



# UNIVERSIDADE DE ÉVORA

**Escola de Ciências e Tecnologia**

**Departamento de Química**

**Curso de Licenciatura de Bioquímica**

Avaliação do potencial nematocida de *Bacillus* spp. no nemátode das lesões  
radiculares *Pratylenchus penetrans*

**Relatório de estágio**

**Realizado por:** Teresa Monteiro

**Orientador:** Doutora Cláudia Vicente

Doutora Margarida Espada

**Évora**

**2022**



# UNIVERSIDADE DE ÉVORA

**Escola de Ciências e Tecnologia**

**Departamento de Química**

**Curso de Licenciatura de Bioquímica**

Avaliação do potencial nematocida de *Bacillus* spp. no nemátode das lesões radiculares *Pratylenchus penetrans*

**Relatório de estágio**

**Realizado por:** Teresa Monteiro

**Orientador:** Doutora Cláudia Vicente

Doutora Margarida Espada

**Évora**

**2022**

**“Este trabalho não inclui as observações do júri”**

## **Agradecimentos**

Primeiramente gostava de agradecer à Universidade de Évora pela experiência académica, com todos os conhecimentos adquiridos, tornando assim esta etapa numa experiência memorável e enriquecedora da qual levarei aprendizagens para o mundo de trabalho.

Em seguida, quero agradecer às minhas orientadoras, a Doutora Cláudia Vicente e Doutora Margarida Espada pelos conhecimentos transmitidos e por me terem dado uma noção do que é trabalhar em investigação, mas também pela enorme disponibilidade que ofereceram, boa disposição, apoio e orientação ao longo da realização do estágio. Foi um privilégio ter tido a oportunidade de trabalhar com um grupo de pessoas excecionais não só em sentido profissional como também na forma como me acolheram, fazendo-me sentir parte da equipa.

Ao laboratório de Nematologia (NemaLab), sediado no Pólo da Mitra, ao Projeto PratyOmics, à Universidade de Évora, nomeadamente ao departamento de Química da ECT, pela cedência do espaço, equipamentos e financiamento que proporcionaram a realização deste trabalho.

À minha família pelo apoio, carinho, por terem contribuído para a minha educação e crescimento, mas também por nunca terem duvidado das minhas capacidades.

Finalmente aos meus amigos, tanto os que me acompanham desde criança como também aos que fiz nestes últimos 3 anos, não só pelas experiências vivenciadas em conjunto, como também pelo apoio e compreensão que tornaram esta jornada mais fácil.

Índice	
Agradecimentos.....	iii
Índice de Figuras .....	vi
Índice de Tabelas .....	vii
Índice de Gráficos.....	viii
Abreviaturas.....	ix
Resumo.....	x
Palavras-chave.....	x
Abstract.....	xi
Keywords.....	xi
1. Fundamento teórico.....	12
1.1 Nemátodes fitoparasitas .....	12
1.2 O nemátode das lesões radiculares <i>Pratylenchus penetrans</i> .....	12
1.3 Controlo de nemátodes fitoparasitas.....	14
1.3.1 Biocontrolo de nemátodes fitoparasitas: o uso de bactérias como agentes antagonistas .....	15
1.3.1.1 <i>Bacillus</i> spp. como agentes nematodocidas e o seu modo de ação .....	16
2. Problema e Objetivos .....	18
2.1 Problema.....	18
2.2 Objetivos gerais .....	18
2.3 Objetivos específicos.....	19
3. Metodologia .....	20
3.1 Estratégia .....	20
3.2. Procedimento experimental.....	21
3.2.1 Preparação e crescimento de uma coleção de <i>Bacillus</i> .....	21
3.2.1.1 Preparação do meio de cultura .....	21
3.2.1.2 Obtenção de culturas puras de <i>Bacillus</i> spp. ....	21
3.2.2. Identificação taxonómica por sequenciação do gene 16S rRNA.....	21
3.2.2.1 Extração de DNA.....	21

3.2.2.2. Amplificação do gene 16S rRNA por PCR .....	22
3.2.2.3 Eletroforese em gel de agarose .....	23
3.2.2.4 Purificação do produto de PCR e sequenciação .....	24
3.2.2.5 Análise de sequências e filogenia .....	24
3.2.3 Ensaio de avaliação do potencial nematodocida da coleção de <i>Bacillus</i> ....	25
3.2.3.1 Preparação da cultura de <i>Pratylenchus penetrans</i> .....	25
3.2.3.2 Preparação dos extratos bacterianos .....	26
3.2.3.3 Ensaio de ação nematodocida .....	27
3.2.3.4 Análise dos dados .....	28
3.3. Equipamento .....	29
3.4. Reagentes.....	29
3.5. Diagrama do trabalho .....	30
4. Resultados e Discussão .....	31
4.1. Amplificação do gene 16S por PCR .....	31
4.2. Análise das sequências e filogenia .....	31
4.3. Ensaio de ação nematodocida.....	33
5. Conclusões .....	39
6. Referências Bibliográficas.....	40
ANEXOS.....	45
ANEXO 1 - Quantificação do gDNA.....	46
ANEXO 2 - Percentagem de identidade entre as sequências.....	47
ANEXO 3 - MC controle.....	49

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Os diferentes estágios de vida do nemátode das lesões radiculares <i>Pratylenchus penetrans</i> : ovo (a), juvenil (b), fêmea (c) e macho (d) adultos. Imagem de Jon Eisenback©.....	13
<b>Figura 2.</b> Ciclo de vida dos nemátodes das lesões radiculares. Adaptado de Jones and Fosu-Nyarko (2014).....	14
<b>Figura 3.</b> Cultura de <i>Pratylenchus penetrans</i> isolado A44L4: A- Na estufa com humidade controlada; B- Disco de cenoura onde é possível observar as necroses provocadas pelo nemátode; .....	26
<b>Figura 4.</b> Preparação dos extratos bacterianos para avaliação nematocida em <i>Pratylenchus penetrans</i> . .....	27
<b>Figura 5.</b> Ensaio <i>in vitro</i> para avaliação nematocida de <i>Bacillus</i> sp.: A- Lisados; B- Filtrados; .....	27
<b>Figura 6.</b> Amplificação do gene 16S rRNA por PCR analisados por eletroforese em gel de agarose. As amostras foram: 1 - 13C9, 2- 14M3; 3 - 14C26, 4 - 14C28, 5 -4810, 6 - 13C18, 7-14C2, 8 - 13C43, 9 -4809, 10 - MARNR01, B - controlo negativo (sem DNA). .....	31
<b>Figura 7.</b> Árvore filogenética dos <i>Bacillus</i> sp. em estudo obtida através do método Neighbourhood Joining com o modelo Kimura 2-parâmetros. Representação gráfica obtida na plataforma iTOL. O tamanho do fragmento utilizado foi de 1Kb. ....	34
<b>Figura 8.</b> Avaliação da ação nematocida de <i>Bacillus</i> sp. em <i>Pratylenchus penetrans</i> . (A) nemátodes no poço do controlo negativo (Pp) no início do ensaio; e após 24h (B). .....	35

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Bactérias PGPR como biocontrolo de nemátodes fitoparasitas e os seus modos de ação. Adaptado de Ahmad et al. (2021) .....	17
<b>Tabela 2.</b> Composição da reação para ampliação por PCR do gene 16S rRNA.....	23
<b>Tabela 3.</b> Esquema da placa para Filtrados/Lisados .....	28
<b>Tabela 4.</b> Identificação taxonómica dos isolados de Bacillus utilizados neste trabalho .....	32

## Índice de Gráficos

<b>Gráfico 1.</b> Análise da mortalidade dos nemátodes: Lisados 24h. ....	35
<b>Gráfico 2.</b> Análise da mortalidade corrigida (Mc) de <i>Pratylenchus penetrans</i> por ação dos diferentes isolados de <i>Bacillus</i> . (A) Mc calculada com o controlo Pp; (B) Mc calculada com o controlo Pp + TSB. As barras das colunas representam o erro padrão. ....	36



## Abreviaturas

cm	Centímetros
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDB	Brometo de etileno
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
gDNA	DNA genómico
h	Horas
H <sub>2</sub> O	Água
ISR	Resistência sistémica induzida
LB	Luria Bertani
min	Minutos
mL	Mililitros
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	RNA ribossómico
rpm	Rotações por minuto
PCR	Polymerase Chain Reaction
PGPR	Plant Growth Promoting Rhizobacteria
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TBE	Tris-Borate-EDTA
TSB	Trypic soy broth
UV	Ultravioleta
V	Volts
VOC	Compostos orgânicos voláteis
µL	Microlitros

## Resumo

O nemátode das lesões radiculares *Pratylenchus penetrans* é uma das espécies mais problemáticas deste grupo de nemátodes fitoparasitas, e encontra-se distribuída por todo o mundo. O uso de pesticidas é o principal sistema de proteção de culturas agrícolas utilizado para controlar os danos originados por estes parasitas. No entanto, o biocontrolo tem-se mostrado um método alternativo bastante eficaz. A contínua restrição do uso da maior parte dos pesticidas e ainda a procura de uma estratégia menos agressiva a nível ambiental demonstraram que existem agentes biológicos com potencial nematodocida, nomeadamente bactérias do género *Bacillus*, possíveis de integrar nas medidas de controlo dos nemátodes fitoparasitas. Neste contexto, o objetivo principal deste trabalho consistiu no estudo do potencial nematodocida de bactérias do género *Bacillus* no nemátode das lesões radiculares *P. penetrans*. Para atingir esta finalidade foram utilizadas metodologias em diversas áreas científicas: i) Microbiologia, como a preparação de meios de cultura sólidos e líquidos, obtenção de culturas puras de bactérias, crescimento de bactérias em meio líquido, e obtenção de extratos bacterianos por lise (lisados) e por filtração (filtrados); ii) Biologia molecular, como a extração, quantificação de gDNA, amplificação do gene 16S rRNA por PCR e posterior sequenciação Sanger; iii) Análise bioinformática de sequências para a construção de uma árvore filogenética; e iv) Nematologia, extração e quantificação de nemátodes e ensaios *in vitro* de lisados e filtrados bacterianos para avaliar o potencial nematodocida. Pela análise do gene marcador 16S rRNA foi possível identificar taxonomicamente alguns dos isolados estudados: o isolado MABNRO1 como *Priestia aryabhatai*, o isolado 4810 como *Cytobacillus firmus*, o isolado 14C48 como *Paenibacillus lautus* e o isolado 13C9 como *Bacillus thuringiensis*. Os restantes isolados foram identificados como pertencentes ao complexo de espécies *Bacillus subtilis*, sendo apenas referidos como *Bacillus* sp. Relativamente aos ensaios *in vitro*, observou-se que após 24h os lisados bacterianos de todos os isolados neste estudo não apresentavam qualquer efeito nematodocida no *P. penetrans*. Contudo, os filtrados bacterianos de alguns dos isolados apresentaram resultados promissores relativamente ao seu efeito nematodocida, nomeadamente o *Bacillus* sp. 14C2 e o 14C26, ambos do complexo da espécie *Bacillus subtilis*.

## Palavras-chave

*Bacillus*, Biocontrolo, Filtrados bacterianos, Lisados bacterianos, Nematodocida; Nemátodes fitoparasitas

## Abstract

The root-lesion nematode *Pratylenchus penetrans* is one of the most problematic and its distributed worldwide. The use of pesticides is the main crop protection strategy used to control the damage caused by these parasites. However, biocontrol has shown to be a highly effective method. Adding to the fact that the use of most pesticides it's restricted and the search for a less aggressive strategy at an environmental level, research shows that there are biological agents with nematicidal potential, namely bacteria from genus *Bacillus*, which can be applied in control measures of plant parasitic nematodes. The main objective of this study was to evaluate the nematicidal potential of bacteria from genus *Bacillus* in the root-lesion nematode *P. penetrans*. To achieve this purpose, techniques from the following scientific areas were used: i) Microbiology, such as the preparation of solid and liquid culture media, obtain pure culture of bacteria, culture of bacteria in liquid medium, and preparation of bacterial extracts by lysis (lysates) and by filtration (filtrates); ii) Molecular biology such as extraction, quantification and purification of gDNA, amplification of 16S rDNA gene by PCR, and subsequent Sanger sequencing; iii) Bioinformatics with sequence analysis and phylogeny; and iv) Nematology, with extraction and quantification of nematodes, and *in vitro* assays to evaluate the nematocidal potential of bacteria from genus *Bacillus*.

From the 16S rRNA marker it was possible to taxonomically identify some of the isolates studied: the isolate MABNRO1 as *Priestia aryabhatai*, the isolate 4810 as *Cytobacillus firmus*, the isolate 14C48 as *Paenibacillus lautus* and the isolate 13C9 as *Bacillus thuringiensis*. The other isolates were identified as belonging to the *Bacillus subtilis* species complex and are referred as *Bacillus* sp. Regarding the *in vitro* assays, it was observed that after 24h the bacterial lysates of all isolates did not have any nematicidal effect on *P. penetrans*. However, the bacterial filtrates of some of the isolates showed promising results regarding their nematicidal effect, namely *Bacillus* sp. 14C2 and 14C26, both from the *Bacillus subtilis* species complex.

## Keywords

*Bacillus*, biocontrol, bacterial filtrates, bacterial lysates, nematocide, plant-parasitic nematodes.

# 1. Fundamento teórico

## 1.1 Nemátodes fitoparasitas

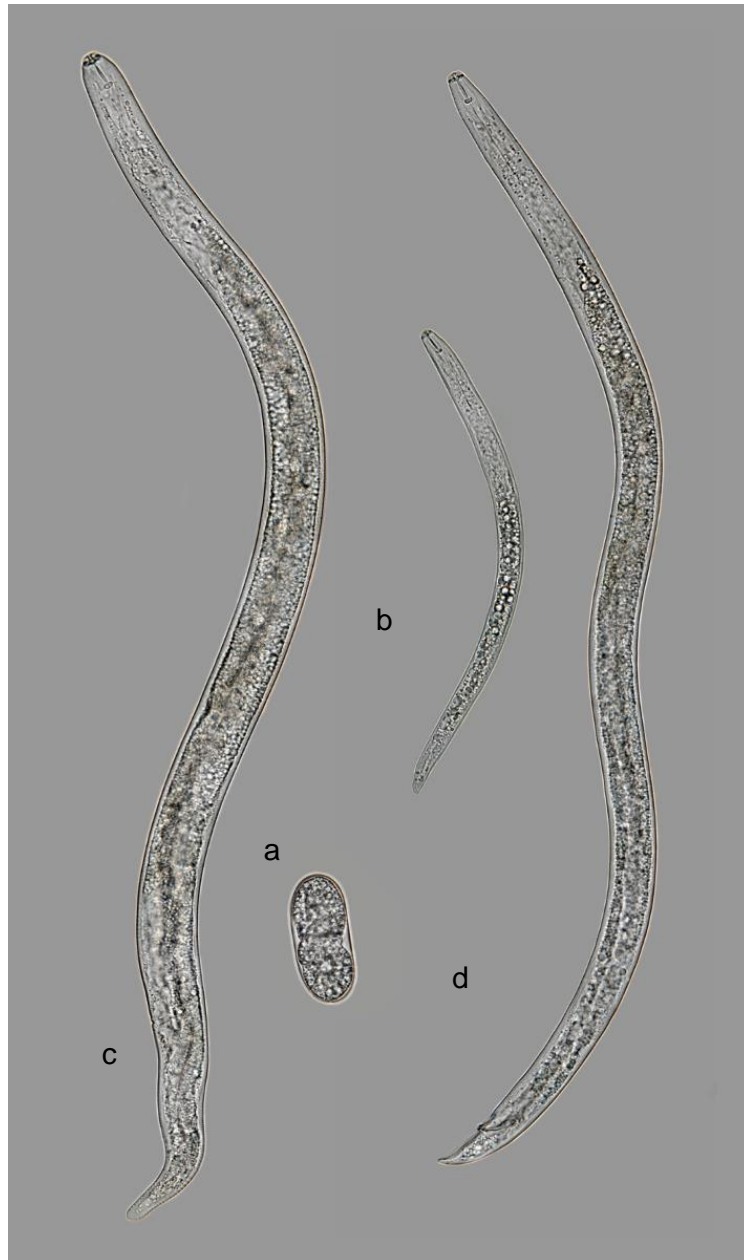
Considerados os animais mais abundantes da terra, os nemátodes (Animalia, Nematoda) são seres eucariotas microscópicos de forma alongada e de aparência vermiforme, com diferentes estilos de vida (bacteriófagos, micófagos, herbívoros, omnívoros e predadores) sendo a sua forma mais comum a vida livre (van den Hoogen et al., 2019). Os nemátodes fitoparasitas estão amplamente distribuídos pela natureza e podem causar graves perdas de produtividade, e consequentes danos económicos, em numerosas culturas agrícolas e florestais (Palomares-Rius et al., 2017). Estes nemátodes diferenciam-se dos restantes pela presença de um estilete, estrutura utilizada para penetrar nos tecidos vegetais, para alimentação (retirando assim os nutrientes do conteúdo celular) e igualmente para libertar secreções esofágicas envolvidas no processo de parasitismo dos mesmos (Kumar et al., 2021). A maioria destes atacam o sistema radicular das plantas, provocando deformações nas raízes e clorose nas folhas. Os danos radiculares promovem também a entrada de outros agentes patogénicos, contribuindo para o aparecimento de outras doenças nas plantas afetadas (Castillo and Volvas., 2007).

## 1.2 O nemátode das lesões radiculares *Pratylenchus penetrans*

Os nemátodes das lesões radiculares, do género *Pratylenchus*, caracterizam-se por provocarem lesões nas raízes da planta hospedeira para alimentação. Estas lesões são reconhecidas pelo aspeto necrótico das raízes, com tons acastanhados, diminuição da parte radicular e consequente redução da parte aérea da planta. Os danos radiculares podem ainda levar a infeções secundárias por fungos e bactérias do solo (Fosu-Nyarko et al., 2016). Por serem endoparasitas migratórios, as evidências da sua existência nos hospedeiros são subtis, comparado com infeções por outros parasitas. No entanto são um dos maiores grupos de fitoparasitas de culturas agrícolas com importância económica (Jones et al., 2013; Fosu-Nyarko et al., 2016).

O *Pratylenchus penetrans* é uma espécie pertencente ao grupo dos nemátodes das lesões radiculares (Figura 1), que entra na raiz do hospedeiro alimentando-se e reproduzindo-se (normalmente por reprodução sexuada) dentro dos tecidos. Pode ser encontrado no solo quando o hospedeiro está doente, stressado, a envelhecer ou ainda no campo lavrado depois da colheita do hospedeiro (Vicente et al., 2021). É um organismo poiquilotérmico sendo o desenvolvimento dos seus processos fisiológicos

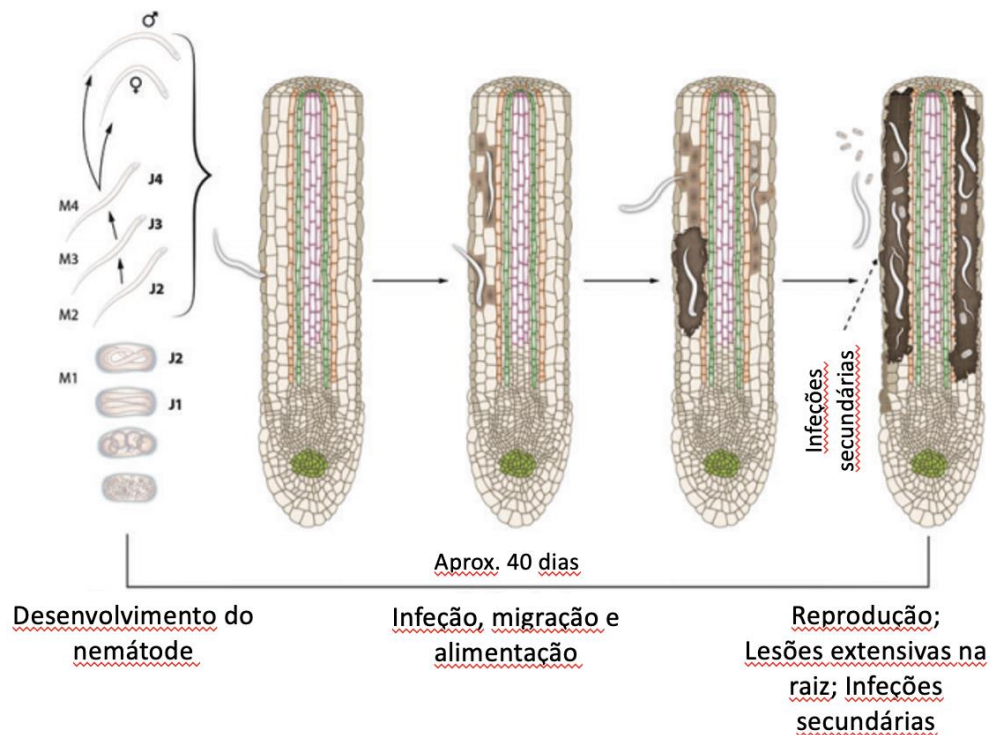
influenciado pela temperatura, como por exemplo: crescimento e reprodução, determinação sexual e expressão de danos nas plantas (Freckman and Caswell, 1985). Esta espécie distingue-se de outras do mesmo género pelo comprimento do corpo e do estilete, número de annuli, estrutura labial, posição da vulva, forma de espermateca e terminação da cauda (Castillo and Vovlas, 2007).



**Figura 1.** Os diferentes estágios de vida do nemátode das lesões radiculares *Pratylenchus penetrans*: ovo (a), juvenil (b), fêmea (c) e macho (d) adultos. Imagem de Jon Eisenback©

O ciclo de vida deste parasita tem, em média, duração de 3-8 semanas e durante esse tempo o mesmo passa por 6 estágios diferentes: ovo, 4 estágios juvenis (J1, J2, J3 e J4) e o estágio adulto (macho ou fêmea) (Figura 2) (Stirling *et al*, 1991). A fêmea põe ovos em pequenos grupos nas raízes hospedeiras ou no solo perto das mesmas; por volta do estágio J2, saem do ovo e migram para dentro das raízes (caso não estejam já

no seu interior), para se alimentarem e reproduzirem-se por partenogênese (Castillo and Vovlas, 2007).



**Figura 2.** Ciclo de vida dos nemátodes das lesões radiculares. Adaptado de Jones and Fosu-Nyarko (2014).

O *P. penetrans* está amplamente distribuído pelo mundo, estando presente em todos os continentes menos na Antártida (Castillo and Vovlas, 2007). Tem também uma grande variedade de hospedeiros, desde raízes de batatas até raízes de árvores de fruto, conseqüentemente, é difícil encontrar alternativas resistentes a este parasita (Castillo and Vovlas, 2007). No entanto, algum dos seus inimigos são: *Bacillus thuringiensis*, *Streptomyces*, *Dactylella lysipaga*, *Hypocrea rufa*, *Pasteuria penetrans*, *Phorocera assimilis* e *Pseudomonas chlororaphis* (Castillo and Vovlas, 2007). Os equipamentos agrícolas e calçado enlameado podem ser veículos de contaminação do solo tal como os lençóis de água, podendo dispersar a longas distâncias o *P. penetrans* (Morgan et al, 2002). Assim pode-se afirmar que a estratégia de controlo deste parasita pode começar na limpeza dos equipamentos utilizados para o cultivo dos campos.

### 1.3 Controlo de nemátodes fitoparasitas

O uso de pesticidas químicos, agroquímicos, é o principal método de proteção de culturas agrícolas utilizado para diminuir/controlar os danos originados pelos

nemátodes (Chitwood *et al*, 2002). De modo geral, os nemátodes fitoparasitas podem ser controlados com fumigantes de solo ou pesticidas não-fumigantes. Os pesticidas fumigantes são normalmente químicos líquidos que são vaporizados em forma de gás sob o solo, sendo absorvido pelos poros do mesmo (Whitehead *et al*, 1998). Desta categoria, destacam-se o Dazomet, 1,3-D, EDB, bromometano e cloropicrina. Os pesticidas não fumigantes são essencialmente constituídos por organofosfatos ou carbamatos sendo o aldicarb, carbofurano, disufoton, etoprofós e Vydate (oxamil) (Rich *et al*, 2004). No entanto, a utilização destes pesticidas a nível global é proibida devido ao impacto prejudicial que as toxinas libertadas têm na saúde humana e no ambiente (Chitwood *et al*, 2002).

### **1.3.1 Biocontrolo de nemátodes fitoparasitas: o uso de bactérias como agentes antagonistas**

Uma vez que os nemátodes fitoparasitas atacam culturas agrícolas de interesse económico é necessário encontrar uma solução para o seu controlo que não inclua agroquímicos. A procura crescente de uma alternativa mais ecológica levou a um aumento da investigação e desenvolvimento de novos biopesticidas (Mohamed *et al*, 2018). O controlo biológico é a forma mais eficaz de reduzir o número de pragas que infetam diversas culturas, particularmente através do uso de microrganismos (Zhang *et al*, 2016). Este método pode ser produzido por fungos, bactérias ou actinomicetes que podem destruir nemátodes parasitas e alimentarem-se a partir deles, revelando assim uma forma prometedora de controlar eficazmente estes parasitas (Blyuss *et al*, 2019). Alguns destes agentes nematodocidas produzem substâncias que atuam como armadilha para atrair os nemátodes e finalmente eliminá-los. Outros servem como parasitas internos para produzir toxinas e virulência para matar os nemátodes (Ahmad *et al*. 2021).

A rizosfera, solo ao redor da raiz das plantas, é considerada uma fonte rica de microrganismos que produzem uma multiplicidade de moléculas bioativas (Gouda *et al*. 2018). Muitas rizobactérias são consideradas bactérias promotoras de crescimento de plantas (*plant growth promoting rhizobacteria*, PGPR) por, diretamente, produzirem reguladores de crescimento vegetal, aumentarem a disponibilidade de nutrientes e ainda, indiretamente, produzirem compostos com ação antagonística de outros organismos, como os nemátodes fitoparasitas, melhorando conseqüentemente o rendimento das culturas agrícolas (Abriouel *et al*. 2011). As PGPR podem também ainda ser consideradas como bactérias endófitas por colonizarem a maioria das espécies

vegetais dentro das células, nos espaços intercelulares ou no sistema vascular (Zinniel *et al*,2002). Estes microrganismos são capazes de suprimir as várias fases de crescimento e desenvolvimento dos nemátodes fitoparasitas através dos diversos modos de ação(Kumar and Dara, 2021). As bactérias e os seus metabolitos afetam tanto a comunidade vegetal como a comunidade microbiana. O efeito antagonístico direto pode ser alcançado através do parasitismo, antibiose ou competição por nutrientes ou locais de infeção. Indiretamente, as bactérias podem aumentar os mecanismos de defesa do hospedeiro provocando resistência sistémica induzida (ISR) (Migunova and Sasanelli, 2021). Através de regulação de genes que produzem várias fitohormonas, compostos orgânicos voláteis, proteínas relacionadas com a patogénese, as bactérias endófitas induzem resistência sistémica e ainda despoletam as vias metabólicas do ácido salicílico e do etileno que protegem as plantas de stress bióticos (Kumar and Dara, 2021)

#### 1.3.1.1 *Bacillus* spp. como agentes nematodíctidas e o seu modo de ação

As bactérias do género *Bacillus* são gram-positivas que constituem o género mais interessante no controlo dos nemátodes parasitas de plantas (Yu *et al*, 2015). Muitas das espécies do género *Bacillus* são também consideradas PGPRs (Ahmad *et al.*, 2021). Há um interesse particular neste género relativamente às aplicações agrícolas como bionematicidas devido à sua capacidade de colonização da rizosfera e do rápido crescimento (Horak *et al.*, 2019). Igualmente, há registos de espécies de *Bacillus* que segregam: metabolitos secundários como flavonoides, alcaloides, esteroides, fenóis, terpinóis, polipeptídeos (Aleti *et al.* 2015); enzimas lícticas como proteases, hemicelulases, celulasas, chitinases e glucanases (Kumar and Dara., 2021); e toxinas cristalinas por antibiose (característico de *B. thuringiensis*, o que faz com que este seja líder dos agentes de biocontrolo) (Migunova and Sasanelli, *et al.*, 2021). A Tabela 1 resume os principais modos de ação de algumas espécies de *Bacillus* nos principais grupos de nemátodes fitoparasitas com maior impacto económico mundial.



**Tabela 1.** Bactérias PGPR como biocontrole de nemátodes fitoparasitas e os seus modos de ação. Adaptado de Ahmad et al. (2021)

<b>Espécies PGPR</b>	<b>Nemátodes parasitas de plantas</b>	<b>Mecanismo de ação</b>
<b><i>Bacillus cereus</i></b>	<i>Heterodera avenae</i> <i>Meloidogyne javanica</i> <i>Meloidogyne incognita</i>	Produção de antibióticos Metabólitos secundários Proteases Chitinases Esfingosina ISR
<b><i>Bacillus coagulans</i></b>	<i>Meloidogyne incognita</i> <i>Heterodera glycine</i>	Enzimas hidrolíticas
<b><i>Bacillus liqueniformis</i></b>	<i>Bursaphelenchus xylophilus</i> <i>Meloidogyne incognita</i>	Protease Chitinase;
<b><i>Bacillus megaterium</i></b>	<i>Heterodera glycines</i> <i>Meloidogyne incognita</i> <i>Meloidogyne graminicola.</i>	Metabólitos secundários Proteases Antibiose
<b><i>Bacillus pumilus L1</i></b>	<i>Heterodera glycines</i> <i>Meloidogyne arenaria</i> <i>Meloidogyne incognita</i>	Protease Chitinase ISR SAR
<b><i>Bacillus subtilis</i></b>	<i>Heterodera multicinctus</i> <i>Meloidogyne graminicola</i> <i>Meloidogyne incognita</i> <i>Meloidogyne javanica</i> <i>Rotylenchus reniformis</i>	Metabólitos secundários Antibióticos Lipopéptidos Enzimas hidrolíticas
<b><i>Bacillus thuringiensis</i></b>	<i>Heterodera glycines</i> <i>Meloidogynes incognita</i>	Toxinas ( <i>bt crystal protein</i> ) Exotoxina <i>thuringiensin</i>

## 2. Problema e Objetivos

### 2.1 Problema

Os nemátodes das lesões radiculares (*e.g.*, *Pratylenchus penetrans*) ocupam o 3º lugar no ranking mundial dos nemátodes fitoparasitas que provocam mais danos na agricultura, tendo uma grande importância a nível económico (Jones *et al.*, 2013). Em Portugal é muito frequente encontrar o *P. penetrans* em plantações de batata, tendo também sido considerado o principal nemátode das lesões radiculares associado à batateira na Europa. Este parasita foi classificado em 2018 como espécie de quarentena A1 na América do Sul e, mais recentemente, a União Europeia introduziu-o na lista de pragas regulamentadas não sujeitas a quarentena A2 (regulamento EU 2016/2031) (“PM 9/1 (6) *Bursaphelenchus xylophilus* and Its Vectors: Procedures for Official Control,” 2018).

Apesar de serem um fator decisivo na proteção das culturas, a deteção prévia deste parasita e as boas práticas agrícolas não são suficientes para o seu controlo. O método tradicional de controlo de pragas recorre ao uso de agroquímicos. No entanto, estes apresentam um alto risco de contaminação ambiental sendo prejudiciais aos seres humanos e animais. Neste sentido, a União Europeia criou diretivas que regulamentam as substâncias utilizadas para eliminar, erradicar e prevenir organismos considerados prejudiciais incluindo produtos biocidas e produtos fitofarmacêuticos. Estes problemas tornam imperativo a implementação de alternativas mais eficazes como, por exemplo, o uso de bactérias como agentes de biocontrolo. Este estudo tem como principal objetivo avaliar o potencial nematodocida de *Bacillus* spp. para o controlo do nemátode das lesões radiculares *P. penetrans*. Resultados promissores no controlo deste parasita poderão contribuir para o desenvolvimento de uma nova estratégia na contenção da sua propagação.

### 2.2 Objetivos gerais

Este estágio teve como objetivo principal avaliar o potencial nematodocida de um conjunto de bactérias *Bacillus* spp. no nemátode das lesões radiculares *Pratylenchus penetrans*, utilizando técnicas de microbiologia, biologia molecular e nematologia.

## 2.3 Objetivos específicos

### Conhecer e compreender:

- A importância de controlo dos nemátodes fitoparasitas na agricultura;
- Os prejuízos agrícolas provocados pelos nemátodes das lesões radiculares;
- Os protocolos experimentais que visam a extração e purificação do gDNA das bactérias;
- O protocolo experimental para amplificação por PCR e os métodos de sequenciação para estudo da filogenia;
- O protocolo experimental *in vitro* para testar o efeito nematodocida das bactérias perante o nemátode;
- As características das bactérias que podem influenciar a mortalidade dos nemátodes;

### Dar valor:

- Ao conhecimento estudado sobre todos os procedimentos desta experiência;
- Às regras de segurança em laboratório e ao bom manuseamento do equipamento bem como dos reagentes, sempre com o máximo de asepsia;

### Aplicar:

- Técnicas de microbiologia para obtenção de culturas bacterianas e extratos bacterianos;
- Técnicas de biologia molecular para identificação taxonómica de bactérias;
- Conhecimentos adquiridos sobre bioinformática para análise filogenética;
- Conhecimento teórico sobre bactérias e os seus modos de ação;
- Conhecimentos de análise estatística com a finalidade de compreender os resultados dos ensaios *in vitro* da ação nematodocida;

## 3. Metodologia

### 3.1 Estratégia

**Local de realização:** Laboratório de Nematologia sediado no Pólo da Mitra, Universidade de Évora.

**Apoio financeiro:** Projecto PratyOmics (PTDC/ASP-PLA/0197/2020) - Metabolómica de plantas para o controlo do nemátode das lesões radiculares *Pratylenchus penetrans*

**Duração:** 1 semestre letivo.

**Modelo biológico:** Nemátode de lesões radiculares, *Pratylenchus penetrans*, isolado A44L4.

#### Ensaios

- Identificação taxonómica por amplificação do gene 16S rRNA
- Análise filogenética
- Ensaios *in vitro* para avaliação de ação nematocida

#### Parâmetros analisados

- Crescimento de culturas bacterianas
- Quantificação da concentração de DNA
- Amplificação do gene em estudo no DNA genómico (gDNA)
- Análise de sequências
- Contagem de nemátodes

#### Técnicas utilizadas:

- Técnicas básicas de Microbiologia (preparação e esterilização de meios de cultura líquidos e sólidos; obtenção de culturas puras; cultivo de bactérias em meio sólido e líquido)
- Extração e quantificação de gDNA;
- Amplificação de genes por PCR;
- Eletroforese em gel de agarose;
- Purificação de produtos de PCR;
- Sequenciação da região 16S rRNA;
- Análise bioinformática de sequências nucleótídicas;
- Análise espectrofotométrica da densidade ótica de culturas bacterianas;
- Ensaios *in vitro* de filtrados e lisados bacterianos;

## **3.2. Procedimento experimental**

### **3.2.1 Preparação e crescimento de uma coleção de *Bacillus***

#### *3.2.1.1 Preparação do meio de cultura*

Num frasco de 500mL, juntou-se 3g de agar, 6,25g de meio Luria-Bertani (LB) e 490,75mL com água destilada. O meio foi autoclavado a 121°C durante 20min. Esperou-se que o meio nutritivo arrefecesse para ser utilizado de seguida. A preparação das placas de *Petri* com LB foi efetuada numa câmara de fluxo vertical para evitar a ocorrência de contaminações que pudessem prejudicar os resultados. O meio nutritivo foi vertido cuidadosamente para placas de *Petri* de 3 e 9cm de diâmetro, deixando-se solidificar com a tampa entreaberta. Após solidificação, as placas foram fechadas e identificadas com o respetivo nome do meio de cultura e data de preparação.

#### *3.2.1.2 Obtenção de culturas puras de *Bacillus* spp.*

Para este trabalho foram utilizados 10 isolados de *Bacillus* spp. (isolados 13C9, M3, 14C26, 14C48, 4810, 13C18, 14C2, 13C43, 4809 e MABN R01), armazenados a -80°C, em suspensão com glicerol 30%(v/v). Para cada isolado, 20µL de suspensão foram espalhados em placas de LB, previamente preparadas, selou-se as placas com parafilme e incubou-se a 28°C durante 3 dias. Após incubação, verificou-se a pureza do crescimento bacteriano. As culturas efetivamente puras foram repicadas para placas de 3cm. Para as culturas que se suspeitava que poderiam ter algum tipo de contaminação, foram repicadas para placas de 9cm pela técnica de estriado. Após crescimento, uma colónia foi de novo repicada para placas de 9cm. O procedimento foi repetido até a cultura estar completamente pura, sem presença de contaminação.

### **3.2.2. Identificação taxonómica por sequenciação do gene 16S rRNA**

#### *3.2.2.1 Extração de DNA*

Para a extração de DNA de células bacterianas, é necessário, em primeiro lugar, provocar a lise celular para posterior isolamento do DNA. O kit de extração de DNA utilizado foi o NZY Tissue gDNA Isolation kit (NZYTech, Lisboa). Para a preparação de cada amostra de DNA, recolheu-se uma pequena amostra de cada isolado com uma ansa de inoculação descartável e colocou-se num microtubo de 1,5mL. Pipetou-se para dentro do tubo 180µL de Buffer NT1 (reagente do kit) para provocar a lise celular. Seguidamente utilizou-se o vórtex para homogeneizar a mistura. Adicionou-se 25µL duma solução de Proteinase K 30 mg/mL (reagente do kit) para ajudar na degradação

de proteínas e na inativação de nucleases, homogeneizou-se durante uns segundos no vórtex, e incubando-se no termobloco de banho seco a 56°C com agitação, durante 2h30min. Posteriormente adicionou-se 200µL de Buffer NL e homogeneizou-se durante 10s no vórtex. No caso do isolado 14C48, e devido à existência de partículas em suspensão, centrifugou-se à velocidade máxima (12000rpm) durante 5min para sedimentação das mesmas, retirando-se o sobrenadante para um novo microtubo. Seguidamente adicionou-se 210µL de etanol a 100% (v/v) a cada uma das amostras e homogeneizou-se imediatamente no vórtex. Transferiu-se cada uma das amostras para uma coluna (NZYSpin Tissue Column) inserida num tubo de 2mL e centrifugou-se durante 1min à velocidade máxima (12000rpm), descartando o sobrenadante e colocando a coluna de volta no tubo. Adicionou-se 500µL de Buffer NW1 (reagente do kit) à coluna e centrifugou-se durante 1min à velocidade máxima, descartando-se posteriormente o sobrenadante e colocando-se a coluna de volta no tubo. Adicionou-se 600µL de Buffer NW2 (reagente do kit) à coluna e centrifugou-se durante 1min à velocidade máxima descartando-se no final o sobrenadante e colocando-se mais uma vez a coluna no tubo de 2mL. Para secar a membrana da coluna, procedeu-se a mais uma centrifugação de 2min a 12000rpm. Para eluir o gDNA colocou-se a coluna dentro de um microtubo de 1,5mL e adicionou-se 50µL de Buffer NE diretamente na membrana da coluna, incubando-se durante 1min à temperatura da sala e de seguida centrifugou-se 2min à velocidade máxima. Identificou-se cada amostra de gDNA.

Após extração de DNA, procedeu-se à quantificação e avaliação da qualidade do DNA (razão A260/A280 e A260/320) por espectrofotometria utilizando-se o espetrofotómetro Nanodrop 2000c (Thermo Scientific). O tampão de eluição do kit foi utilizado como branco na medição.

#### 3.2.2.2. Amplificação do gene 16S rRNA por PCR

A identificação taxonómica (ao nível da espécie) dos isolados de *Bacillus* sp. foi efetuada a partir da amplificação pela técnica do PCR do gene 16S rRNA (cerca de 1500bp) utilizando os *primers* universais 63F (5'- CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC – 3') e 1387R (5' - GGG CGG WGT GTA CAA GGC - 3') (Marchesi et al., 1998). Começou-se por preparar a solução de trabalho dos *primers* a uma concentração de 10µM, a partir da solução stock de 100µM. Para cada *primer*, juntou-se 10µL da solução stock e 90µL de água destilada e esterilizada. Posteriormente preparou-se a reação de PCR (mix) com os seguintes reagentes (volume final 25µL; Tabela 2):

**Tabela 2.** Composição da reação para ampliação por PCR do gene 16S rRNA.

Reagentes	Volume ( $\mu\text{L}$ ) para 1 reação	Concentração
H <sub>2</sub> O destilada	até 25	Até perfazer o volume final
Supreme NZYtaq II Green Master Mix *	12,5	Na bula do fornecedor
Primers 63F/1387R	0,625+0,625	0,25 $\mu\text{M}$
gDNA bacteriano	0,5-2	5,1ng – 346,1ng (consultar Anexo 1)

\*já contém dNTPs, buffer Taq, Taq DNA polimerase, MgCl<sub>2</sub>.

Preparou-se 10 microtubos, um tubo para cada uma das amostras de gDNA, sendo numerados de 1 a 10 em que: 1- 13C9; 2- 14M3; 3- 14C26; 4- 14C48; 5- 4810; 6- 13C18; 7- 14C2; 8- 13C43; 9- 4809; 10- MABN R01. Preparou-se ainda um controlo negativo (com todos os reagentes da reação de PCR exceto o gDNA) para controlo da reação de PCR. O termociclador foi programando com o seguinte programa de reação de PCR (de acordo com a informação da Taq DNA polimerase NZYtaq II): desnaturação inicial a 95°C durante 3min; seguida de 29 ciclos de desnaturação a 94°C durante 30s, *annealing* de 51°C durante 30s, e extensão a 72°C durante 1min; e extensão final a 72°C durante 5min.

### 3.2.2.3 Eletroforese em gel de agarose

Os produtos de PCR amplificados (10 amostras + controlo negativo) foram analisados pela técnica de eletroforese em gel de agarose. Preparou-se um gel de agarose 1% (w/v) com 0,4g de agarose e 40mL de TBE 0,5X. A solução foi aquecida no micro-ondas para total dissolução durante 2min. Posteriormente, adicionou-se 0,4 $\mu\text{L}$  do agente intercalante Greensafe (Nzytech, Lisboa). Após homogeneização da solução, colocou-se num berço de eletroforese (pequena forma retangular), sendo colocado um pente com 16 poços (permite formar os poços para as amostras). Esperou-se aproximadamente 30min para a solidificação do gel. Uma vez sólido, colocou-se o berço com o gel na tina horizontal de eletroforese. As amostras (5 $\mu\text{L}$ ) foram pipetadas para cada poço. No primeiro poço do gel, colocou-se o marcador molecular de 1Kb (Gene ruler, ThermoScientific). A tina foi fechada e os elétrodos da mesma inseridos na fonte de alimentação, programando-se 40min a uma voltagem de 85V. Após terminada a eletroforese, colocou-se o gel no transiluminador de luz UV (VWR, Genoview) para observação dos produtos de PCR e fotografou-se com um sistema de captação de imagem acoplado (Canon).

#### 3.2.2.4 Purificação do produto de PCR e sequenciação

Nesta técnica utilizou-se o kit MinElute PCR Purification (Qiagen) utilizando-se o protocolo de acordo com o fabricante. Começou-se por centrifugar os produtos de PCR na minicentrífuga. Seguidamente, mediu-se o volume de cada amostra para determinar a quantidade de buffer PB (reagente do kit) a utilizar. O volume do buffer PB deverá ser 5x do volume inicial das amostras. Posteriormente, a mistura (produto de PCR + buffer PB) foi transferida para uma coluna inserida num tubo coletor. Para fixar o DNA na membrana da coluna centrifugou-se as amostras durante 1min a 13000rpm, descartando-se o sobrenadante e colocando a coluna de volta no tubo coletor de 2mL. Seguidamente adicionou-se 750µL do buffer PE de lavagem (reagente do kit) à coluna e centrifugou-se nas mesmas condições anteriores, voltando a descartar o sobrenadante. Repetiu-se uma centrifugação adicional para secar a membrana e retirar qualquer excesso que tenha ficado retido. Depois transferiu-se a coluna para um microtubo de 1,5mL e adicionou-se 15µL de buffer BE (reagente do kit) no centro da membrana. Esperou-se 1min e posteriormente centrifugou-se 1min a 13000rpm. O volume final eluído constitui o produto de PCR purificado. Os produtos de PCR de cada um dos isolados foram enviados para sequenciação Sanger na empresa Stabvida (Costa da Caparica). A 10µL de produto de PCR adicionou-se 3µL do *primer* (10µL + 3µL *primer* 63F e 10µL + 3µL *primer* 1387R).

#### 3.2.2.5 Análise de sequências e filogenia

Os produtos de PCR purificados foram enviados para sequenciação em ambas as direções (sentido *forward* e *reverse*). Os cromatogramas de cada uma das sequências foram analisados no programa BioEdit v7.2 (Hall, 1999). Para cada isolado, uma sequência única (aproximadamente 1200-1300bp) foi obtida através do alinhamento das sequências em ambas as direções. Posteriormente, as sequências obtidas foram comparadas com as disponíveis na base de dados NCBI GenBank utilizando o programa BLAST. Uma vez adquiridas as sequências dos organismos mais próximos de cada um dos isolados, utilizou-se o programa MEGA v11.0.10 (<https://www.megasoftware.net/>) para se poder construir uma árvore filogenética. Para isso, procedeu-se ao alinhamento ClustalW de todas as sequências e ao corte das sequências para ficarem com o mesmo tamanho. Exportou-se o ficheiro de extensão fasta (.fasta) para um ficheiro de extensão mega (.mega) e procedeu-se então à construção da árvore utilizando o método de Neighbor-joining com o modelo Kimura 2-parâmetro, anteriormente determinado através da função “*Find best DNA/Protein model*” no programa MEGA. A robustez da árvore filogenética foi obtida pelo método estatístico



*bootstrap* (1000 replicados). Depois da árvore construída, exportou-se a árvores para um ficheiro newick (.nwk) e utilizou-se a plataforma online iTOL v6 (Letunic and Bork, 2021) para formatar a topologia da árvore. A espécie utilizada como *outgroup* foi a *Aeribacillus pallidus* EF60103 (ON366400.1) por ser mais afastada filogeneticamente do género *Bacillus*. Finalmente, submeteu-se as sequências 16S rRNA na base de dados da GenBank, através do programa Bankit, tendo sido atribuídos números de acesso a cada uma delas (ON568491 ao ON568496, e LC88630.1).

### **3.2.3 Ensaio de avaliação do potencial nematocida da coleção de *Bacillus***

#### **3.2.3.1 Preparação da cultura de *Pratylenchus penetrans***

A cultura de *P. penetrans* isolado A44L4 é mantida em rodela de cenoura a 25°C em estufa com humidade controlada, durante cerca de 3 meses (Figura 3A e 3B). Para o ensaio em questão, 5 rodela de cenoura com *P. penetrans* foram extraídas pelo método dos *erlenmeyers* invertidos (“PM 7/148 (1) Guidelines for the Management of Nematode Collections Used for the Production and Maintenance of Reference Material,” 2021) durante uma noite à temperatura ambiente e dentro da câmara de fluxo laminar para evitar contaminação. Posteriormente, os nemátodes recolhidos em suspensão foram recolhidos para um tubo de 15mL e centrifugados a 3000rpm. O sobrenadante (dH<sub>2</sub>O) foi retirado, deixando apenas o pellet de nemátodes. Posteriormente procedeu-se a 3 lavagens com dH<sub>2</sub>O suplementada com canamicina (50mg/mL) e carbenicilina (50mg/mL). Para quantificação, uma alíquota da suspensão dos nemátodes (cerca de 100uL) foi contada na lupa da marca Olympus, modelo SZ61, e ajustado para aproximadamente 60 nemátodes por 50µL.



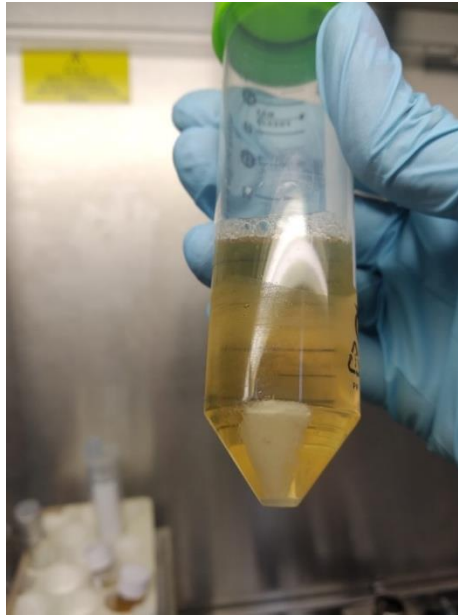
**Figura 3.** Cultura de *Pratylenchus penetrans* isolado A44L4: A- Na estufa com umidade controlada; B- Disco de cenoura onde é possível observar as necroses provocadas pelo nemátode;

### 3.2.3.2 Preparação dos extratos bacterianos

Os extratos bacterianos (Figura 4) foram obtidos por: lise, que consiste lise celular das próprias células (identificado como lisados bacterianos); e filtração, que consiste na filtração do meio de crescimento das bactérias (identificado como filtrados bacterianos). Para a preparação dos extratos fez-se um pré-crescimento dos isolados bacterianos em 5mL de TSB durante *overnight* a 30°C e 150rpm. Mediu-se a densidade óptica (OD<sub>600</sub>) utilizando o espectrofotômetro SPEKOL 1500 (Analytikjena). O meio de cultura TSB foi utilizado como branco. Posteriormente, para cada isolado preparou-se 20mL de TSB com OD<sub>600</sub> ajustada para 0.05, e voltou-se a incubar durante 24h a 30°C e 150rpm.

Para a preparação dos filtrados e lisados bacterianos seguiu-se os protocolos otimizados por, respetivamente, Gao et al., 2016 e Nascimento et al., 2013. Resumidamente, centrifugou-se o crescimento bacteriano de 24h a 10000rpm durante 10min a 4°C, separou-se o meio líquido do *pellet* bacteriano por decantação para um tubo Falcon, e filtrou-se o sobrenadante com um filtro de 0,22µM (Gao et al., 2016). Os filtrados bacterianos foram guardados no congelador para posterior uso. Para a preparação dos lisados bacterianos começou-se por re-suspender o *pellet* bacteriano obtido numa solução de 10mM Tris pH8, 1mM EDTA e 10% SDS. Depois incubou-se

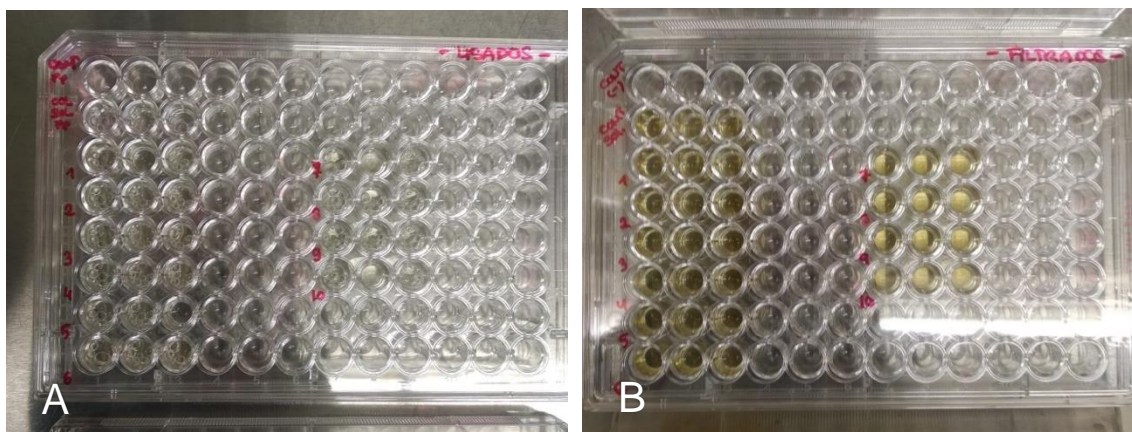
num banho-maria durante uma hora a 37°C. Por último recolheu-se o sobrenadante e conservou-se no congelador para posterior uso (Nascimento et al., 2013).



**Figura 4.** Preparação dos extratos bacterianos para avaliação nematocida em *Pratylenchus penetrans*.

### 3.2.3.3 Ensaio de ação nematocida

Para os ensaios *in vitro* utilizou-se 2 placas com 96 poços, em que para cada poço adicionou-se 200µL de filtrado/lisado e 50µL da suspensão de *P. penetrans* esterilizada e ajustada. Como o controlo de *P. penetrans* adicionou-se apenas 250µL da solução do mesmo esterilizado e para o controlo TSB (meio de cultura) adicionou-se 200µL do meio TSB e 50µL da suspensão de *P. penetrans* esterilizada e ajustada. Todos os ensaios foram repetidos em triplicado (três réplicas técnicas) como se pode observar nas Figuras 5A e 5B e na Tabela 3. Incubou-se as placas a 20°C durante 24h.



**Figura 5.** Ensaio *in vitro* para avaliação nematocida de *Bacillus* sp.: A- Lisados; B-Filtrados;

**Tabela 3.** Esquema da placa para Filtrados/Lisados

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>A</b>	Controlo <i>P.penetrans</i>						Isolado 7			
<b>B</b>	Controlo TSB						Isolado 8			
<b>C</b>	Isolado 1						Isolado 9			
<b>D</b>	Isolado 2						Isolado 10			
<b>E</b>	Isolado 3									
<b>F</b>	Isolado 4									
<b>G</b>	Isolado 5									
<b>H</b>	Isolado 6									

Após a incubação, procedeu-se à contagem dos nemátodes vivos e mortos. Para esta etapa utilizou-se um microscópio ótico da marca Olympus, modelo CK30. Para a determinação da mortalidade, utilizou-se a seguinte fórmula (Puntener, 1981):

$$Mortalidade\ corrigida\ \% = \frac{Mortalidade\ \% \ no\ ensaio - Mortalidade\ \% \ no\ controlo}{100 - Mortalidade\ \% \ no\ controlo} \times 100$$

Uma vez que foram utilizados dois controlos nos ensaios *in vitro*, foram calculados dois valores de mortalidade para cada isolado.

#### 3.2.3.4 Análise dos dados

Para a análise estatística dos dados referentes aos ensaios *in vitro*, utilizou-se o programa R em jamovi (The jamovi project (2021). Retrieved from <https://www.jamovi.org>). Procedeu-se primeiramente à análise descritiva com a determinação da média, desvio-padrão e erro-padrão. Uma vez que não houve homogeneidade de variâncias, determinada pelo teste Levene, procedeu-se à análise One-way ANOVA (Welchs) com a premissa de variâncias diferentes, para determinar diferenças significativas na mortalidade de *P. penetrans* aos isolados de *Bacillus*. Diferenças significativas (p<0,05) entre isolados foram determinadas pelo teste Games-Howell Post-Hoc.

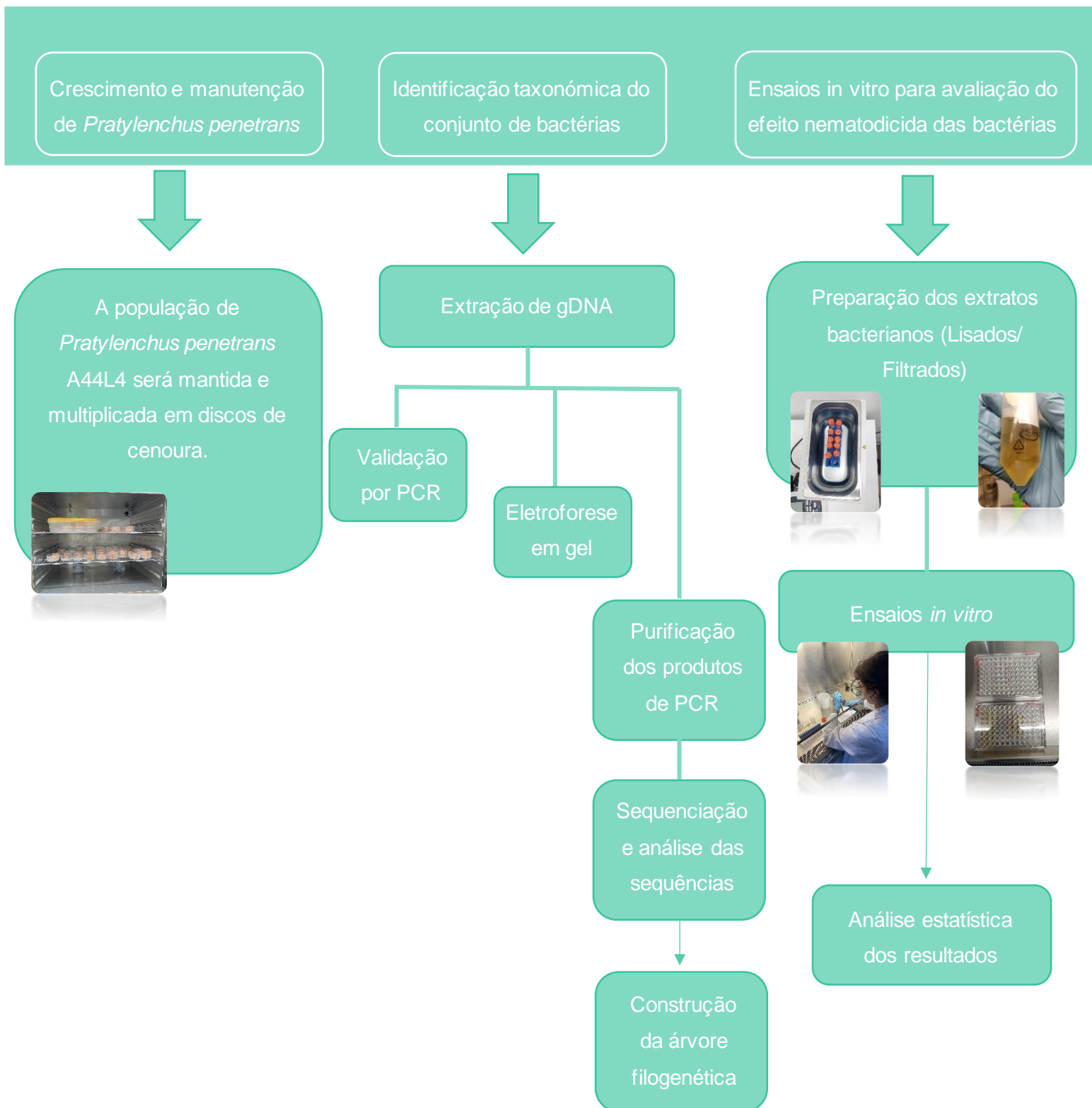
### 3.3. Equipamento

- Autoclave da marca Tuttnauer, modelo 3850ELV
- Balança digital da marca Hauraus, Pioneer
- Câmara de fluxo vertical da marca Sterilgard, modelo SG403A-HE
- Centrífuga da marca Scanspeed, modelo Mini
- Centrífuga da marca Eppendorf, modelo 5430R
- Espectrofotómetro Nanodrop 2000c da marca Thermo Scientific
- Espectrofotómetro analytikjena SPEKOL 1500
- Estufa da marca Memert Beschickung, loading modell 100
- Lupa da marca Olympus, modelo SZ61
- Microscópio ótico da marca Olympus, modelo CK30
- Placa de aquecimento da marca Snijders, modelo 34532
- Power Source da marca VWR, modelo 300V
- Termociclador da marca BIO-RAD, modelo T100 Thermal Cycler
- Termobloco da marca Eppendorf, modelo Thermomixer compact
- Transiluminador com sistema de fotodocumentação da marca VWR, modelo GenoView
- Vortex da marca VWR International, modelo 444-1372

### 3.4. Reagentes

- Agar em pó, VWR Chemicals
- Agarose para electroforese em gel, Seakem LE
- EDTA, Sigma Aldrich
- GeneRuler 1Kb DNA Ladder
- Green-safe premium, NZYTech
- Hidróxido de sódio, Panreac Quimica SA
- LB Broth em pó, NZYTech
- MinElute PCR purification kit
- NZY Tissue gDNA isolation kit
- Primer 63F
- Primer 1387R
- SDS, PlusOne Pharmacia Biotech
- Tampão Tris, Biochem Chemopharma
- TBE Buffer 10X stock solution, NZYTech

### 3.5. Diagrama do trabalho

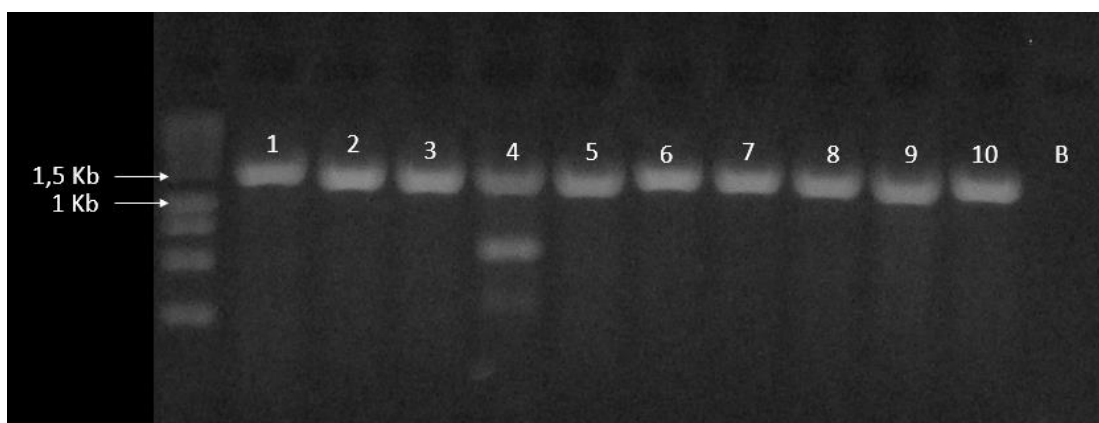


## 4. Resultados e Discussão

### 4.1. Amplificação do gene 16S por PCR

As amostras de gDNA dos isolados bacterianos foram amplificadas com os *primers* universais 63F-1387R do gene 16S rRNA, região cujo tamanho ronda os 1,5kb (Marchesi et al., 1998). As concentrações de cada amostra podem ser consultadas no Anexo 1. Utilizou-se o gene 16S rRNA para a identificação taxonómica por ser um marcador evolutivo contendo regiões muito conservadas entre diferentes espécies de bactérias e *Archaea*, mas também por possuir regiões variáveis (regiões hiper-variáveis) que são únicas podendo refletir divergência durante a evolução, fazendo dele um bom marcador para estudos filogenéticos (Woese et al., 1990).

Por observação da Figura 6 pode-se dizer que as amostras foram obtidas com tamanho esperado (1,0kb – 1,5kb), no entanto verificou-se que a amostra 4 correspondente ao isolado 14C48 apresentou mais que uma banda em todas as 6 tentativas de amplificação por PCR, o que poderá indicar uma possível contaminação aquando da extração do gDNA deste isolado. Não houve qualquer amplificação no controlo negativo.



**Figura 6.** Amplificação do gene 16S rRNA por PCR analisados por eletroforese em gel de agarose. As amostras foram: 1 - 13C9, 2- 14M3; 3 - 14C26, 4 - 14C28, 5 -4810, 6 - 13C18, 7-14C2, 8 - 13C43, 9 -4809, 10 - MARNR01, B - controlo negativo (sem DNA).

### 4.2. Análise das sequências e filogenia

A Tabela 4 apresenta a identificação taxonómica dos isolados em estudo obtida com base na base de dados NCBI GenBank. Os isolados 4809, 4810 e MARNR01 foram utilizados como controlo positivo de bactérias com ação nematocida conhecida, tendo sido cedidos para este estudo e como tal não foram obtidos números de acesso.

**Tabela 4.** Identificação taxonómica dos isolados de *Bacillus* utilizados neste trabalho

ID Isolado	Espécie	Origem provável	Nº acesso	Nº acesso NCBI	Q.C (%)	E-value	% identity	Ano	Local
4809	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus subtilis</i> complex*	----	ON102793.1	100	0	100	2009	Rep. Checa
MABNR01	<i>Priestia</i> sp.	<i>Priestia aryabhatai</i>	----	OM992226.1	100	0	100	---	Espanha
4810	<i>Cytobacillus</i> sp.	<i>Cytobacillus firmus</i>	----	KT719908.1	100	0	99,87	2010	Rep. Checa
13C9	<i>Bacillus</i> sp.	<i>B. thuringiensis</i>	ON568495.1	KY307913.1	100	0	100	2013	Comporta, Portugal
14M3	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus subtilis</i> complex*	ON568496.1	OM910713.1	100	0	100	2014	Madeira, Portugal
13C18	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus subtilis</i> complex*	ON568491.1	KM822599.1	100	0	100	2013	Comporta, Portugal
13C43	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus subtilis</i> complex*	ON568492.1	ON012848.1	100	0	100	2013	Comporta, Portugal
14C26	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus subtilis</i> complex*	ON568494.1	OM050583.1	99	0	100	2014	Comporta, Portugal
14C2	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus subtilis</i> complex*	ON568493.1	OM981129.1	99	0	100	2014	Comporta, Portugal
14C48	<i>Paenibacillus</i> sp.	<i>Paenibacillus lautus</i>	LC88630.1	LC588630.1	100	0	100	2014	Comporta, Portugal

\**B. subtilis*, *amyloliquenifaciens*, *velezensis*, *siamensis*, *liqueniformis*.

As sequências dos isolados em estudo obtiveram cerca de 99-100% de similaridade (e-value 0) com outras sequências da base de dados, sendo possível a identificação até ao nível espécie para alguns destes (Tabela 4).

A árvore filogenética dos isolados de *Bacillus* sp. utilizados neste trabalho encontra-se representada na Figura 7. Os isolados em estudo encontram-se distribuídos em diferentes clados, com bom suporte de *bootstrap*. A espécie *Aeribacillus palidus* EF60103 foi utilizada como *outgroup*. O *Bacillus* sp. MABNR01 encontra-se agrupado com *Priestia aryabhatai* (OM992226.1), anteriormente classificado como *Bacillus aryabhatai*, no entanto após análises detalhadas de CSIs (*conserved signature indels*) foi reclassificado para a taxonomia atual (Gupta et al., 2020). O *Bacillus* sp. 4810 agrupou-se no sub-clado das espécies *Cytobacillus firmus* (KT719908.1; KT719930.1), anteriormente classificado como *Bacillus firmus* (Patel and Gupta, 2020). No clado destacado a verde, encontra-se o *Bacillus* sp. 13C9 agrupado com *B. thuringiensis* (KY307913.1).

O género *Bacillus* abrange aproximadamente 618 espécies e 40 subespécies (Parte et al., 2020) existindo espécies de *Bacillus* muito próximas filogeneticamente. Como se pode observar no clado destacado a azul, as espécies *B. subtilis*, *B. siamensis*,

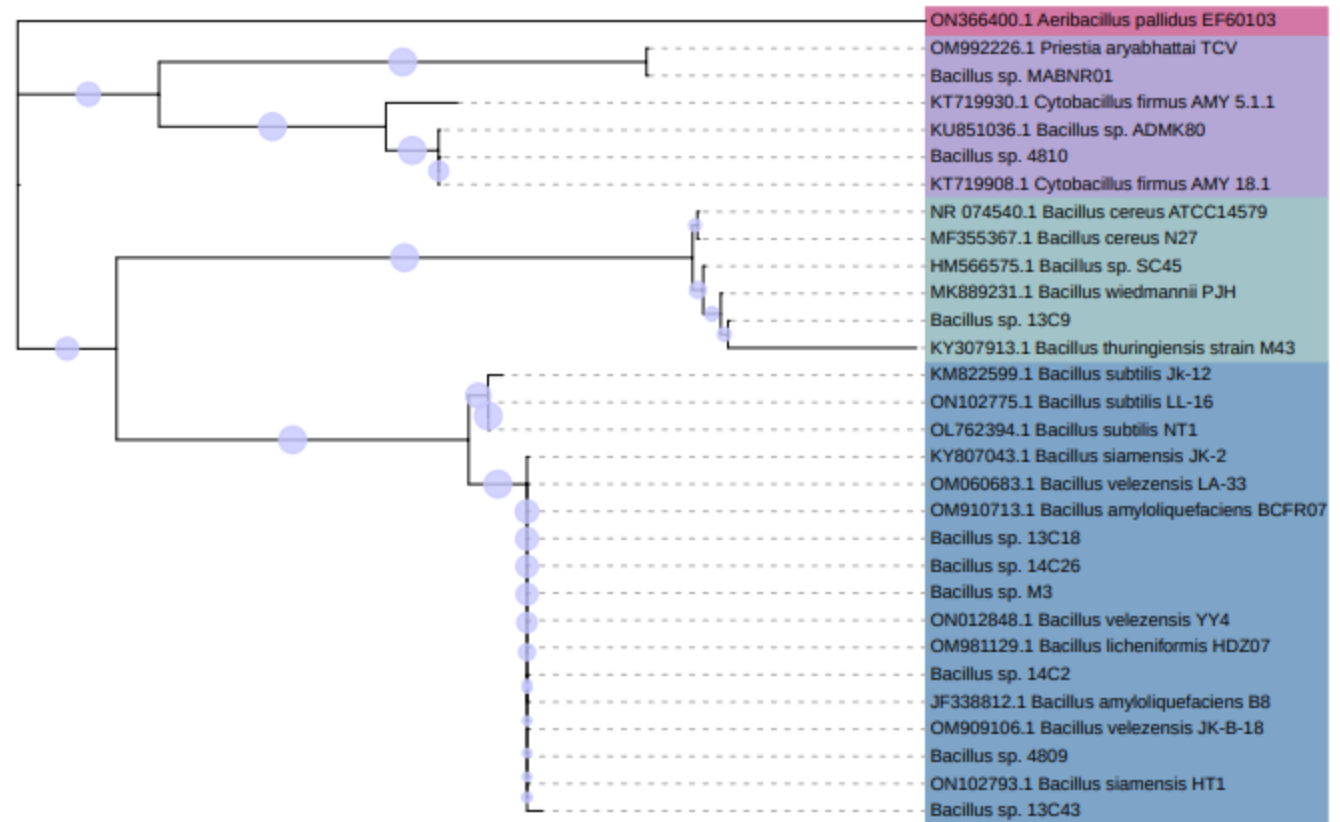
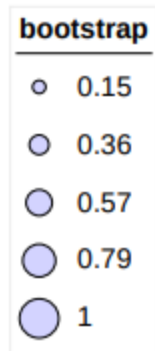


*B. velezensis*, *B. amyloliquenfaciens* e *B. licheniformis* agruparam-se. Estas espécies de *Bacillus* são bastante próximas a nível filogenético, como se pode observar nas percentagens de identidade entre sequências 16S rRNA presentes na tabela do Anexo 2. Este grupo de bactérias é denominado por “The *Bacillus subtilis* species complex” (Fritze., 2004) por serem filogeneticamente muito próximas, e segundo Rooney et al. (2009) são muito difíceis de distinguir com o gene marcador 16S rRNA uma vez que este é altamente conservado, não sendo suficientemente informativo e específico para identificação deste complexo. Neste sentido, uma possível solução para este problema seria a utilização de outro gene marcador capaz de evidenciar as diferenças genéticas entre os isolados, constituindo uma análise mais específica e informativa como por exemplo um gene “housekeeping”. Neste clado encontram-se agrupados os *Bacillus* sp. 13C18, 14C26, M3, 14C2, 4809 e 13C43. Com base nos dados de similaridade (Tabela 4) e de filogenia (Figura 7), os isolados em estudo foram identificados como: isolado 4810 - *Cytobacillus firmus*; isolado 13C9 - *Bacillus thuringiensis* M43; isolados 13C18, 14M3, 4809, 14C2, 13C43 e 14C26- *Bacillus* sp.; e isolado MABNR01- *Priestia aryabhatai*. O isolado 14C48 não consta na lista da árvore filogenética uma vez que a sua sequência após ser “limpa” apresentava um tamanho bastante inferior relativamente às outras sequências. Por comparação com a base de dados (Tabela 4), identificou-se como *Paenibacillus lautus*.

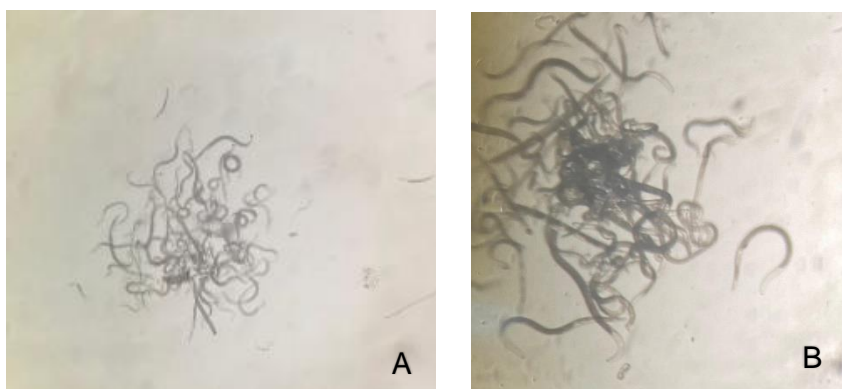
### 4.3. Ensaio de ação nematocida

A avaliação *in vitro* do potencial nematocida das bactérias em *P. penetrans* foi efetuada após 24h, sendo posteriormente efetuada a contagem dos nemátodes vivos e mortos (Figura 8). De destacar que nos lisados bacterianos é avaliado o potencial do conteúdo celular da bactéria enquanto nos filtrados está a ser avaliado os produtos resultantes do crescimento bacteriano em fase exponencial, como exemplo enzimas líticas, compostos antimicrobianos ou até mesmo toxinas (Jaishankar and Srivastava, 2017). No ensaio dos filtrados, observou-se que todos os nemátodes estavam vivos às 24h, decidindo-se manter o ensaio até às 48h. Contudo, após 48h, verificou-se 100% de mortalidade em todos os tratamentos, incluindo os dois controlos. Para não induzir em erro na avaliação do potencial nematocida, este ensaio não foi considerado para esta discussão e será posteriormente repetido.

Tree scale: 0.01

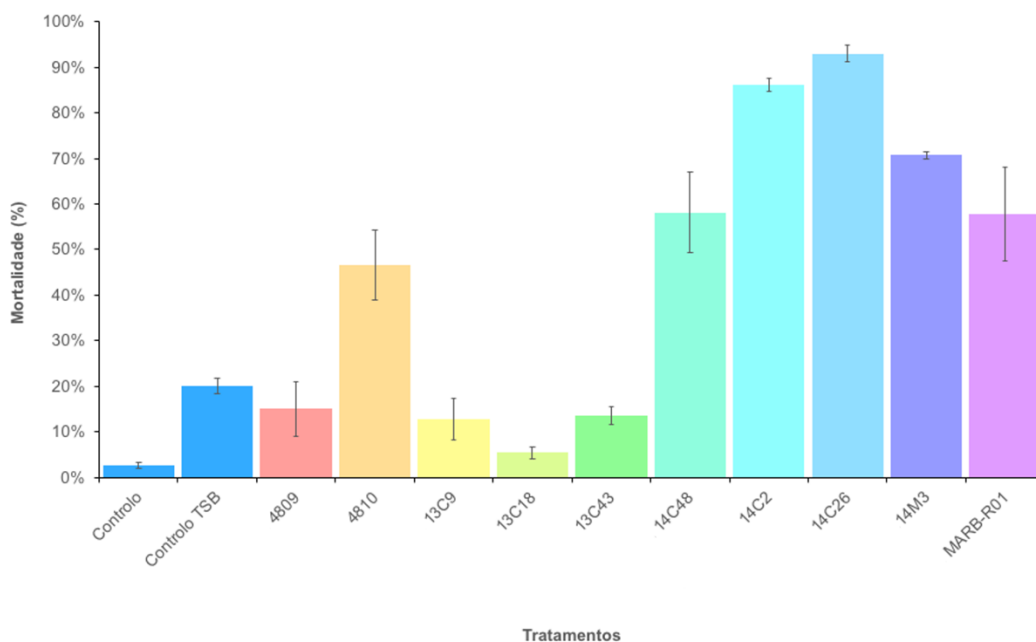


**Figura 7.** Árvore filogenética dos *Bacillus* sp. em estudo obtida através do método Neighbor Joining com o modelo Kimura 2 -parâmetros. Representação gráfica obtida na plataforma iTOL. O tamanho do fragmento utilizado foi de 1Kb.



**Figura 8.** Avaliação da ação nematocida de *Bacillus* sp. em *Pratylenchus penetrans*. (A) nemátodes no poço do controlo negativo (Pp) no início do ensaio; e após 24h (B).

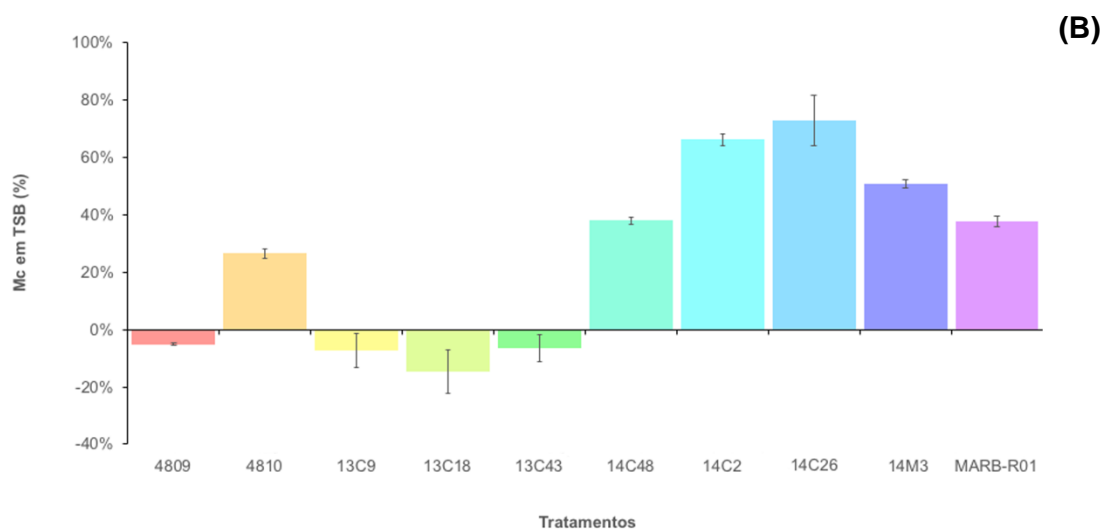
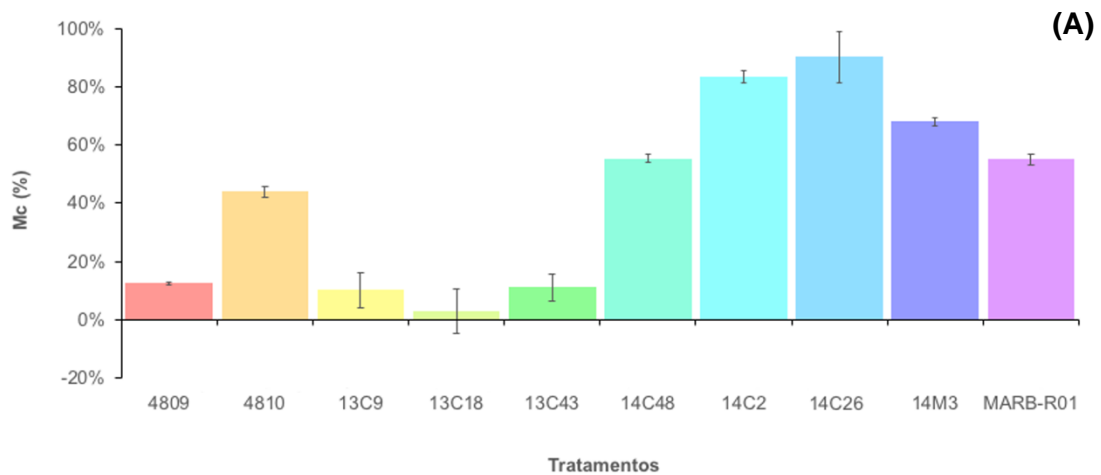
A percentagem de mortalidade de *P. penetrans* após 24h nos lisados bacterianos pode-se observar no Gráfico 1.



**Gráfico 1.** Análise da mortalidade dos nemátodes: Lisados 24h.

Comparativamente com os dois controlos utilizados (controlo Pp e Pp + TSB), alguns isolados mostraram efetivamente ter uma ação nematocida nomeadamente: isolados *Bacillus* pertencentes ao complexo *B. subtilis*: 14C2 com uma % mortalidade de aproximadamente 86%, 14C26 com > 90% tendo sido a mais alta, 14M3 com aproximadamente 70%; *P. aryabhatai* (MABNR01) e *P. lautus* (14C48) com valores a rondar os 58% a 60%. Contudo também houve isolados que não apresentaram qualquer efeito conseguindo até ter uma menor mortalidade que o controlo Pp + TSB: *B.*

*thuringiensis* 13C9 e o *Bacillus* sp. 13C43 com uma percentagem de mortalidade perto dos 15%. O *Bacillus* sp. 4809 com uma percentagem aproximada de 17% e por último o *Bacillus* sp. 13C18 com uma percentagem inferior a 10%. Para uma avaliação mais precisa do efeito dos isolados em estudo procedeu-se à análise com a mortalidade corrigida (Mc) utilizando cada controlo (Gráfico 2A e B).



**Gráfico 2.** Análise da mortalidade corrigida (Mc) de *Pratylenchus penetrans* por ação dos diferentes isolados de *Bacillus*. (A) Mc calculada com o controlo Pp; (B) Mc calculada com o controlo Pp + TSB. As barras das colunas representam o erro padrão.

Segundo Kong *et al.* (2006), a actividade nematocida pode classificar-se da seguinte forma: sem actividade com valores de mortalidade entre 0 e 40%; baixa actividade com

valores de 41 a 60%; moderada actividade, 61 a 80%; e elevada mortalidade com valores superiores a 81%. Tendo como base esta classificação, verificou-se que os *Bacillus* sp. 4809, 13C18 e 13C43 do complexo *Bacillus subtilis* e o *B. thuringiensis* 13C9 não apresentaram actividade nematodocida, com valores de Mc abaixo de 20% (Gráfico 2A). Os isolados *Paenibacillus lautus* 14C48 e o *Priestia aryabhatai* MABNR01 apresentaram percentagens compreendidas entre 41 e 60%, sendo considerados agentes nematodocidas fracos (Kong *et al.*, 2006). O *Bacillus* sp. 14M3 (do complexo da espécie *Bacillus subtilis*) apresentou uma actividade nematodocida moderada, com uma percentagem compreendida entre 61 e 80%. De elevado interesse, os *Bacillus* sp. 14C2 e 14C26, também inseridos no complexo da espécie *Bacillus subtilis*, apresentaram percentagens entre os 80% e 90% respetivamente, sendo portanto considerados agentes de biocontrolo com elevada ação nematodocida. Pelo teste Games-Howell Post-Hoc (Anexo 3), foi possível verificar que estes dois isolados apresentaram diferenças significativas com os restantes isolados.

À semelhança de outros nemátodes fitoparasitas, o *P. penetrans* é reconhecido por possuir bactérias associadas (Elhady *et al.*, 2021). Curiosamente, algumas das proteínas produzidas pelo *P. penetrans* (*e.g.*, enzimas que degradam as paredes celulares) foram obtidas por transferência horizontal a partir de bactérias (C. S. L. Vicente *et al.*, 2019) sugerindo assim uma associação forte. Para além destas observações, sabe-se que os nemátodes têm uma camada externa de glicoproteínas que reveste a sua cutícula e diretamente envolvida com a associação microbiana dos mesmos (Grenache *et al.*, 1996). Assim aquando da mudança de ambiente, os nemátodes são capazes de mudar a composição desta camada levando à proteção dos mesmos contra organismos antagonistas (Grenache *et al.*, 1996). Apesar do *P. penetrans* ser extraído e mantido em condições de assepsia, não foi possível garantir a sua esterilização total. Devido a este facto, verificamos que alguns isolados apresentaram percentagens de mortalidade negativas indicando que a mortalidade do próprio tratamento foi inferior à mortalidade do segundo controlo (Pp + TSB) (Gráfico 2B). Após 24h, o controlo Pp+TSB apresentava uma suspensão turva, indicativo da presença das possíveis bactérias associadas ao nemátode. Tendo em conta que os *Bacillus* sp. são conhecidos pela produção de compostos antimicrobianos, é possível que estes tenham inibido o crescimento das bactérias associadas do *P. penetrans*, justificando assim o valor de mortalidade negativo. Mais ensaios serão necessários para provar esta hipótese. Relativamente aos restantes isolados, verificou-se que os isolados 14C26 e 14C2 (inseridos no complexo da espécie *Bacillus subtilis*) apresentaram o maior efeito nematodocida tal como observado na Mc determinada com o primeiro

controlo. Para estes dois isolados, os ensaios *in vitro* serão repetidos com um maior número de réplicas para confirmar o resultado obtido neste trabalho.

Existem poucos estudos que referenciam bactérias como agentes de biocontrolo do *P. penetrans*. Hackenberg et al., 2000 demonstrou o efeito supressivo em solo tratado com *Pseudomonas chlororaphis* Sm3, com uma redução significativa da população de *P. penetrans* no solo. Mais recentemente Elhady et al., 2021 reportou que o isolado *Bacillus cereus* i.24 e o *Lysobacter capsici* i.17 apresentaram um efeito antagonista relativamente ao *P. penetrans*, com valores de mortalidade respectivamente de 95% e 79.5%. Neste sentido, os resultados obtidos com os *Bacillus* sp. 14C26 e 14C2 foram bastante promissores no controlo do *P. penetrans*, e deverão ser considerados para estudos futuros, nomeadamente no estudo do modo de ação destas bactérias para identificação do princípio ativo por detrás da sua forte ação nematocida.

## 5. Conclusões

Neste trabalho pode concluir-se que:

- foi possível identificar taxonomicamente alguns dos isolados de *Bacillus* sp. usando apenas o marcador evolutivo 16S rRNA, nomeadamente o isolado MABNRO1 como *Priestia aryabhatai*, o isolado 4810 como *Cytobacillus firmus*, o isolado 14C48 como *Paenibacillus lautus* e o isolado 13C9 como *Bacillus thuringiensis*;
- para identificar as espécies de *Bacillus* pertencentes ao complexo *Bacillus subtilis* será necessário recorrer a outros marcadores moleculares uma vez que o gene 16S rRNA não é suficientemente informativo e específico para espécies filogeneticamente próximas;
- Os lisados bacterianos de todos os isolados de *Bacillus* sp. não tiveram ação nematodocida no *P. penetrans* ao fim de 24h;
- Os filtrados bacterianos de alguns dos isolados em estudo apresentaram uma potencial ação nematodocida no *P. penetrans*, nomeadamente o *Bacillus* sp. 14C2 e o 14C26, ambos do complexo da espécie *Bacillus subtilis*.

## 6. Referências Bibliográficas

- Abriouel, H., Franz, C.M.A.P., Ben Omar, N. and Galvez, A. (2011) Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *FEMS Microbiol Rev* 35, 201–232.
- Ahmad, G., Khan, A., Khan, A. A., Ali, A., & Mohhamad, H. I. (2021). Biological control: a novel strategy for the control of the plant parasitic nematodes. In *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* (Vol. 114, Issue 7, pp. 885–912). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s10482-021-01577-9>
- Aleti, G., Sessitsch, A. and Brader, G. (2015) Mini review: genome mining: prediction of lipopeptides and polyketides from *Bacillus* and related Firmicutes. *Comput Struct Biotechnol J* 13, 192–203
- Blyuss KB, Fatehi F, Tsygankova VA, Biliavska LO, Iutynska GO, Yemets AI, Blume YB (2019) RNAi-based biocontrol of wheat nematodes using natural poly-component biostimulants. *Front Plant Sci* 2019
- Castillo, P., & Vovlas, N. (2007). *Pratylenchus, (Nematoda, Pratylenchidae): Diagnosis, Biology, Pathogenicity and Management (Nematology Monographs and Perspectives): Vol. Vol.6.*
- Chitwood, D.J. (2002). Phytochemical based strategies for nematode control. *Annual Review of Phytopathology* 40, 221-249
- Elhady, A., Topalović, O., & Heuer, H. (2021). Plants specifically modulate the microbiome of root-lesion nematodes in the rhizosphere, affecting their fitness. *Microorganisms*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040679>
- Freckman, D.W. & Caswell, E.P. (1985). The ecology of nematodes in agroecosystems. *Annual Review of Phytopathology* 23, 275-296
- Fritze, D. (2004). *1245 Symposium The Nature and Application of Biocontrol Microbes: Bacillus spp* (Vol. 94, Issue 11).
- Fosu-Nyarko, J.; Jones, M.G. Advances in understanding the molecular mechanisms of root lesion nematode host interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2016, 54, 253–278.
- Gao, H., Qi, G., Yin, R., Zhang, H., Li, C., & Zhao, X. (2016). *Bacillus cereus* strain S2 shows high nematicidal activity against *Meloidogyne incognita* by producing sphingosine. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep28756>



- Gouda, S., Kerry, R.G., Das, G., Paramithiotis, S., Shin, H.-S. and Patra, J.K. (2018) Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. *Microbiol Res* 206, 131–140.
- Grenache, D. G., Caldicott, I., Albertt, P. S., Riddlet, D. L., & Politz, S. M. (1996). Environmental induction and genetic control of surface antigen switching in the nematode *Caenorhabditis elegans* (nematode cuticle/immune evasion/signal transduction). In *Genetics* (Vol. 93).
- Gupta, R. S., Patel, S., Saini, N., & Chen, S. (2020). Robust demarcation of 17 distinct bacillus species clades, proposed as novel bacillaceae genera, by phylogenomics and comparative genomic analyses: Description of *robertmurraya kyonggiensis* sp. nov. and proposal for an emended genus *Bacillus* limiting it only to the members of the *subtilis* and *cereus* clades of species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(11), 5753–5798. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004475>
- Hackenberg, C., Muehlchen, A., Forge, T., & Vrain, T. (2000). *Pseudomonas chlororaphis* Strain Sm3, Bacterial Antagonist of *Pratylenchus penetrans*.
- Hall, T.A. (1999) BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.
- Horak, I., Engelbrecht, G., van Rensburg, P. J. J., & Claassens, S. (2019). Microbial metabolomics: essential definitions and the importance of cultivation conditions for utilizing *Bacillus* species as bionematicides. In *Journal of Applied Microbiology* (Vol. 127, Issue 2, pp. 326–343). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/jam.14218>
- Jaishankar, J., & Srivastava, P. (2017). Molecular basis of stationary phase survival and applications. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 8, Issue OCT). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02000>
- Koichiro Tamura, Glen Stecher, and Sudhir Kumar (2021) MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution* 38:3022-3027
- Kong, J.O., Lee, S.M., Moon, Y.S., Lee, S.G., Ahn, Y.J., 2006. Nematicidal activity of plant essential oils against *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchoididae). *J. Asia-Pac. Entomol.* 9, 173–178.

- Kumar, K. K., & Dara, S. K. (2021). Fungal and bacterial endophytes as microbial control agents for plant-parasitic nematodes. In *International Journal of Environmental Research and Public Health* (Vol. 18, Issue 8, pp. 2–15). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijerph18084269>
- Letunic I and Bork P (2021) Nucleic Acids Res doi: 10.1093/nar/gkab301 Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation.
- Marchesi, J. R., Sato, T., Weightman, A. J., Martin, T. A., Fry, J. C., Hiom, S. J., & Wade, W. G. (1998). Design and Evaluation of Useful Bacterium-Specific PCR Primers That Amplify Genes Coding for Bacterial 16S rRNA. In *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* (Vol. 64, Issue 2).
- Migunova, V. D., & Sasanelli, N. (2021). Bacteria as biocontrol tool against phytoparasitic nematodes. In *Plants* (Vol. 10, Issue 2, pp. 2–16). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/plants10020389>
- Mohamed HI, El-Beltagi HS, Aly AA, Latif HH (2018) The role of systemic and non systemic fungicides on the physiological and biochemical parameters in *Gossypium hirsutum* plant, implications for defense responses. *Frese Environ Bull* 27(12):8585–8593
- Morgan, G.D., Stevenson, W.R., Macguidwin, A.E., Kelling, K.A., Binning, L.K. & Zhu, J. (2002b). Plant pathogen population dynamics in potato fields. *Journal of Nematology* 34, 189-193.
- Nascimento, F. X., Vicente, C. S. L., Barbosa, P., Espada, M., Glick, B. R., Mota, M., & Oliveira, S. (2013). Evidence for the involvement of ACC deaminase from *Pseudomonas putida* UW4 in the biocontrol of pine wilt disease caused by *Bursaphelenchus xylophilus*. *BioControl*, 58(3), 427–433. <https://doi.org/10.1007/s10526-012-9500-0>
- Palomares-Rius, J. E., Escobar, C., Cabrera, J., Vovlas, A., & Castillo, P. (2017). Anatomical alterations in plant tissues induced by plant-parasitic nematodes. *Frontiers in Plant Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01987>
- Parte, A. C., Sardà Carbasse, J., Meier-Kolthoff, J. P., Reimer, L. C., & Göker, M. (2020). List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(11), 5607–5612. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004332>

- Patel, S., & Gupta, R. S. (2020). A phylogenomic and comparative genomic framework for resolving the polyphyly of the genus bacillus: Proposal for six new genera of bacillus species, peribacillus gen. nov., cytobacillus gen. nov., mesobacillus gen. nov., neobacillus gen. nov., metabacillus gen. nov. and alkalihalobacillus gen. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(1), 406–438. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003775>
- PM 7/148 (1) Guidelines for the management of nematode collections used for the production and maintenance of reference material. (2021). *EPPO Bulletin*, 51(3), 507–548. <https://doi.org/10.1111/epp.12798>
- PM 9/1 (6) Bursaphelenchus xylophilus and its vectors: procedures for official control. (2018). In *EPPO Bulletin* (Vol. 48, Issue 3, pp. 503–515). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/epp.12505>
- Puntener, W., 1981. Manual for Field Trials in Plant Protection, 2nd edition. Ciba-Geiji Limited, Basle, Switzerland, p. 205.
- R Core Team (2021). R: A Language and environment for statistical computing. (Version 4.0) [Computer software]. Retrieved from <https://cran.r-project.org>. (R packages retrieved from MRAN snapshot 2021-04-01).
- Rich, J.R., Dunn, R.A. & Noling, J.W. (2004). Nematicides: Past and present uses. In: Chen, Z.X., Chen, S.Y. & Dickson, D.W. (Eds). Nematology advances and perspectives, volume 2. Wallingford, UK, CABI Publishing, pp. 1179-1220.
- Rooney, A. P., Price, N. P. J., Ehrhardt, C., Sewzey, J. L., & Bannan, J. D. (2009). Phylogeny and molecular taxonomy of the Bacillus subtilis species complex and description of Bacillus subtilis subsp. inaquosorum subsp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(10), 2429–2436. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.009126-0>
- Stirling, G.R. (1991). Biological control of plant parasitic nematodes. Brisbane, Australia, CAB International, 282 pp.
- van den Hoogen, J., Geisen, S., Routh, D., Ferris, H., Traunspurger, W., Wardle, D. A., de Goede, R. G. M., Adams, B. J., Ahmad, W., Andriuzzi, W. S., Bardgett, R. D., Bonkowski, M., Campos-Herrera, R., Cares, J. E., Caruso, T., de Brito Caixeta, L., Chen, X., Costa, S. R., Creamer, R., ... Crowther, T. W. (2019). Soil nematode abundance and functional group composition at a global scale. *Nature*, 572(7768), 194–198. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1418-6>

- Vicente, C. I. M. L. M. M. V. P. (n.d.). 2021\_*Vicente et al\_VidaRural*.
- Vicente, C. S. L., Nemchinov, L. G., Mota, M., Eisenback, J. D., Kamo, K., & Vieira, P. (2019). Identification and characterization of the first pectin methylesterase gene discovered in the root lesion nematode *Pratylenchus penetrans*. *PLoS ONE*, *14*(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212540>
- Whitehead, A.G. (1998). *Plant nematode control*. Wallingford, UK, CABI Publishing, 384 pp.
- Woese, C. R., Kandler, O., & Wheelis, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya (Euryarchaeota/Crenarchaeota/kingdom/evolution). In *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (Vol. 87).
- Yu Z, Xiong J, Zhou Q, Luo H, Hu S, Xia L, Yu Z (2015) The diverse nematocidal properties and biocontrol efficacy of *Bacillus thuringiensis* Cry6A against the root-knot nematode *Meloidogyne hapla*. *Invertebrate Pathol* 125:73–80
- Zhang J, Li Y, Yuan H, Sun B, Li H (2016) Biological control of the cereal cyst nematode (*Heterodera filipjevi*) by *Achromobacter xylosoxidans* isolate 09X01 and *Bacillus cereus* isolate 09B18. *Biol Control* 92:1–6
- Zinniel, D.K.; Lambrecht, P.; Harris, N.B.; Feng, Z.; Kuczmarski, D.; Higley, P.; Ishimaru, C.A.; Arunakumari, A.; Barletta, R.G.; Vidaver, A.K. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. *Appl. Env. Microbiol.* 2002, 68, 2198–2208.

## **ANEXOS**

## ANEXO 1 - Quantificação do gDNA

<b>Isolados</b>	<b>Concentração (ng/<math>\mu</math>L)</b>	<b>Ratio 260/280</b>	<b>Ratio 260/230</b>
<b>13C9</b>	54,1	1,90	0,98
<b>14C48</b>	346,1	1,91	2,31
<b>13C43</b>	133,3	0,99	0,84
<b>M3</b>	23,4	1,80	0,62
<b>14C26</b>	15,2	1,81	0,78
<b>4810</b>	37,2	1,77	1,21
<b>13C18</b>	10,6	1,99	0,48
<b>14C2</b>	15,7	1,86	0,51
<b>4809</b>	298,0	1,84	2,30
<b>MABN R01</b>	5,1	1,53	1,43

## ANEXO 2 - Percentagem de identidade entre as seqüências

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
JF338812.1 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> B8	1		99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,8	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,8	97,6	99,4	99,4	99,2	99,5	99,5	
OM909106.1 <i>Bacillus velezensis</i> JK-B-18	2	99,9		100,0	100,0	100,0	100,0	99,9	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	99,9	97,7	99,5	99,5	99,3	99,6	99,6
OM981129.1 <i>Bacillus licheniformis</i> HDZ07	3	99,9	100,0		100,0	100,0	100,0	99,9	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	99,9	97,7	99,5	99,5	99,3	99,6	99,6
Bacillus sp. 14C2	4	99,9	100,0	100,0		100,0	100,0	99,9	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	99,9	97,7	99,5	99,5	99,3	99,6	99,6
Bacillus sp. 4809	5	99,9	100,0	100,0	100,0		100,0	99,9	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	99,9	97,7	99,5	99,5	99,3	99,6	99,6
ON012848.1 <i>Bacillus velezensis</i> YY4	6	99,9	100,0	100,0	100,0	100,0		99,9	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	99,9	97,7	99,5	99,5	99,3	99,6	99,6
Bacillus sp. 13C43	7	99,8	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9		99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,8	97,6	99,4	99,4	99,2	99,5	99,5
ON102793.1 <i>Bacillus siamensis</i> HT1	8	99,9	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	99,9		100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	99,9	97,7	99,5	99,5	99,3	99,6	99,6
Bacillus sp. M3	9	99,9	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	99,9	100,0		100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	99,9	97,7	99,5	99,5	99,3	99,6	99,6
Bacillus sp. 14C26	10	99,9	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	99,9	100,0	100,0		100,0	100,0	100,0	100,0	99,9	97,7	99,5	99,5	99,3	99,6	99,6
Bacillus sp. 13C18	11	99,9	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	99,9	100,0	100,0	100,0		100,0	100,0	100,0	99,9	97,7	99,5	99,5	99,3	99,6	99,6
OM910713.1 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> BCFR07	12	99,9	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	99,9	100,0	100,0	100,0	100,0		100,0	100,0	99,9	97,7	99,5	99,5	99,3	99,6	99,6
OM661178.1 <i>Bacillus subtilis</i> TA	13	99,9	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	99,9	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0		100,0	99,9	97,7	99,5	99,5	99,3	99,6	99,6
OM060683.1 <i>Bacillus velezensis</i> LA-33	14	99,9	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	99,9	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0		99,9	97,7	99,5	99,5	99,3	99,6	99,6
KY807043.1 <i>Bacillus siamensis</i> JK-2	15	99,8	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,8	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9		97,8	99,4	99,4	99,2	99,5	99,5	
MT013383.1 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> EPS6	16	97,6	97,7	97,7	97,7	97,7	97,7	97,6	97,7	97,7	97,7	97,7	97,7	97,7	97,7	97,8		97,2	97,2	97,0	97,2	97,2
KM822599.1 <i>Bacillus subtilis</i> Jk-12	17	99,4	99,5	99,5	99,5	99,5	99,5	99,4	99,5	99,5	99,5	99,5	99,5	99,5	99,4	97,2		100,0	99,8	99,9	99,9	
OM866230.1 <i>Bacillus cabrialesii</i> Si428	18	99,4	99,5	99,5	99,5	99,5	99,5	99,4	99,5	99,5	99,5	99,5	99,5	99,5	99,4	97,2	100,0		99,8	99,9	99,9	
ON102033.1 <i>Bacillus halotolerans</i> LL-4	19	99,2	99,3	99,3	99,3	99,3	99,3	99,2	99,3	99,3	99,3	99,3	99,3	99,3	99,2	97,0	99,8	99,8		99,7	99,7	99,7
OL762394.1 <i>Bacillus subtilis</i> NT1	20	99,5	99,6	99,6	99,6	99,6	99,6	99,5	99,6	99,6	99,6	99,6	99,6	99,6	99,6	99,5	97,2	99,9	99,9	99,7		100,0
ON102775.1 <i>Bacillus subtilis</i> LL-16	21	99,5	99,6	99,6	99,6	99,6	99,6	99,5	99,6	99,6	99,6	99,6	99,6	99,6	99,6	99,5	97,2	99,9	99,9	99,7	100,0	
MK889231.1 <i>Bacillus wiedmannii</i> PJH	22	94,6	94,6	94,6	94,6	94,6	94,6	94,6	94,6	94,6	94,6	94,6	94,6	94,6	94,6	94,6	92,3	94,7	94,7	94,6	94,7	94,7
Bacillus sp. 13C9	23	94,6	94,6	94,6	94,6	94,6	94,6	94,6	94,6	94,6	94,6	94,6	94,6	94,6	94,6	94,6	92,3	94,7	94,7	94,6	94,7	94,7
KY307913.1 <i>Bacillus thuringiensis</i> M43	24	91,8	91,9	91,9	91,9	91,9	91,9	91,8	91,9	91,9	91,9	91,9	91,9	91,9	91,8	91,1	92,0	92,0	91,8	92,0	92,0	92,0
HM566575.1 <i>Bacillus</i> sp. SC45	25	94,6	94,7	94,7	94,7	94,7	94,7	94,6	94,7	94,7	94,7	94,7	94,7	94,7	94,7	92,4	94,8	94,8	94,6	94,8	94,8	
MF355367.1 <i>Bacillus cereus</i> N27	26	94,6	94,7	94,7	94,7	94,7	94,7	94,6	94,7	94,7	94,7	94,7	94,7	94,7	94,7	92,4	94,8	94,8	94,6	94,8	94,8	
NR 074540.1 <i>Bacillus cereus</i> ATCC14579	27	94,6	94,7	94,7	94,7	94,7	94,7	94,6	94,7	94,7	94,7	94,7	94,7	94,7	94,7	92,4	94,8	94,8	94,6	94,8	94,8	
KT719908.1 <i>Cytobacillus firmus</i> AMY 18.1	28	95,0	95,1	95,1	95,1	95,1	95,1	95,0	95,1	95,1	95,1	95,1	95,1	95,1	95,1	95,0	93,0	95,3	95,3	95,3	95,3	95,3
KU851036.1 <i>Bacillus</i> sp. ADMK80	29	95,0	95,1	95,1	95,1	95,1	95,1	95,0	95,1	95,1	95,1	95,1	95,1	95,1	95,1	95,0	93,0	95,3	95,3	95,3	95,3	95,3
MH894224.1 <i>Bacillus oceanisediminis</i> 9-CK-CTC-2	30	95,0	95,1	95,1	95,1	95,1	95,1	95,0	95,1	95,1	95,1	95,1	95,1	95,1	95,1	95,0	93,0	95,3	95,3	95,3	95,3	95,3
MH894252.1 <i>Bacillus oceanisediminis</i> 10-M-CTC-3	31	95,0	95,1	95,1	95,1	95,1	95,1	95,0	95,1	95,1	95,1	95,1	95,1	95,1	95,1	95,0	93,0	95,3	95,3	95,3	95,3	95,3
Bacillus sp. 4810	32	95,0	95,1	95,1	95,1	95,1	95,1	95,0	95,1	95,1	95,1	95,1	95,1	95,1	95,1	95,0	93,0	95,3	95,3	95,3	95,3	95,3
KT719930.1 <i>Cytobacillus firmus</i> AMY 5.1.1	33	94,8	94,9	94,9	94,9	94,9	94,9	94,8	94,9	94,9	94,9	94,9	94,9	94,9	94,8	92,8	95,2	95,2	95,2	95,2	95,2	
Bacillus sp. MABNR01	34	93,7	93,8	93,8	93,8	93,8	93,8	93,7	93,8	93,8	93,8	93,8	93,8	93,8	93,7	91,6	93,9	93,9	93,8	94,0	94,0	
OM992226.1 <i>Priestia aryabhatai</i> TCV	35	93,7	93,8	93,8	93,8	93,8	93,8	93,7	93,8	93,8	93,8	93,8	93,8	93,8	93,7	91,6	93,9	93,9	93,8	94,0	94,0	
ON366400.1 <i>Aeribacillus pallidus</i> EF60103	36	91,7	91,8	91,8	91,8	91,8	91,8	91,7	91,8	91,8	91,8	91,8	91,8	91,8	91,7	89,7	91,9	91,9	91,9	91,9	91,9	91,9

		22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
JF338812.1 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> B8	1	94,6	94,6	91,8	94,6	94,6	94,6	95,0	95,0	95,0	95,0	95,0	94,8	93,7	93,7	91,7
OM909106.1 <i>Bacillus velezensis</i> JK-B-18	2	94,6	94,6	91,9	94,7	94,7	94,7	95,1	95,1	95,1	95,1	95,1	94,9	93,8	93,8	91,8
OM981129.1 <i>Bacillus licheniformis</i> HDZ07	3	94,6	94,6	91,9	94,7	94,7	94,7	95,1	95,1	95,1	95,1	95,1	94,9	93,8	93,8	91,8
Bacillus sp. 14C2	4	94,6	94,6	91,9	94,7	94,7	94,7	95,1	95,1	95,1	95,1	95,1	94,9	93,8	93,8	91,8
Bacillus sp. 4809	5	94,6	94,6	91,9	94,7	94,7	94,7	95,1	95,1	95,1	95,1	95,1	94,9	93,8	93,8	91,8
ON012848.1 <i>Bacillus velezensis</i> YY4	6	94,6	94,6	91,9	94,7	94,7	94,7	95,1	95,1	95,1	95,1	95,1	94,9	93,8	93,8	91,8
Bacillus sp. 13C43	7	94,6	94,6	91,8	94,6	94,6	94,6	95,0	95,0	95,0	95,0	95,0	94,8	93,7	93,7	91,7
ON102793.1 <i>Bacillus siamensis</i> HT1	8	94,6	94,6	91,9	94,7	94,7	94,7	95,1	95,1	95,1	95,1	95,1	94,9	93,8	93,8	91,8
Bacillus sp. M3	9	94,6	94,6	91,9	94,7	94,7	94,7	95,1	95,1	95,1	95,1	95,1	94,9	93,8	93,8	91,8
Bacillus sp. 14C26	10	94,6	94,6	91,9	94,7	94,7	94,7	95,1	95,1	95,1	95,1	95,1	94,9	93,8	93,8	91,8
Bacillus sp. 13C18	11	94,6	94,6	91,9	94,7	94,7	94,7	95,1	95,1	95,1	95,1	95,1	94,9	93,8	93,8	91,8
OM910713.1 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> BCFR07	12	94,6	94,6	91,9	94,7	94,7	94,7	95,1	95,1	95,1	95,1	95,1	94,9	93,8	93,8	91,8
OM661178.1 <i>Bacillus subtilis</i> TA	13	94,6	94,6	91,9	94,7	94,7	94,7	95,1	95,1	95,1	95,1	95,1	94,9	93,8	93,8	91,8
OM060683.1 <i>Bacillus velezensis</i> LA-33	14	94,6	94,6	91,9	94,7	94,7	94,7	95,1	95,1	95,1	95,1	95,1	94,9	93,8	93,8	91,8
KY807043.1 <i>Bacillus siamensis</i> JK-2	15	94,6	94,6	91,8	94,7	94,7	94,7	95,0	95,0	95,0	95,0	95,0	94,8	93,7	93,7	91,7
MT013383.1 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> EPS6	16	92,3	92,3	91,1	92,4	92,4	92,4	93,0	93,0	93,0	93,0	93,0	92,8	91,6	91,6	89,7
KM822599.1 <i>Bacillus subtilis</i> Jk-12	17	94,7	94,7	92,0	94,8	94,8	94,8	95,3	95,3	95,3	95,3	95,3	95,2	93,9	93,9	91,9
OM866230.1 <i>Bacillus cabrialesii</i> Si428	18	94,7	94,7	92,0	94,8	94,8	94,8	95,3	95,3	95,3	95,3	95,3	95,2	93,9	93,9	91,9
ON102033.1 <i>Bacillus halotolerans</i> LL-4	19	94,6	94,6	91,8	94,6	94,6	94,6	95,3	95,3	95,3	95,3	95,3	95,2	93,8	93,8	91,9
OL762394.1 <i>Bacillus subtilis</i> NT1	20	94,7	94,7	92,0	94,8	94,8	94,8	95,3	95,3	95,3	95,3	95,3	95,2	94,0	94,0	91,9
ON102775.1 <i>Bacillus subtilis</i> LL-16	21	94,7	94,7	92,0	94,8	94,8	94,8	95,3	95,3	95,3	95,3	95,3	95,2	94,0	94,0	91,9
MK889231.1 <i>Bacillus wiedmannii</i> PJH	22		100,0	97,1	99,9	99,9	99,9	93,8	93,8	93,8	93,8	93,8	93,5	94,3	94,3	91,0
Bacillus sp. 13C9	23	100,0		97,1	99,9	99,9	99,9	93,8	93,8	93,8	93,8	93,8	93,5	94,3	94,3	91,0
KY307913.1 <i>Bacillus thuringiensis</i> M43	24	97,1	97,1		97,1	97,1	97,1	91,0	91,0	91,0	91,0	91,0	90,7	91,5	91,5	88,5
HM566575.1 <i>Bacillus</i> sp. SC45	25	99,9	99,9	97,1		99,8	99,8	93,7	93,7	93,7	93,7	93,7	93,6	94,3	94,3	90,9
MF355367.1 <i>Bacillus cereus</i> N27	26	99,9	99,9	97,1	99,8		100,0	93,9	93,9	93,9	93,9	93,9	93,6	94,2	94,2	91,1
NR 074540.1 <i>Bacillus cereus</i> ATCC14579	27	99,9	99,9	97,1	99,8	100,0		93,9	93,9	93,9	93,9	93,9	93,6	94,2	94,2	91,1
KT719908.1 <i>Cytobacillus firmus</i> AMY 18.1	28	93,8	93,8	91,0	93,7	93,9	93,9		100,0	100,0	100,0	100,0	99,2	96,0	96,0	92,8
KU851036.1 <i>Bacillus</i> sp. ADMK80	29	93,8	93,8	91,0	93,7	93,9	93,9	100,0		100,0	100,0	100,0	99,2	96,0	96,0	92,8
MH894224.1 <i>Bacillus oceanisediminis</i> 9-CK-CTC-2	30	93,8	93,8	91,0	93,7	93,9	93,9	100,0	100,0		100,0	100,0	99,2	96,0	96,0	92,8
MH894252.1 <i>Bacillus oceanisediminis</i> 10-M-CTC-3	31	93,8	93,8	91,0	93,7	93,9	93,9	100,0	100,0	100,0		100,0	99,2	96,0	96,0	92,8
Bacillus sp. 4810	32	93,8	93,8	91,0	93,7	93,9	93,9	100,0	100,0	100,0	100,0		99,2	96,0	96,0	92,8
KT719930.1 <i>Cytobacillus firmus</i> AMY 5.1.1	33	93,5	93,5	90,7	93,6	93,6	93,6	99,2	99,2	99,2	99,2	99,2		95,5	95,5	92,7
Bacillus sp. MABNR01	34	94,3	94,3	91,5	94,3	94,2	94,2	96,0	96,0	96,0	96,0	96,0	95,5		100,0	91,1
OM992226.1 <i>Priestia aryabhatai</i> TCV	35	94,3	94,3	91,5	94,3	94,2	94,2	96,0	96,0	96,0	96,0	96,0	95,5	100,0		91,1
ON366400.1 <i>Aeribacillus pallidus</i> EF60103	36	91,0	91,0	88,5	90,9	91,1	91,1	92,8	92,8	92,8	92,8	92,8	92,7	91,1	91,1	



### ANEXO 3 - MC controló

Games-Howell Post-Hoc Test – Mortalidade	Bacillus 4809	Bacillus 4810	Bacillus 13C9	Bacillus 13C18	Bacillus 13C43	Bacillus 14C48	Bacillus 14C2	Bacillus 14C26	Bacillus 14M3	Bacillus MARB-R01
Bacillus 4809	—	0.254	1.000	0.808	1.000	0.157	0.028	* 0.019	* 0.054	0.223
Bacillus 4810		—	0.195	0.149	0.217	0.977	0.159	0.112	0.376	0.987
Bacillus 13C9			—	0.807	1.000	0.138	0.011	* 0.007	** 0.028	* 0.200
Bacillus 13C18				—	0.225	0.126	<.001	*** <.001	*** <.001	*** 0.168
Bacillus 13C43					—	0.167	<.001	*** <.001	*** 0.003	** 0.224
Bacillus 14C48						—	0.376	0.262	0.857	1.000
Bacillus 14C2							—	0.336	0.023	* 0.457
Bacillus 14C26								—	0.021	* 0.331
Bacillus 14M3									—	0.905
Bacillus MARB-R01										—

Note. \* p < .05, \*\* p < .01, \*\*\* p < .001