(44): 8746-8756.