

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
CÂMPUS DE CHAPADÃO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

LAÍS MAYARA MELO DURÉ

**BIOPROSPECÇÃO DE ISOLADOS DE *Bacillus* spp VISANDO INDUÇÃO DE
RESISTÊNCIA E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE SOJA**

CHAPADÃO DO SUL – MS
2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
CÂMPUS DE CHAPADÃO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

LAÍS MAYARA MELO DURÉ

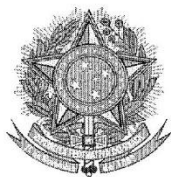
**BIOPROSPECÇÃO DE ISOLADOS DE *Bacillus* spp VISANDO INDUÇÃO DE
RESISTÊNCIA E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE SOJA**

Orientador: Prof. Dr. Cassiano Garcia Roque

Co- Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Marivaine da Silva Brasil

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Mato Grosso
do Sul, para obtenção do título de
Mestre em Agronomia, área de
concentração: Produção Vegetal.

CHAPADÃO DO SUL – MS
2018



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Campus de Chapadão do Sul



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

DISCENTE: Laís Mayara Melo Duré

ORIENTADOR (A): Prof. (a) Dr. (a) Cassiano Garcia Roque

**BIOPROSPECÇÃO DE ISOLADOS DE BACILLUS SSP. VISANDO INDUÇÃO
DE RESISTÊNCIA E PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DE PLANTAS DE
SOJA**

Prof.(a) Dr.(a) Presidente Marivaine da Silva Brasil

Prof.(a) Dr.(a) Rita de Cassia Felix Alvarez

Prof.(a) Dr.(a) Fabiana Fonseca Zanoelo

Chapadão do Sul, 06 de Abril de 2018.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todas as pessoas que me apoiaram e incentivaram. Em especial, ao meu namorado Cristovão Beltrão Batista.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Prof^a. Dr^a. Marivaine da Silva Brasil, pela orientação, confiança, paciência, “puxão de orelha” sempre que necessário, e principalmente pela dedicação e ajuda no desenvolver deste trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Bianca Obes Corrêa por me incentivar a continuar estudando e ingressar na Pós-graduação, pela amizade, conselhos, ensinamentos e por acreditar e usar seus conhecimentos para aprimorar este trabalho.

Aos técnicos de laboratório Carla e Emílio da UFMS – Campus Pantanal, por sempre se mostrarem dispostos a me auxiliar.

A todos do Laboratório de Microbiologia e Laboratório de Genética da UFMS – Campus Pantanal, em especial, as doutorandas Analice e Fernanda que estavam sempre dispostas a me ensinar a “temida” técnica da PCR.

Ao Rodrigo Galeano e Romário (Romer) que mantiveram-se firmes e fortes ao meu lado nas intermináveis tentativas de obter um bom produto de PCR, sempre sem perder o bom humor.

Aos estagiários do Laboratório de Fitossanidade da Universidade Anhaguera Uniderp – Agrárias, Lara, Rayane, Witer, Allan, Vitor Jesus, Romer Dias e aos demais pelo auxílio em implantar o experimento em casa de vegetação.

Ao meu pai pelo apoio financeiro.

Ao meu namorado Cristovão pelo companheirismo, que para suprir minha ausência passou a me acompanhar em várias avaliações (inclusive aos finais de semana).

Aos amigos que fiz durante estes dois anos, em especial, Fernanda Brito, Suzane Moura, FraN Amaral e Fernando Souza.

À Prof^a. Dr^a. Fabiana Fonseca Zanoelo e Prof^a. Dr^a Rita de Cássia Félix Alvarez, membros da banca pela disponibilidade em colaborar com este trabalho.

À Universidade Federal de Mato Grosso do Sul pela oportunidade de ingresso no Programa de Pós-Graduação em Agronomia.

À Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul – FUNDECT por conceder bolsa de incentivo para realização desta pesquisa.

À todos que contribuíram no desenvolvimento e finalização deste projeto.

EPÍGRAFE

*“O QUE PENSAMOS OU NO QUE ACREDITAMOS NÃO TEM MUITA
IMPORTÂNCIA. A ÚNICA COISA RELEVANTE É O QUE FAZEMOS.”*

John Ruskin

RESUMO

DURÉ, Laís Mayara Melo. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. **BIOPROSPECÇÃO DE *Bacillus* spp. VISANDO INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE SOJA.**

Professor Orientador: Cassiano Garcia Roque. Co-orientadora: Marivaine da Silva
Brasil

As doenças estão relacionadas aos principais fatores limitantes da produtividade da soja, tendo o uso de rizobactérias surgido como possibilidade no controle de doenças além de promover crescimento de plantas. Com isso, objetivou-se avaliar isolados do gênero *Bacillus* spp. como promotores de crescimento em plantas de soja da cultivar Potencia RR e M6210 IPRO, e seu potencial de biocontrole *in vitro* e *in vivo* de doenças. Para tanto, foram realizados testes de PCR utilizando os iniciadores ITUD, BACAB, MRSA e SFP que detectam genes biosintetizantes de substâncias antimicrobianas específicos para *Bacillus* spp. Nos testes de antibiose *in vitro*, os isolados foram submetidos a confrontamento direto com os fungos *Sclerotinia sclerotiorum*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani* e *Colletotrichum truncatum*. Foi avaliado também a capacidade das bactérias em promover crescimento de plantas de soja nas cultivares Potencia RR e M6210 IPRO. O delineamento foi inteiramente casualizado com 16 tratamentos constituídos por cinco repetições e as médias comparadas pelo Teste de Scott-Knott a 5%. No ensaio *in vivo*, sementes da cultivar Potencia RR foram microbiolizadas com suspensões dos isolados bacterianos com concentrações ajustadas para 10^9 UFC/mL⁻¹. O tratamento controle foi caracterizado por sementes microbiolizadas apenas em solução salina. A inoculação do fungo *S. sclerotiorum* ocorreu quando as plantas alcançaram o estágio V4 através da técnica das ponteiras. As avaliações da severidade da doença foram realizadas no período de 3, 5, 7, 9 e 11 dias após a inoculação, utilizando a escala de notas. A média dos valores de severidade de cada tratamento foram utilizadas para o cálculo da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD). O delineamento foi inteiramente casualizado com cinco repetições, sendo as médias comparadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os genes ITUD e BACAB foram detectados em 25% e 53% dos isolados, respectivamente, no entanto não foram obtidos produtos de amplificação para os outros iniciadores testados. Os isolados de *B. cereus* (VBE19 e VBE57) se destacaram por apresentar capacidade para biocontrole *in vitro* para os quatro patógenos testados. Os isolados VBN02 e VBE01 apresentaram potencial para promoção de crescimento de plantas de soja para as duas cultivares avaliadas, além do isolado VBE57 ter influenciado positivamente em mais de uma variável avaliada na cultivar M6210 IPRO, sugerindo ser promissor quanto sua aplicação como inoculante na cultura da soja. Dos oito isolados avaliados no ensaio de biocontrole *in vivo*, apenas VBE05 e VBE01 destacaram-se por proporcionar redução de 39,1% e 37,5% da AACPD, respectivamente, além atuarem positivamente desde a primeira avaliação, reduzindo a severidade da doença.

PALAVRAS-CHAVE: *Bacillus cereus*. Controle biológico. Rizobactérias.

ABSTRACT

DURÉ, Laís Mayara Melo. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. **BIOPROSPECTING of *Bacillus* spp. LOOKING FOR INDUCTION OF RESISTANCE AND PROMOTION OF SOYBEAN PLANTS GROWTH.**

Adviser: Cassiano Roque Garcia. Co-Adviser: Mariaveine da Silva Brasil.

The diseases are related to the main limiting factors of soybean yield, and The use of rhizobacteria came up as a possibility for the control of diseases besides promoting the growth of plants. The objective of this study was to evaluate isolates of the genus *Bacillus* spp. as growth promoters in soybean plants of cultivar Potencia RR and M6210 IPRO, and their biocontrol potential in vitro and in vivo of diseases. In order to do so, there were conducted PCR tests using the initiators ITUD, BACAB, MRSA, and SFP, which detect biosynthesizing genes of antimicrobial substances specific for the *Bacillus* spp. In the in vitro antibiosis tests, the isolates were submitted to direct confrontation with the fungi *Sclerotinia sclerotiorum*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani* and *Colletotrichum truncatum*. Also, it was evaluated the bacteria's capacity of promoting growth of soybean plants in the cultivars Potencia RR and M6210 IPRO. The design was the random one with 16 treatments formed by five repetitions and the means were compared by the Scott-Knott test at 5%. In the in vivo assay, seeds of cultivar Potencia RR were microbiolized with suspensions of the bacterial isolates with concentrations adjusted to 10^9 UFC/mL⁻¹. The control treatment was characterized by microbiolized seeds only in saline solution. The inoculation of the *S. sclerotiorum* fungus occurred when the plants reached the V4 stage through the technique of the tips. The assessments of the severity of the disease were carried out in the period of 3, 5, 7, 9 and 11 days after inoculation, using the scale of notes. The mean severity values of each treatment were used to calculate the area below the disease progress curve (AACPD). The design was completely randomized with five replicates, the means being compared by the Tukey test at 5% probability. The genes ITUD and BACAB were detected in 25% and 53% of the isolates, respectively. However, there was no attainment of amplifying products for the other tested initiators. , the isolates of *Bacillus* (VBE19 and VBE57) stood out due to its capacity for the biocontrol *in vitro* for the four pathogens tested, and for the promotion of growth stood out the isolates VBN02 and VBE01 for the two cultivars evaluated, as well as the isolate VBE57 for the cultivar M6210 IPRO, due to its positive influence in the majority of the studied variables, suggesting as promising to the application as inoculant in the soybean culture. Of the eight isolates evaluated in the in vivo biocontrol assay, only VBE05 and VBE01 stood out for providing a reduction of 39.1% and 37.5% of the AACPD, respectively, besides acting positively from the first evaluation, reducing disease severity.

KEY-WORDS: *Bacillus cereus*. Biological control. Rhizobacterias.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA		PÁGINA
1	Antibiose por confrontamento direto dos isolados de <i>Bacillus</i> spp. e os fungos fitopatogênicos.	36
2	Frequência dos metabólitos secundários (C.F= Compostos Fenólicos, Est. = Esteroides, Glic. Card. = Glicosídeos Cardiotônicos, Tan.= Taninos, Alc. = Alcalóides, Antoc.= Antocianinas, Flav.= Flavanóides, Aç. Red.= Açúcares Redutores, Cum.= Cumarinas, Triter.= Triterpenos e Antraq.= Antraquinonas) oriundos de folhas de soja da cultivar Potencia RR microbiolizadas com bactérias do gênero <i>Bacillus</i> spp.	43

LISTA DE TABELAS – Capítulo 1

TABELA		PÁGINA
1	Escala descritiva de notas para avaliação de mofo branco, baseada na proporção de infecção na planta.	32
2	Detecção de compostos antimicrobianos, utilizando iniciadores ITUD, BACAB, MRSA e SFP para os genes que codificam <i>bamD</i> , <i>ituD</i> , <i>fenF</i> , <i>bacAB</i> , <i>mrsA</i> e <i>sfp</i> . CPAN/UFMS, Corumbá – MS, 2017.	34
3	Índice de velocidade de emergência (IVE), número de nódulos (NN), massa fresca da parte aérea (MFPA), massa fresca das raízes (MFR), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca das raízes (MSR), altura de planta (ALT) e comprimento das raízes (CR) das cultivares de soja Potencia RR e M6210 IPRO, oriundas de sementes microbiolizadas com os isolados de <i>Bacillus cereus</i> com o inoculante Fertibio®.	38
4	Severidade do mofo branco aos 3, 5, 7, 9 e 11 dias após a inoculação e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em plantas de soja cultivar Potencia RR em casa de vegetação, oriundas de sementes anteriormente microbiolizadas com diferentes bactérias pertencentes ao gênero <i>Bacillus</i> spp.	40

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Doenças na soja	3
2.1.1 Mofo Branco	3
2.1.2 Antracnose	4
2.1.3 Podridão de Carvão	5
2.1.4 Mela ou Requeima	6
2.2 Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (RPCP)	7
2.2.1 Gênero <i>Bacillus</i>	11
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	12
CAPÍTULO 1 – SELEÇÃO DE <i>Bacillus</i> spp. PARA O CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS E PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DE SOJA	25
RESUMO	25
ABSTRACT	26
1. INTRODUÇÃO	27
2. MATERIAL E MÉTODOS	28
2.1 Isolados bacterianos	28
2.2 Detecção dos genes codificadores de substâncias antimicrobianas	28
2.3 Antibiose	29
2.4 Compatibilidade de <i>Bacillus</i> com <i>Bradyrhizobium japonicum</i> ...	30
2.5 Promoção de crescimento vegetal	30
2.6 Ensaio de biocontrole via microbiolização em casa de vegetação	31
2.7 Análise Fitoquímica	33
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4. CONCLUSÕES	45
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

1. INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L). Merrill) é a cultura que mais expandiu sua área produtiva nos últimos anos, apresentando considerável importância devido a utilização dos seus produtos e subprodutos pela indústria nacional (BEZERRA et al., 2015). O Brasil é segundo maior produtor mundial do grão, ocupando cerca de 34 milhões de hectares de área plantada, com produção de quase 114 milhões de toneladas na safra 2016/2017 (CONAB, 2017).

A produtividade da soja é afetada por interferência de doenças que afetam a cultura (VIECELLI; CARVALHO; DE MARCHI, 2014) que reduzem a produção e causam prejuízos econômicos (BERGAMIN FILHO et al., 2011). Estima-se que os danos anuais por doenças sejam de 15 a 20%, podendo resultar em perdas totais caso nenhuma medida de controle seja tomada pelo agricultor (EMBRAPA, 2007).

A utilização excessiva de agrotóxicos na agricultura causa inúmeros problemas como: contaminação ambiental, nos alimentos (THAKKAR; SARAF, 2015), além de ser danosa à saúde humana (MURALI et al., 2016). Na tentativa de minimizar os prejuízos causados pelo uso inapropriado de agrotóxico têm-se considerado a necessidade de reduzir o emprego de produtos químicos, buscando um sistema de produção apoiado nos princípios agroecológicos (MORANDI; BETTIOL, 2009).

Uma das práticas agroecológicas é o controle biológico de doenças de plantas, que surge como método de controle para o manejo de diferentes fitopatógenos (MORANDI; BETTIOL, 2009), envolvendo a redução da densidade populacional do patógeno, a proteção biológica da superfície de plantas e o controle dentro da planta (SILVEIRA, 2001).

Tendo em vista que a sustentabilidade com alta produtividade é um caminho a ser seguido na produção de alimentos, a utilização de micro-organismos vem a ser uma opção para a substituição e redução na utilização de produtos químicos (CASTRO; MELO, 2007; SHAHAROOMA et al., 2008), seja diretamente como bioinoculantes para controle biológico, ou como biofertilizantes para promoção de crescimento vegetal (FREITAS; AGUILAR-VILDOSO, 2004).

Diversas revisões apontam que bactérias que infectam as raízes de plantas são benéficas e diversificadas, capazes de contribuir para o crescimento vegetal e também de protegê-las contra doenças e estresses ambientais e atualmente são denominadas rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP) (De SOUZA; AMBROSINI; PASSAGLIA, 2015; VEJAN et al., 2016; BASU; RABARA; NEGI, 2017).

A eficiência desse grupo de bactérias em sintetizar as moléculas benéficas às plantas pode ser influenciada pela espécie bacteriana, estirpe, além das condições ambientais (De SOUZA; AMBROSINI; PASSAGLIA, 2015). Para se verificar a eficácia das RPCP's, as mesmas devem ser submetidas a experimentos em condições controladas e posteriormente em condições naturais para observação de desempenhos promissores (PÉREZ-MONTAÑO et al., 2014).

Entre as RPCP, o gênero *Bacillus* é um dos mais estudados, devido à produção de compostos que induzem o crescimento vegetal, bem como a capacidade deste em induzir resistência, além de exercerem antagonismo direto pela produção de compostos antimicrobianos (LATHA et al., 2011; WU et al., 2014). Além disso, essas bactérias têm características interessantes para uso como inoculante, como a produção de endósporos que lhe confere vantagens como sobrevivência a seca, além da facilidade de manipulação e aplicação podendo ser empregado com outros defensivos agrícolas (FREITAS; AGUILAR-VILDOSO, 2004).

A utilização de apenas um micro-organismo como bioinoculante em plantas já apresentam resultados eficientes, porém, demais estudos comprovam que a co-inoculação com mais de um micro-organismo pode apresentar melhor desenvolvimento vegetal na planta, podendo assim suprir as necessidades atuais relacionadas a sustentabilidade agrícola (HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO, 2013). De acordo com Araújo et al., (2010), a nodulação e a fixação biológico de nitrogênio pode ser incrementada através da co-inoculação de rizóbio e *Bacillus*.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar isolados do gênero *Bacillus* spp. como promotores de crescimento e suas habilidades como agentes de controle biológico e na indução de resistência de doenças na cultura da soja.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Doenças na soja

A soja é uma planta anual, ereta, autógama, que demonstra variabilidade quanto às suas características morfológicas, podendo seu tamanho variar de 30 a 200 cm de altura e apresentar ramificações, além de ser influenciada por múltiplas condições climáticas. Para cultivares precoces o ciclo completo é em torno de 70 dias e para as cultivares de ciclo tardio por volta de 200 dias (BORÉM, 1999).

A fenologia da planta permite agrupar e classificar os estádios de desenvolvimento da cultura da soja e associá-los com suas necessidades específicas no decorrer do seu ciclo (FARIAS; NEUMAIER; NEPOMUCENO, 2009).

As doenças são um dos principais fatores para uma menor produtividade da cultura da soja no Brasil, já sendo identificadas cerca de 40 doenças causadas por fungos, bactérias, nematóides e vírus. Esse número tende a aumentar devido a fatores como a monocultura e a expansão de novas áreas de plantio (GRIGOLLI, 2013).

Cada doença tem sua importância econômica que pode variar de ano para ano e de região para região, de acordo com as condições climáticas de cada safra. Estas, podem acarretar perdas de 15% a 20% anualmente na produção, no entanto, existem doenças que podem provocar perdas de quase 100% em plantações específicas (EMBRAPA, 2007).

2.1.1 Mofo Branco

O mofo branco é causado pelo *Sclerotinia sclerotiorum*, um fungo pertencente ao filo dos Ascomycota (INDEX FUNGORUM, 2017) cuja patogenicidade pode afetar mais de 400 espécies vegetais, além de ser considerado a segunda doença mais agressiva para a cultura da soja em todo o mundo (LI et al., 2010). Esta doença é responsável por causar grandes perdas em várias culturas e principalmente na soja, pois o fungo é largamente distribuído entre os grandes produtores mundiais do grão (WRATHER et al., 2001).

A doença inicia-se após os escleródios e os apotécios produzirem micélios e ascósporos, respectivamente, pois são eles os responsáveis pela infecção e colonização. A disseminação se dá principalmente pelas sementes infectadas, que podem apresentar o micélio do fungo, ou por meio da contaminação, devido à presença de estruturas de sobrevivência denominadas escleródios. Estes, presentes no solo em condições favoráveis germinam e formam apotécios, que produzem grande quantidade de ascósporos, fonte primária de infecção (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006).

De acordo com Meyer et al. (2016), estima-se que no território brasileiro este fungo esteja presente em mais de 20% das áreas produtoras de soja. Tendo-se boas condições de temperatura, em torno de 20°C e alta umidade relativa, o apotécio pode germinar de duas formas: mediante o crescimento micelial (germinação miceliogênica) que irá infectar diretamente os tecidos da planta ou por meio da formação do apotécio, ou geminação carpogênica na qual os ascósporos são liberados e provocam a infecção quando entram em contato com o tecido (STEADMAN; NICKERSON, 1975).

As medidas de controle da doença mais usuais são a rotação de cultura e uso de sementes certificadas, bem como o uso de fungicidas que, contudo, tem gerado resultados duvidosos (SUMIDA et al., 2015). O controle biológico é um método que vem sendo usado recentemente, já sendo obtido resultados efetivos com isolados de *Bacillus* (HU et al., 2016).

A ocorrência desta doença é mais comum em regiões de condições climáticas amenas, tais como na região sul e nas chapadas dos cerrados no Brasil, em altitudes superiores a 800 m, entretanto, está presente em todas as regiões produtoras de soja, até mesmo aquelas efetuadas em clima tropical (ALMEIDA et al., 2005), podendo as perdas ser superior a 40% (DEMANT, 2010; JACCOUD FILHO et al., 2010).

2.1.2 Antracnose

O fungo que causa a antracnose é o *Colletotrichum truncatum* (DAMM et al., 2009) cujas características são a formação de acérvulos escuros, com formato oval alongada e com presença de numerosas setas. Os conídios são

hialinos, unicelulares e curvos, com conidióforos na parte interna dos acérvulos (CARVALHO, 2009).

A infecção pode ocorrer em qualquer fase do seu desenvolvimento na cultura da soja, atingindo folhas, pecíolos, hastes, vagens e pedicelos, sendo que sua transmissão pode ser através de sementes infectadas onde os primeiros sintomas são observados no período da germinação causando “*damping-off*” em pré ou pós-emergência. Quando as plântulas emergem aparecem nos cotilédones lesões necróticas deprimidas de cor cinza a negra, o que pode acarretar a morte da plântula (BAILEY; JEGGER, 1992; CAMPOS; SILVA; SILVA, 2006).

Os indícios de ataque são mais visíveis na fase reprodutiva, quando as vagens estão se formando. O melhor ambiente para propagação da doença é aquele onde há maior precipitação pluviométrica, temperatura do ar elevada, alta densidade de plantas por metro linear, ausência de rotação de cultura nas áreas cultivadas e em casos de deficiência nutricional principalmente por potássio (SMML, 2015).

O controle deste patógeno é considerado difícil pois ele sobrevive em restos culturais e em outros hospedeiros. Quando a infecção ocorre nos ramos e vagens, em um longo período de tempo com as condições climáticas apropriadas à doença, afeta a produtividade da cultura. A perda total na produção pode ocorrer em função da alta redução do número de vagens, além de induzir a retenção foliar e a haste verde na planta (EMBRAPA, 2008).

C. truncatun desenvolve-se melhor em temperaturas diurnas de 26 °C a 28 °C, e noturnas de 18 °C a 20 °C, com umidade relativa do ar em torno de 80% e precipitação de 40 a 120 mm, com chuvas num período de 4 a 5 dias por semana (CARVALHO, 2009).

2.1.3 Podridão de Carvão

Macrophomina phaseolina é o fungo causador da podridão de carvão (GOMES, 2014), possui patogenicidade a mais de 500 espécies de plantas, incluindo culturas economicamente importantes, como a soja (GUPTA; SHARMA; RAMTEKE, 2012). Sua incidência nas lavouras de soja vem aumentando a cada safra no Brasil (CRUCIOL; COSTA, 2017), sua importância

se dá ao fato de afetar o sistema radicular da cultura da soja, tendo ocorrido principalmente em lavouras que não preparam o solo adequadamente antes do cultivo, fazendo com que as raízes tenham dificuldade em penetrar no solo compactado tendo assim, seu desenvolvimento prejudicado (ALMEIDA et al., 2005). Os microescleródios e picnídios são considerados fonte primária do inóculo, pois na ausência de hospedeiro suscetível ou em condições adversas, apresentam estruturas de resistência que possibilitam a sobrevivência do fungo (GOMES, 2014).

Os sintomas aparecem geralmente em formas de reboleiras durante o florescimento e enchimentos de grãos, no entanto, as plantas de soja podem ser infectadas pelo patógeno em qualquer fase do seu desenvolvimento (GUPTA; SHARMA; RAMTEKE, 2012). As lesões necróticas no sistema radicular, ramos, caule e pendúculo são sinais da doença na planta (NDIAYE, 2007), aparecendo na parte aérea entre 1 à 4 semanas antes da maturação (GUPTA e CHAUHAN, 2005), ocorrendo a morte da planta quando o fungo apresenta maiores índices de severidade (GOMES, 2014),

A transmissão da doença se dá por sementes contaminadas onde o micélio e microescleródios se manifestam no endosperma. (ALMEIDA, et al., 2005). O patógeno sobrevive no solo e em restos de culturais por vários anos, principalmente se as condições climáticas forem favoráveis (temperaturas entre 28° a 35°C), apresentando maiores danos quando a umidade relativa é baixa e as temperaturas elevadas (BORGES; ANDRADE; BORGES, 2015).

2.1.4 Mela ou Requeima

As doenças conhecidas como mela ou requeima da soja são causadas pelo fungo *Rhizoctonia solani*, e é tido como o mais prejudicial dentro do complexo de fungos que causam tombamento (GOULART, 2001), além de causar danos expressivos durante a fase de plântula, também servem de fonte de inóculo para as culturas seguintes (SILVA et al., 1996).

A presença do patógeno é de grande importância nas lavouras de soja por causar necrose foliar, queima das folhas e/ou mela além de lesões nas hastes e pecíolos, resultando em redução significativa na produção (FENILLE, 2001).

Os escleródios são responsáveis pela sobrevivência do fungo nos solos, no entanto, vivem saprofiticamente em restos culturais, no colo ou raízes de hospedeiros alternativos ou eventuais. O respingo das chuvas é a principal forma de disseminação do inóculo primário, pois carregam partículas de escleródios ou micélios para as folhas e pecíolos das plantas jovens antes do fechamento das entre-linhas na lavoura (HWANG; HOWARD; CHANG, 1996).

A ação do fungo é favorecida em regiões com temperatura em torno de 25 a 30°C, umidade relativa superior a 80% (EMBRAPA, 2004), solos mal drenados, excesso de irrigação e alto teor de matéria orgânica (BUZETO, 2001).

2.2 Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (RPCP)

O termo rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP) foi definido primeiramente por Kloepper e Schroth (1978) para descrever bactérias do solo que colonizam a rizosfera e raízes de plantas e que produzem compostos que estimulam o crescimento de plantas. Estas, surgem como possibilidade para reduzir a utilização contínua de fertilizantes químicos, herbicidas e inseticidas responsáveis por causar efeitos negativos no ambiente (PÉREZ-MONTAÑO et al., 2014).

As RPCP's afetam o crescimento das plantas de duas maneiras diferentes, indiretamente ou diretamente (Glick, 1995). Segundo Olanrewaju; Glick e Babalola (2017), os mecanismos diretos são aqueles cujas características bacterianas resultam na promoção de crescimento das plantas, tais como: produção de auxina, citocinina, giberelina, ACC desaminase, fixação de nitrogênio, solubilização de fósforo e sequestro de ferro por sideróforos bacterianos.

O mecanismo predominantemente mais utilizado para explicar os efeitos positivos das rizobactérias sobre o crescimento das plantas é a sua capacidade de produzir auxina (OLANREWAJU; GLICK; BABALOLA., 2017). Patten e Glick (1996) relataram que cerca de 80% dos micróbios da rizosfera poderiam sintetizar e liberar auxina como metabólito secundário. Auxinas conhecidas como ácido indol-3-acético (AIA) destacam-se como as mais relevantes (SPAEPEN; VANDERLEYDEN; REMANS, 2007).

As giberelinas são conhecidas pela estimulação e ativação de importantes processos relacionados ao crescimento, alongamento do caule, germinação de sementes, floração e frutificação (ZAIDI et al., 2015). A produção de giberelina por RPCP foi observada nos seguintes gêneros: *Achromobacter xylosoxidans*, *Gluconobacter diazotrophicus*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Rhizobia*, *Azotobacter* spp., *Bacillus* spp., *Herbaspirillum seropedicae* e *Azospirillum* spp. (DODD et al., 2010; DEKA; DEKA; BARUAH, 2015). Gray e Smith (2005) afirmam que bactérias do gênero *Bacillus* sp. produzem elevados níveis de giberelinas, que induzem efeitos positivos no crescimento de caules e galhos de diversas plantas.

As bactérias solubilizadoras de fosfato são capazes de converter fosfato orgânico e inorgânico insolúvel em uma forma que pode ser prontamente acessível as plantas, no entanto, condições ambientais e do solo, cepas bacterianas e até mesmo as plantas podem afetar a ação dos solubilizadores de fosfato (GUPTA et al., 2015). De acordo com Banerjee et al. (2005), os mais poderosos solubilizadores de fosfato são dos gêneros *Bacillus*, *Rhizobium* e *Pseudomonas*, assim como fixadores de nitrogênio não-simbionte, como *Azotobacter* e *Azospirillum* (SAHARAN; NEHRA, 2011).

Já os mecanismos indiretos referem-se aqueles cuja características bacterianas inibem a ação de um ou mais micro-organismos patogênicos de plantas, podendo ser tanto fungos como bactérias. Sua ação se dá através da produção de antibióticos, enzimas que degradam a parede celular, ACC deaminase, competição por nutrientes e indução de resistência sistêmica (OLANREWAJU; GLICK; BABALOLA., 2017).

O principal mecanismo usado pelas RPCP's para combater os efeitos deletérios de fitopatógenos é a síntese de um ou mais antibióticos (HAAS; KEEL, 2003; COUILLEROT et al., 2009; RAAIJMAKERS; MAZZOLA 2012). Entretanto, um antibiótico pode mostrar-se efetivo no controle de determinado patógeno em uma planta e não ser tão eficaz contra a infecção de outro patógeno na mesma planta (GLICK, 2012).

A síntese de compostos pelas RPCP pode mostrar diferenças variadas em suas ações em diferentes condições de campo. Além disso, a atividade de uma bactéria de controle biológico pode ser alterada pelo método de cultivo e

formulação da RPCP de biocontrole no laboratório antes do uso e seu modo de aplicação (GLICK, 2015).

As rizobactérias podem produzir uma grande variedade de compostos com atividade antimicrobiana usados como sistema de defesa. Estes incluem antibióticos de amplo espectro, ácido láctico produzido por lactobacilos, agentes líticos tais como lisozimas, numerosos tipos de exotoxinas e bacteriocinas, que também têm um modo de ação bactericida (RILEY; WERTZ, 2002). Muitos antibióticos são derivados de bactérias do gênero *Bacillus* e *Pseudomonas*, que produzem uma variedade de metabólitos que servem como antifúngicos, antibacterianos, antimicrobianos, agentes virais, fitotóxicos, antioxidantes e citotóxicos (GOSWAMI et al., 2016).

Segundo Pérez-Montaña et al. (2014), a resistência sistêmica induzida (RSI) e a resistência sistêmica adquirida (RSA) fazem parte das respostas de resistência sistêmica das plantas, sendo ativadas por certas moléculas de microrganismos denominados elicitores. Os elicitores são as moléculas que induzem as respostas da RSI, sendo que os polissacarídeos da parede celular são os elicitores bióticos mais descritos, juntamente com flagelos, ácido salicílico, lipopeptídeos cíclicos, sideróforos e antibióticos (SHUHEGGE et al., 2006; VAN LOON, 2007; RAMOS SOLANO et al., 2008; BERG, 2009).

A indução de resistência ocorre quando há um aumento da capacidade defensiva de uma planta quando essa é corretamente estimulada (VAN LOON; BAKKER; PIETERSE, 1998). De acordo com Barros et al. (2010), para o processo ser desencadeado é necessário que um sinal externo (elicitador) se ligue a um possível receptor na superfície da célula, ativando os mensageiros secundários, que amplificam o sinal e regulam a expressão de genes específicos, determinando o desenvolvimento de interações compatíveis (doença) ou incompatíveis (resistência). Bonaldo; Pascholati e Romeiro (2005) afirma que a indução de resistência pode ocorrer devido a infecção localizada ou também, por tratamentos com componentes ou produtos microbianos ou ainda, através de compostos orgânicos ou inorgânicos.

A resistência sistêmica induzida (RSI) é um processo no qual microrganismos não-patogênicos, incluindo RPCP, aliviam os efeitos deletérios dos patógenos de plantas ativando mecanismo de resistência nas plantas (VAN

LOON; BAKKER; PIETERSE, 1998). A RSI não tem como alvo patógenos específicos, mas sim estimula a planta contra uma variedade de patógenos diferentes, e não é expressada apenas no local da infecção. O pré-tratamento com uma RPCP apropriada, pode estimular reações mais rápidas e mais fortes das plantas ao ataque do agente causador da doença, induzindo assim, mecanismos de defesa da planta (OLANREWAJU; GLICK; BABALOLA., 2017). A resposta de defesa depende da sinalização do etileno e do ácido jasmônico na planta (VAN LOON, 2007). Em comparação, a SAR é tipicamente ativada por bactérias patogênicas e a molécula que desempenha um papel-chave é o ácido salicílico (PÉREZ-MONTAÑO et al., 2014).

No entanto, uma RPCP específica pode afetar o crescimento e desenvolvimento das plantas usando qualquer um ou mais desses mecanismos (BENEDUZI; AMBROSINI; PASSAGLIA, 2012). As rizobactérias são consideradas promissoras, pois, estudos destinados a compreender o modo como atuam positivamente na planta têm apresentado bons resultados (TENG et al., 2015; ZHAU et al., 2015; LOPEZ-GOMEZ et al., 2016; SYRANIDOU et al., 2016).

De acordo com Pérez-Montaña et al. (2014), uma vez que os candidatos a RPCP mostraram desempenho favorável sob condições controladas, estes, foram então usados como inoculantes para plantas cultivadas sob condições naturais em vasos e/ou ensaios de campo. A aplicação de RPCP em leguminosas tem sido restrita principalmente à manipulação de rizóbios para estudos de aumento do crescimento e desenvolvimento de leguminosas, especificamente por meio de nodulação e fixação de nitrogênio. A principal razão para isso, é que uma ampla variedade de espécies de rizóbios do solo que podem estabelecer simbiose com leguminosas (COOPER, 2008).

Os inoculantes microbianos incluem três grupos principais: fungos micorrízicos arbusculares, RPCP e simbiose de bactérias fixadoras de nitrogênio. A capacidade benéfica de cada grupo foi estudada separadamente (VERMA et al., 2010; MURRAY, 2011). Além disso, vários estudos vem sendo conduzidos para avaliar os efeitos do crescimento das plantas aplicando diferentes combinações microbianas ou consórcios (SWARNALAKSHMI et al., 2013).

Diferentes RPCP's podem ser administradas em lavouras pois algumas formulações comercialmente já encontram-se disponíveis (LUCY; REED; GLICK, 2004) e, recentemente, a popularidade de inoculantes microbianos aumentou consideravelmente, facilitada por pesquisas extensivas e sistemáticas que aumentaram a efetividade e consistência destes microrganismos (BERG, 2009; THAKORE, 2006). No entanto, é importante entender os mecanismos de promoção do crescimento das plantas para decidir que tipo de microrganismo é melhor usar com qual planta em uma determinada situação (PÉREZ-MONTAÑO et al., 2014).

2.2.1 Gênero *Bacillus*

As bactérias do gênero *Bacillus* são Gram-positivas, aeróbios obrigatórios ou facultativos, produtoras de enzima catalase, e se desenvolvem em diversas fontes de carbono, além de formam endósporos como estrutura de sobrevivência em períodos de estresse ambiental (MADIGAN et al., 2016).

Os micro-organismos deste gênero são onipresentes na natureza, devido ao fato de serem encontrados em diversos nichos ecológicos. Diferentes espécies foram isoladas de diversos habitats terrestres, marinhos e aquáticos (SIEFERT et al., 2000; MIRANDA; MARTINS; CLEMENTINO, 2008), tanto em ambientes de alta quanto em baixa temperatura (LOGAN et al., 2000), como também no interior de tecidos de diversas culturas, entre elas algodão (KAMPFER et al., 2015), milho (RIJAVEC et al., 2007) e trigo (LIU et al., 2009).

Apesar de algumas espécies de *Bacillus* produzirem toxinas prejudiciais à saúde humana e animal, muitas espécies deste gênero podem ser empregadas na produção de antibióticos, enzimas e outros metabólitos que são proveitosos para a indústria farmacêutica, de alimentos e agrícola (YOU et al., 2013).

Este gênero é considerado uma das principais rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP), sendo capazes de estimular o crescimento vegetal de forma direta ou indiretamente (GALDIANO JUNIOR, 2009). Dentre as RPCP's, estirpes do gênero *Bacillus* são mais estudados na agricultura por promover crescimento e apresentar potencial para atuar como agente de controle biológico de doenças e pragas, bem como estimular mecanismos capazes de aumentar a resistência de plantas a diversos estresses ambientais

como seca, metais pesados e escassez nutricional do solo (CLEMENTE et al., 2016).

As rizobactérias promovem benefícios na emergência e promoção de crescimento das plantas, pois são responsáveis pelo aumento da fixação de nitrogênio, solubilização de nutrientes, melhoria das condições do solo (SCHISLER et al., 2004), são efetivas no uso contra fungos fitopatogênicos (ARAÚJO et al., 2005), produzem hormônios vegetais como a giberelina (HOLL et al., 1988); citocinas (GRAY; SMITH, 2005), ácido indolacético (MOHITE, 2013) e ácidos láctico e succínico (YOSHIKAWA et al., 1993). De acordo com estudos realizados por Araújo e Hungria (1999), *Bacillus subtilis* (AP-3) ou seus metabólitos proporcionaram aumento no rendimento e incremento na nodulação de soja.

O controle biológico de doenças de plantas surge como alternativa para o manejo de fitopatógenos (MORANDI; BETTIOL, 2009), envolvendo a redução da densidade populacional do patógeno, a proteção biológica da superfície de plantas e o controle dentro da planta (SILVEIRA, 2001). Os *Bacillus* spp. são amplamente empregado como um importante agente de controle de doenças fúngicas (QIAO et al. 2013), podendo atuar por diferentes mecanismos de ação, tais como antibiose, parasitismo, competição ou indução de resistência (ROMEIRO, 2007; KUMAR et al., 2012; JI et al., 2013). Araújo et al. (2005) afirma que o antagonismo está relacionado a produção de antibióticos com potencial antifúngico como a iturina em *B. subtilis*.

Bactérias dos gêneros *Bacillus* destacam-se, pois conferem às plantas habilidade de ativar genes envolvidos na síntese de compostos associados à formação de barreiras físicas como formação de papilas, lignificação e tilose, ou bioquímicos, como o acúmulo de fitoalexinas e de proteínas relacionadas à patogênese (como b-1,3 glucanase e quitinase degradadoras da parede celular de fungos) (PASCHOLATI; LEITE, 1995), ou de mecanismos químicos de defesa, a partir da produção de diversas proteínas que estão envolvidas no processo de indução de resistência, como fitoalexinas e compostos fenólicos. Os compostos fenólicos comuns na resistência contra os patógenos podem ser produzidos em plantas saudáveis e também em plantas doentes, mas sua concentração aumenta quando ocorre a infecção provocada pelo patógeno

(EBEL,1986), sendo encontrados em todas as plantas e consistem de fenóis simples, ácido benzoico, cinâmico, cumarinas, taninos, ligninas, lignanos e flavonoides (KHODDAMI; WILKES; ROBERTS, 2013).

Diversos microrganismos podem induzir a formação de sinais no vegetal, ocasionando respostas de proteção contra um vasto número de fitopatógenos (SOBRINHO; PEREIRA; CAVALCANTI, 2005). Ongena et al. (2007) constataram a eficácia do uso de moléculas produzidas por *Bacillus subtilis*, onde estas moléculas podem agir como eliciadoras para ocasionar a indução de resistência, possibilitando a ação sistêmica de proteção contra o ataque de patógenos. Em estudos de biocontrole *in vitro* e *in vivo* contra patógenos causadores de doenças, SANGIOGO et al. (2014), relataram que em ensaios com folhas destacadas de canola, procedentes de sementes tratadas com bactérias dos gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus*, houve a redução de 100% do crescimento micelial de *S. sclerotiorum*.

O uso de *B. subtilis* resultou no controle de *Fusarium oxysporum* na cultura do grão-de-bico em condições *in vivo* (MORADI et al., 2012). Maketon; Apisitsantikul e Siriraweeikul (2008), avaliaram a eficiência de *B. subtilis* e *Trichoderma harsianum* contra *Ralstonia solanacearum*, *Pythium aphanidermatum* e *Cercospora nicotiana* na cultura do fumo e os microrganismos revelaram ser eficazes para o controle desses patógenos. Diante dos fatos explorados, a utilização de espécies de *Bacillus* como promotores de crescimento vegetal em plantas e agente de controle biológico para diversas culturas agrícolas, vem mostrando ser um método atrativo, eficiente e que causa menor dano ao meio ambiente em comparação ao uso de defensivos e fertilizantes químicos, tornando a utilização de bioagentes uma prática sustentável no âmbito econômico e ambiental (SHAFI; TIAN; JI, 2017).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, A. M. R.; FERREIRA, L. P.; YORINORI, J. T.; SILVA, J. F. V.; HENNING, A. A.; GODOY, C. V.; COSTAMILAN, L. M.; MEYER, M. C. Doenças da soja (*Glycine Max*). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de Fitopatologia: Doenças das Plantas Cultivadas**. 4ª ed. Ed. Ceres, Piracicaba. p. 569 - 588. 2005.

ARAÚJO, A. S. F. de; CARNEIRO, R. F. V.; BEZERRA, A. A. C.; ARAÚJO, F. F. de. Coinoculação rizóbio e *Bacillus subtilis* em feijão-caupi e leucena: efeito sobre a nodulação, a fixação de N₂ e o crescimento das plantas. **Ciência Rural**, v.40, n.1, 2010.

ARAÚJO, F. F.; HENNING, A. A.; HUNGRIA, M. Phytohormones and antibiotics produced by *Bacillus subtilis* and their effects on seed pathogenic fungi and on soybean root development. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 21, n. 8, p. 1639-1645, Dec. 2005.

ARAÚJO, F. F.; HUNGRIA, M. Nodulação e rendimento de soja co-infectada com *Bacillus subtilis* e *Bradyrhizobium japonicum*/B. *elkanii*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.34, p.1633-1643, 1999.

BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. *Colletotrichum*: Biology, Pathology and Control. Wallingford, UK: CAB International, 1992.

BANERJEE, M. R.; YESMIN, L.; VESSEY, J. K.; RAI, M. Plant-growth-promoting rhizobacteria as biofertilizers and biopesticides. Handbook of microbial biofertilizers. **Food Products Press**, New York, p.137–181, 2005.

BARROS, F. C.; SAGATA, E.; FERREIRA, L. C. C.; JULIATTI, F. C. Induction of resistance in plants against phytopathogens. **Biosci. J.**, Uberlândia, v.26, n.2, p. 231-239, 2010.

BASU, S.; RABARA, R.; NEGI, S. Towards a better greener future - an alternative strategy using biofertilizers. I: Plant growth promoting bacteria. **Plant Gene**, v.12, p.43-49, 2017.

BENEDUZI, A.; AMBROSINI, A.; PASSAGLIA, L. M. P. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. **Genetics and Molecular Biology**, v.35, n.4 (suppl), p.1044-1051, 2012.

BERG, G. Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. **Appl Microbiol. Biotechnol**, 84:.11-8, 2009.

BERGAMIM FILHO, A.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M. Importância das Doenças de Plantas. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIM FILHO, A.

(Ed.). **Manual de Fitopatologia Principios e Conceitos** Volume I. 4.ed. Piracicaba, Agronomia Ceres, 2011. p.19-36.

BEZERRA, A. R. G.; et al. Botânica e Fenologia. In: SEDIYAMA, T.; SILVA, F.; BORÉM, A. (Ed.) **Soja: do plantio à colheita**. UFV, Viçosa, p. 09-26, 2015.

BOLTON, M. D.; THOMMA, B. P. H. J.; NELSON, B. D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: Biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. **Molecular Plant Pathology**, v.11, p. 1-16, 2006.

BONALDO, S. M.; PASCHOLATI, S. F.; ROMEIRO, R. S. Indução de resistência: noções básicas e perspectivas. In: CAVALCANTI, L.; SOUZA; DI-PIERO, R. M.; PASCHOLATI, S. F.; RESENDE, M. L. V. de; ROMEIRO, R. da S. (Eds.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. 263 p.

BORÉM, A. Escape gênico. Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento (Encarte Especial), p. 101-107, 1999.

BORGES, E. P.; ANDRADE, D. F. A. A.; BORGES, R. A. Doenças da soja e seu controle. In: Borges, E.P. Pesquisa, tecnologia e produtividade: soja/ milho 2014/2015. Chapadão do Sul: Fundação Chapadão, cap.11, p.96-108, 2015.

BUZETO, A. L. **Caracterização e patogenicidade de grupos de anastomose de *Rhizoctonia* spp. associados à hortaliças**. Dissertação (Mestrado em Concentração – Proteção de Plantas). Universidade Estadual de São Paulo “Júlio Mesquita” – UNESP, Botucatu, 2001. 82p.

CAMPOS, H. D. O.; SILVA, L. H. C. P.; SILVA, J. R. C. Soja: Antracnose. **Cultivar Grandes Culturas** -ano 7, n.83, p.26-28, 2006.

CARVALHO, E. M. S. **Antracnose em feijão-fava: caracterização do agente causal e reação de genótipos a *Colletotrichum truncatum***. 2009, 53f. Tese (Doutorado em Agronomia, proteção vegetal). Unesp- Jaboticabal. 2009.

CASTRO, V. L. S. S.; MELO, I. S. Avaliação toxicopatológica em ratos expostos à *Pseudomonas putida*. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**. São Paulo, v.2, p.1-5, 2007.

CLEMENTE, J. M.; CARDOSO, C. R.; VIEIRA, B. S. E.; DA MATA FLOR, I.; COSTA, R. L. Use of Bacillus spp. as growth promoter in carrot crop. **African Journal of Agricultural Research**, Nairóbi, v. 11, n. 35, p. 3355-3359, Sep. 2016.

CONAB. 2017. Acompanhamento da safra brasileira. Grãos, safra 2016/2017 - 12º 382 Levantamento. Disponível em: http://www.conab.gov.br/zOlalaCMS/uploads/arquivos/38317_09_12_10_14_36_boletim_graos_setembro_2017.pdf. Acessado em 03 de novembro de 2017.

COOPER, J. E. Early interactions between legumes and rhizobia: disclosing complexity in a molecular dialogue. **J Appl Microbiol**, 103:1355–65, 2008.

COUILLEROT, O.; PRIGENT-COMBARET, C.; CABALLERO-MELLADO, J.; MOËNNE-LOCCOZ, Y. *Pseudomonas fluorescens* and closely-related fluorescent pseudomonads as biocontrol agents of soil-borne phytopathogens. **Lett Appl Microbiol**, v.48, p.505–512, 2009.

CRUCIOL, G. C. D.; COSTA, M. L. N. Influência de metodologias de inoculação de *Macrophomina phaseolina* no desempenho de cultivares de soja. **Summa Phytopathol.**, Botucatu, v. 43, n. 4, p. 337-343, 2017.

DAMM, U.; WOUDEBERG, J.H.C.; CANNON, P.F.; CROUS, P.W. Colletotrichum species with curved conidia from herbaceous hosts. **Fungal Diversity**, n.39, p.45-87, 2009.

De SOUZA R.; AMBROSINI, A.; PASSAGLIA, L. M. P. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. **Genetics and Molecular Biology**, v.38, n.4, p.401-419, 2015.

DEKA, H.; DEKA, S.; BARUAH, C. Plant growth promoting rhizobacteria for value addition: mechanism of action. In: Plant-growth promoting rhizobacteria (PGPR) and medicinal plants. **Springer**, New York, p.305–321, 2015.

DEMANT, C. A. R. Mofo branco e seu manejo no oeste baiano. **Boletim Passarela da Soja**, v. 2. Luís Eduardo Magalhães, Fundação Bahia, 32p, 2010.

DODD, I. C.; ZINOVKINA, N. Y.; SAFRONOVA, V. I.; BELIMOV, A. A. Rhizobacterial mediation of plant hormone status. **Ann Appl Biol**, v.157, p. 361–379, 2010.

EBEL, J. Phytoalexin synthesis: the biochemical analysis of the induction process. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.24, p.235-264, 1986.

EMBRAPA. Tecnologia de Produção de Soja - Região Central do Brasil 2009 e 2010. Londrina, PR, 2008. 261p.

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

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Soja. **Morte de plântulas de soja provocada pelo excesso de umidade e alta aeração do solo**. Londrina: Embrapa Soja, 2004. 38p. (Documentos, 239).

FARIAS, J. R. B.; NEUMAIER, N.; NEPOMUCENO, A. L. **Soja**. In: MONTEIRO, J. E. B. A. Agrometeorologia dos Cultivos: o fator meteorológico na produção agrícola. Brasília: Instituto Nacional de Meteorologia, p.261-277. 2009.

FENILLE, R. C. **Caracterização citomorfologica, cultural, molecular e patogênica de *Rhizoctonia solani* Kühn associado à soja no Brasil**, 2001. 138f. Tese (Doutorado em Concentração em Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2001.

FREITAS, S. S.; AGUILAR-VILDOSO, C. I. Rizobactérias e promoção do crescimento de plantas cítricas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.28, p.987-994, 2004.

GALDIANO JUNIOR., R. F. **Isolamento, identificação e inoculação de bactérias produtoras de auxinas associadas às raízes de orquídeas**. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 84 p. 2009.

GLICK, B. R. **Biocontrol mechanisms**. In: Beneficial plant-bacterial interactions. Springer, New York, p.123–157, 2015.

GLICK, B. R. Plant Growth-promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. Hindawi Publishing Corporation, **Scientifica**, 2012.

GLICK, B. R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. **Can J Microbiol**, v.41, p.109–117, 1995.

GOMES, C. J. A. ***Macrophomina phaseolina* em soja, padrão de ocorrência, danos e aspectos físicos, químicos e biológicos do solo relacionados à doença**. 2014. 39f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual do Norte do Paraná, Bandeirantes.

GOSWAMI, D.; THAKKER, J. N.; DHANDHUKIA, P. C.; TEJADA MORAL, M. Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): a review. **Cogent Food & Agriculture**, v.2, p.1, 2016.

GOULART, A. C. P. Fungos no algodão. Embrapa Agropecuária Oeste. **Cultivar**. Dourados, v.27, p.399-402, 2001.

GRAY, E.J.; SMITH, D.L. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.37, p. 395-412, 2005.

GRIGOLLI, F. J. Manejo de doenças na cultura da soja. 2013. 28p. Disponível em: <http://www.fundacaoms.org.br/base/www/fundacaoms.org.br/media/attachments/216/216/newarchive-216.pdf>.

GUPTA, G. K.; CHAUHAN, G. S. **Symptoms, Identification and Management of Soybean Diseases**. Technical Bulletin 10. Indore, India, National Research Centre for Soybean. 2005.

GUPTA, G. K.; SHARMA. S. K.; RAMTEKE, R. Biology, epidemiology and management of the pathogenic fungus *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid

with special reference to charcoal rot of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). **Journal of Phytopathology**, v.160, n. 1, p.167-180, 2012.

GUPTA, G.; PARIHAR, S. S.; AHIRWAR, N. K.; SNEHI, S. K.; SINGH, V. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): current and future prospects for development of sustainable agriculture. **J Microb Biochem Technol**, v. 7 p. 96–102, 2015.

HAAS, D.; KEEL, C. Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. **Annu Rev Phytopathol**, v. 41, p. 117–153, 2003.

HOLL, F. B.; CHANWAY, C. P.; TURKINGTON, R.; RADLEY, R. A. Response of crested wheatgrass (*Agropyron cristatum* L.), perennial ryegrass (*Lolium perenne*) and white clover (*Trifolium repens* L.) to inoculation with *Bacillus polymyxa*. **Soil biology and biochemistry**, San Diego, v. 20, n. 1, p. 19-24, Dec. 1988.

HU, X.; ROBERTS, D.; XIE, L.; MAUL, J. E.; YU, C.; LI, Y.; JIANG, M.; LIAO, X.; CHE, Z.; LIAO, X. Formulation of *Bacillus subtilis* BY-2 suppress *Sclerotinia sclerotiorum* on oilseed rape in the field. **Biol. Control**. v.70, p. 54-64, 2016.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M.A.; ARAUJO, R.S. Coinoculação de soja e feijão com rizóbio e azospirilla: estratégias para melhorar a sustentabilidade. *Revista Biologia e Fertilidade do solo*, v.49, p.791-801, 2013.

HWANG, S. F.; HOWARD, R. J.; CHANG, K. F. **Forage and oil seed legume diseases incited by *Rhizoctonia solani* species**. In: SNEH, B., JABAJI-HARE, S; NEATE, S.; DIJST, G. (Eds.). *Rhizoctonia* species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p.289-301, 1996.

Index fungorum. 2017. Disponível em: Acesso em: 16 de dezembro de 2017.

JACCOUD FILHO, D.S.; MANOSSO NETO, M.O.; VRISMAN, C.M.; HENNEBERG, L.; GRABICOSKI, E.M.G.; PIERRE, M.L.C.; BERGER NETO, A.; SARTORI, F.F.; DEMARCH, V.B.; ROCHA, C.H. Análise, Distribuição e Quantificação do “Mofo Branco” em Diferentes Regiões Produtoras do Estado do Paraná. **Resumos...** Reunião de Pesquisa de Soja da Região Central do Brasil, Brasília, Embrapa-Soja, 31, p.226-228, 2010.

JI, S. H.; PAUL, N. C.; DENG, J. X.; KIM, Y. S.; YUN, B. S.; YU, S. H. Biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* CNU114001 against fungal plant diseases. **Mycobiology**, v. 41, n. 4, p. 234-242, 2013.

KÄMPFER, P.; BUSSE, H. J.; MCINROY, J. A.; GLAESER, S. P. *Bacillus gossypii* sp. nov., isolated from the stem of *Gossypium hirsutum*. *International*

Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, London, v. 65, n. 11, p. 4163-4168, Nov. 2015.

KHODDAMI, A.; WILKES, M.A.; ROBERTS, T.H. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. **Molecules**, Basel, v.18, p.2328-2375, 2013.

KLOEPPER, J. W.; SCHROTH, M. N. **Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes**. Station de Pathologie Végétale et de Phytobactériologie, INRA, Angers, France In: Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, v. 2, p. 879–882, 1978.

KUMAR, A.; KUMAR, S.; DEVI, H.; PATIL, S.; PAYAL, C.; NEGI, S. Isolation, screening and characterization of bacteria from Rhizospheric soils for different plant growth promotion (PGP) activities: an in vitro study. *Recent Research in Science and Technology*, v.4, p.1-5, 2012.

LATHA, P.; ANAND, T.; PRAKASAM, V.; JONATHAN, E.I.; PARAMATHMA M.; SAMIYAPPAN, R. Combining *Pseudomonas*, *Bacillus* and *Trichoderma* strains with organic amendments and micronutrient to enhance suppression of collar and root rot disease in physic nut. **Applied Soil Ecology**, v.49, p.215-223, 2011.

LI, D.; SUN, M.; HAN, Y.; TENG, W.; LI, W. Identification of QTL underlying soluble content in soybean content in soybean white mold (*Sclerotinia sclerotiorum*). **Euphytica**, Wageningen, v. 172, p. 49-57, 2010.

LIU, B.; QIAO, H.; HUANG, L.; BUCHENAUER, H.; HAN, Q.; KANG, Z.; GONG, Y. Biological control of take-all in wheat by endophytic *Bacillus subtilis* E1R-j and potential mode of action. **Biological Control**, San Diego, v. 49, n.3, p. 277-285, Jun. 2009.

LOGAN, N. A.; LEBBE, L.; HOSTE, B.; GORIS, J.; FORSYTH, G.; HEYNDRIKX, M.; MURRAY, B. L.; SYME, N.; WYNN-WILLIAMS, D. D.; DE VOS, P. Aerobic endospore-forming bacteria from geothermal environments in northern Victoria Land, Antarctica, and Candlemas Island, South Sandwich archipelago, with the proposal of *Bacillus fumarioli* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 50, n. 5, p. 1741-1753, Sep. 2000.

LOPEZ-GOMEZ, M.; HIDALGO-CASTELLANOS, J.; LLUCH, C.; HERRERA-CERVERA, J. A. 24-Epibrassinolide ameliorates salt stress effects in the symbiosis *Medicago truncatula*-*Sinorhizobium meliloti* and regulates the nodulation in cross-talk with polyamines. **Plant Physiol. Biochem**, v. 108, p. 212–221, 2016.

LUCY, M.; REED, E.; GLICK, B. R. Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 86, n. 1, p. 1–25, 2004.

MADIGAN, M.; JOHN, M.; KELLY B.; DANIEL, B.; DAVID, S. Microbiologia de Brock, 14° ed. Porto Alegre: Artmed, 2016, 960 p.

MAKETON, M.; APISITSANTIKUL, J.; SIRIRAWEEKUL, C. Greenhouse evaluation of *Bacillus subtilis* AP-01 and *Trichoderma harzianum* AP-001 in controlling tobacco diseases. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39, p.296-300, 2008.

MEYER, M.C.; CAMPOS, H.D.; GODOY, C.V.; UTIAMADA, C.M. (Ed.). **Ensaio cooperativos de controle biológico de mofo branco na cultura da soja - safras 2012 a 2015**. Londrina: Embrapa Soja, 2016. 46 p. (Embrapa Soja, Documentos, 368).

MIRANDA, C. A.; MARTINS, O. B.; CLEMENTINO, M. M. Species-level identification of *Bacillus* strains isolates from marine sediments by conventional biochemical, 16S rRNA gene sequencing and inter-tRNA gene sequence lengths analysis. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 93, n. 3, p. 297-304, Mar. 2008.

MOHITE, B. Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. **Journal of soil science and plant nutrition**, Tokyo, v. 13, n. 3, p. 638-649, Set. 2013.

MORADI, H.; BAHRAMNEJAD, B.; AMINI, J.; SIOSEMARDEH, A.; HAJI-ALLAHVERDIPOOR, K. Suppression of chickpea (*Cicer arietinum* L.) *Fusarium* wilt by *Bacillus subtilis* and *Trichoderma harzianum*. **Plant Omics Journal**, v.5, p.68-74, 2012.

MORANDI, M.A.B.; BETTIOL, W. Controle Biológico de doenças de plantas no Brasil. IN: Controle de doenças de plantas: uso e perspectivas. (Eds. BETTIOL, W. e MORANDI, M.A.B.) Jaguariúna- SP. Embrapa Meio Ambiente, 2009, 341 p.

MURALI, M.; THRIVENI, M. C.; MANJULA, S.; MYTHRASHREE, S. R.; AMRUTHESH, K. N. Isolation of phosphate solubilizing fungi from rhizosphere soil and its effect on seed growth parameters of different crop plants. **Journal of Applied Biology Biotechnology**, v. 4, n. 6, p. 22-26, 2016.

MURRAY, J. D. Invasion by invitation: rhizobial infection in legumes. **Mol Plant Microbe Interact**, 24:631–9, 2011.

NDIAYE, M. **Ecology and management of charcoal rot (*Macrophomina phaseolina*) on cowpea in the Sahel**. 114f. PhD Thesis Wageningen University, the Netherlands, 2007.

OLANREWAJU, O. S.; GLICK, B. R.; BABALOLA, O. O. Mechanism of action of plant growth promoting bacteria. **World J. Microbiol Biotechnol**, v.33, p.197, 2017.

ONGENA, M.; JOURDAN, E.; ADAM, A.; PAQUOT, M.; BRANS, A.; JORIS, B.; ARPIGNY, J.L.; THONART, P. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. **Environmental Microbiology**, West Sussex, v.9, p.1084-1090, 2007.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: Mecanismos de resistência. In. BERGAMIM FILHO, A.; KIMATH, H.; AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, v.1, p. 417-454, 1995.

PATTEN, C.; GLICK, B. Bacterial biosynthesis of indole 3-acetic acid. **Can J Microbiol** v.42, p.207–220, 1996.

PÉREZ-MONTAÑO, F. P.; ALÍAS-VILLEGAS, C.; BELLOGÍN, R. A.; CERRO, P. del; ESPUNY, M. R. JIMÉNEZ-GUERRERO, I.; LÓPEZ-BAENA, F. J.; OLLERO, F. J.; CUBO, T. Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: From microorganism capacities to crop production. **Microbiological Research**, v. 169, p. 325–336, 2014.

RAAIJMAKERS, J. M.; MAZZOLA, M. Diversity and natural functions of antibiotics produced by beneficial and plant pathogenic bacteria. **Annu Rev Phytopathol**, v. 50, p. 403–424, 2012.

RAMOS SOLANO, B.; MAICAS, J. B.; PEREYRA DE LA IGLESIA, M. T.; DOMENECH, J.; GUTIÉRREZMA-NERO, F. J. Systemic disease protection elicited by plant growth promoting rhizobacteria strains: relationship between metabolic responses, systemic disease protection, and biotic elicitors. **Phytopathology**, 98:451–7, 2008.

RIJAVEC, T.; LAPANJE, A.; DERMASTIA, M.; RUPNIK, M. Isolation of bacterial endophytes from germinated maize kernels. **Canadian journal of microbiology**, Ottawa, v. 53, n. 6, p. 802-808, Jun. 2007.

RILEY, M. A.; WERTZ, J. E. Bacteriocins: Evolution, ecology, and application. **Annu Rev Microbiol**, v.56, p. 117-137, 2002.

ROMEIRO, R.S. **Controle biológico de enfermidades de plantas: fundamentos**. Viçosa: Editora UFV, 2007. 269 p.

SAHARAN, B. S.; NEHRA, V. Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. **Life Sci Med Res**, v. 21, p. 1–30, 2011.

SANGIOGO, M.; BERMUDEZ, J.M.M.; RODRIGUEZ, D.P.; BARBOZA, L.F.; MOCELLIN, R. Avaliação da indução de resistência por bactérias promotoras do crescimento de plantas a *Sclerotinia sclerotiorum* em folhas de canola. In: VII Reunião Brasileira de Indução de Resistência em Plantas a Patógenos, 2014.

SCHISLER, D. A.; SLININGER, P. J.; BEHLE, R. W.; JACKSON, M. A. Formulation of *Bacillus* spp. for biological control of plant diseases. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 94, n. 11, p. 1267-1271, Nov. 2004.

SHAFI, J.; TIAN, H.; JI, M. *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, Abingdon, v. 1, n. 1, p. 446-459, Apr. 2017.

SHAHAROONA, B.; NAVEED, M.; ARSHAD, M.; ZAHIR, Z.A. Fertilizer-dependent efficiency of *Pseudomonads* for improving growth, yield, and nutrient use efficiency of wheat (*Triticum aestivum* L.). **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.79, p.147- 155. 2008.

SHUHEGGE, R.; IHRING, A.; GANTNER, S.; BAHNWEG, G.; KNAPPE, C.; VOGG, G.; HUTZLER, P.; SCHMID, M.; VAN BREUSEGEM, F.; EBERL, L.; HARTMANN, A.; LANGEBARTELS, C. Induction of systemic resistance in tomato by N-acyl-homoserine lactone-producing rhizo-sphere bacteria. **Plant Cell Environ**, 29:909–18, 2006.

SIEFERT, J. L.; LARIOS-SANZ, M.; NAKAMURA, L. K.; SLEPECKY, R. A.; PAUL, J. H.; MOORE, E. R.; FOX, G. E.; JURTSCHUK, P. JR. Phylogeny of marine *Bacillus* isolates from the Gulf of Mexico. **Current Microbiology**, New York 41, n. 2, p. 84-88, Aug. 2000.

SILVA, J.B.; MATOS, J.A.R.; MICHEREFFI, S.J.; MARIANO, R.L.R. Efeito da bacterização de sementes de algodoeiro no controle da *Rhizoctonia solani*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.21, p.342-348, 1996.

SILVEIRA, E. B. Bactérias promotoras de crescimento de plantas e biocontrole de doenças. In: Proteção de Plantas na Agricultura Sustentável (Eds. MICHEREFF, S.J.; BARROS, R.). Recife, UFRPE. 2001, 368 p.

SMML. 2015. Systematic Mycology and Microbiology Laboratory Fungus-Host 456 Database. Disponível em: http://nt.ars-grin.gov/fungalbases/fungushost/457_new_frameFungusHostReport.cfm. Acessado em 02 de novembro de 2017.

SOBRINHO, C.A.; FERREIRA, P.T.O. e CAVALCANTI, L.S. **Indutores abióticos**. In: CAVALCANTI, L.S., DI PIERO, R.M., CIA, P., PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. (Eds.) Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos. Piracicaba SP. FEALQ, p.51-80, 2005.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS Microbiol Re**, v. 31, p. 425–448, 2007.

STEADMAN, J. R.; NICKERSON, K. W. Differential inhibition of sclerotial germination in *Whetzelinia sclerotiorum*. **Micopathologia, Dordrecht**, v. 57, p. 165-170, Dec. 1975.

SUMIDA, C. H.; CANTERI, M. G.; PEITL, D. C.; TIBOLLA, F.; ORSINI, I. P.; ARAÍJO, F. A.; CHAGAS, D. F.; CALVOS, N. S. Chemical and biological control of *Sclerotinia* stem rot in the soybean crop. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 45, n. 5, p. 760-766, May. 2015.

SWARNALAKSHMI, K.; PRASANNA, R.; KUMAR, A.; PATTNAIK, S.; CHAKRAVARTY, K.; SHIVAY, Y. S.; SINGH, R.; KUMAR-SAXENA, A. Evaluating the influence of novel cyanobacterial biofilmed biofertilizers on soil fertility and plant nutrition in wheat. **Eur J Soil Biol**, 55:107–16, 2013.

SYRANIDOU, E.; CHRISTOFILOPOULOS, S.; GKAVROU, G.; THIJS, S.; WEYENS, N.; VANGRONSVELD, J.; KALOGERAKIS, N. Exploitation of endophytic bacteria to enhance the phytoremediation potential of the wetland helophyte *Juncus acutus*. **Front. Microbiol.**, v. 7, 2016. 1016p.

TENG, Y.; WANG, X.; LI, L.; LI, Z.; LUO, Y. Rhizobia and their bio-partners as novel drivers for functional remediation in contaminated soils. **Front. Plant Sci**, v. 6, 2015, 32p.

THAKKAR, A. SARAF, M. Development of microbial consortia as biocontrol agents for effective management of fungal disease in *Glycine max* L. **Archives of Phytoáthology and Protection**, v. 48, p. 459-474, 2015.

THAKORE, Y. The biopesticide market for global agricultural use. **Ind Biotechnol**, v. 2, p. 194–208, 2006.

VAN LOON, L. C. Plant responses to plant growth promoting bacteria. **Eur J Plant Pathol**, 119:243–54, 2007.

VAN LOON, L.C.; BAKKER, P.; PIETERSE, C.M.J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.36, p. 453-483, 1998.

VEJAN, P.; ABDULLAH, R.; KHADIRAN, T.; ISMAIL, S.; NASRULHAQ BOYCE, A. "Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Agricultural Sustainability-A Review." **Molecules**, v.21, n. 5, 2016.

VERMA, J. P.; YADAV, J.; TIWARI, K. N.; LAVAKUSH, S. V. Impact of plant growth promoting rhizobacteria on crop production. **Int J Agric Res**, 5:954–83, 2010.

VIECELLI, C. A.; CARVALHO, J. C.; DE MARCHI, F.H. Controle biológico de oídio da soja com a utilização da levedura *Saccharomyces cerevisiae* e leite *in natura*. *Revista Thêma et Scientia*, v.4, n.2, jul/dez, 2014.

WRATHER, J. A.; ANDERSON, T. R.; ARSYAD, D. M.; TAN, Y.; PLOPER, L. D.; PORTA-PUGLIA, A.; YORINORI, J. T. Soybean disease loss estimates for the top ten soybean-producing countries in 1998. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v. 23, n. 2, p. 115-121, 2001.

WU, Y.; YUAN, J.; RAZA, W.; SHEN, Q.; HUANG, Q. Biocontrol traits and antagonistic potential of *Bacillus amyloliquefaciens* Strain NJZJSB3 against *Sclerotinia sclerotiorum*, a causal agent of canola stem rot. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, 2014, p. 1327-1336.

YOSHIKAWA, M.; HIRAI, N.; WAKABAYASHI, K.; SUGIZAKI, H.; IWAMURA, H. Succinic and lactic acids as plant growth promoting compounds produced by rhizospheric *Pseudomonas putida*. **Canadian journal of microbiology**, Ottawa, v. 39, n. 12, p. 1150-1154, Feb. 1993.

YOU, Z. Q.; LI, J.; QIN, S.; TIAN, X. P.; WANG, F. Z.; ZHANG, S.; LI W.J. *Bacillus abyssalis* sp. nov., isolated from a sediment of the South China Sea. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 103, n. 5, May. 2013.

ZAIDI, A.; AHMAD, E.; KHAN, M. S.; SAIF, S.; RIZVI, A. Role of plant growth promoting rhizobacteria in sustainable production of vegetables: current perspective. **Sci Hortic**, v. 193, p. 231-239, 2015.

ZHAU, Y.; XIA, X.; YU, G.; WANG, J.; WU, J.; WANG, M.; YANG, Y.; SHI, K.; YU, Y.; CHEN, Z.; GAN, J.; YU, J. Brassinosteroids play a critical role in the regulation of pesticide metabolism in crop plants. **Sci. Rep.** 5, 9018, 2015.

CAPÍTULO 1 – SELEÇÃO DE *Bacillus* spp. PARA O CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS E PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DE SOJA

RESUMO

Objetivou-se, com este estudo, avaliar *in vitro* e *in vivo* o potencial de bactérias do gênero *Bacillus* spp. no controle de doenças, produção de compostos relacionados a defesa de plantas e *in vivo* a capacidade de promoção de crescimento de plantas de soja nas cultivares Potencia RR e M6210 IPRO. Para tanto, foram realizados testes de PCR utilizando os iniciadores específicos: ITUD, BACAB, MRSA e SFP que detectam genes biosintetizantes de substâncias antimicrobianas específicos para *Bacillus* spp. Nos testes de antibiose *in vitro*, os isolados foram submetidos a confrontamento direto com os fungos *Sclerotinia sclerotiorum*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani* e *Colletotrichum truncatum*. Foi avaliado também a capacidade das bactérias em promover crescimento de plantas de soja nas cultivares Potencia RR e M6210 IPRO. No ensaio de biocontrole *in vivo*, sementes da cultivar Potencia RR foram microbiolizadas com suspensões dos isolados bacterianos com concentrações ajustadas para 10^9 UFC/mL⁻¹. O tratamento controle foi caracterizado por sementes microbiolizadas apenas em solução salina. A inoculação do fungo *S. sclerotiorum* ocorreu quando as plantas alcançaram o estágio V4 através da técnica das ponteiras. As avaliações da severidade da doença foram realizadas no período de 3, 5, 7, 9 e 11 dias após a inoculação, utilizando a escala de notas. Os genes ITUD e BACAB foram detectados em 25% e 53% dos isolados, respectivamente, no entanto não foram obtidos produtos de amplificação para os outros iniciadores testados. Os isolados de *B. cereus* (VBE19 e VBE57) se destacaram por apresentar capacidade para biocontrole *in vitro* para os quatro patógenos testados. Os isolados VBN02 e VBE01 apresentaram potencial para promoção de crescimento de plantas de soja para as duas cultivares avaliadas, além do isolado VBE57 ter influenciado positivamente em mais de uma variável avaliada na cultivar M6210 IPRO, sugerindo ser promissor quanto sua aplicação como inoculante na cultura da soja. Dos oito isolados avaliados no ensaio de biocontrole *in vivo*, apenas VBE05 e VBE01 destacaram-se por proporcionar redução de 39,1% e 37,5% da AACPD, respectivamente, além atuarem positivamente desde a primeira avaliação, reduzindo a severidade da doença.

PALAVRAS-CHAVE: Antagonismo, controle biológico, indução de resistência, microbiolização, *Sclerotinia sclerotiorum*.

**SELECTION OF *BACILLUS* SPP. ISOLATES FOR THE BIOLOGICAL
CONTROL OF DISEASES AND FOR THE GROWTH PROMOTION OF
SOYBEAN**

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate *in vitro* and *in vivo* the potential of *Bacillus* spp. disease control, glass production related to plant defense and *in vivo* the growth capacity of soybean plants in Potencia RR and M6210 IPRO cultivars. In order to do so, there were conducted PCR tests using the specific initiators: ITUD, BACAB, MRSA, and SFP, which detect biosynthesizing genes of antimicrobial substances specific for the *Bacillus* spp. In the *in vitro* antibiosis tests, the isolates were submitted to direct confrontation with the fungi *Sclerotinia sclerotiorum*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*, and *Colletotrichum truncatum*. Also, it was evaluated the bacteria's capacity of promoting growth of soybean plants in the cultivars Potencia RR and M6210 IPRO. In the *in vivo* biocontrol assay, seeds of the cultivar Potencia RR were microbiolized with suspensions of the bacterial isolates with concentrations adjusted to 10^9 UFC/mL⁻¹. The inoculation of the pathogen occurred when the plants reached the V4 stage through the tips technique, where a cut was performed at 2.5 cm in the fourth trifolium petiole and a disposable tip was inserted with a fungal mycelium disc with 36 hours growth. The assessments of the severity of the disease were carried out in the period of 3, 5, 7, 9 and 11 days after inoculation, using the scale of notes. The genes ITUD and BACAB were detected in 25% and 53% of the isolates, respectively. However, there was no attainment of amplifying products for the other tested initiators. In the present study, the isolates of *Bacillus* (VBE19 and VBE57) stood out due to its capacity for the biocontrol *in vitro* for the four pathogens tested, and for the promotion of growth stood out the isolates VBN02 and VBE01 for the two cultivars evaluated, as well as the isolate VBE57 for the cultivar M6210 IPRO, due to its positive influence in the majority of the studied variables, suggesting as promising to the application as inoculant in the soybean culture. Of the eight isolates evaluated in the *in vivo* biocontrol assay, only VBE05 and VBE01 stood out for providing a reduction of 39.1% and 37.5% of the AACPD, respectively, besides acting positively from the first evaluation, reducing disease severity.

KEY WORDS: Antagonism; biological control; microbiolization; resistance induction; *Sclerotinia sclerotiorum*.

1. INTRODUÇÃO

As doenças são um dos principais fatores que limitam a alta produtividade da soja, apesar da posição brasileira como um dos maiores produtores dessa cultura, sendo já identificadas no Brasil em torno de 40 doenças causadas por fungos, bactérias, nematóides e vírus (YORINORI et al., 2005).

Entre as principais doenças fúngicas que atacam a parte aérea da soja estão: o mofo branco cujo agente causador é *Sclerotinia sclerotiorum* (LI et al., 2010), a antracnose causada por *Colletotrichum truncatum* (MANANDHAR; HARTMAN, 2008), e a mela ou requeima da soja causado por *Rhizoctonia solani* (GOULART, 2002) e a podridão do carvão, causada pelo fungo *Macrophomina phaseolina* que está entre as doenças mais importantes que afetam o sistema radicular (SMML, 2015).

O controle destes patógenos é difícil, uma vez que todos eles possuem estruturas de resistência e/ou produzem substâncias protetoras aos esporos, por este motivo o método de controle biológico pelo uso de bactérias apresenta-se como uma possibilidade de redução destes fitopatógenos, além de minimizar os efeitos negativos causados pelo uso dos defensivos agrícolas no ambiente e nos alimentos (THAKKAR; SARAF, 2015).

As rizobactérias promotoras de crescimento de vegetal (RPCV) são bactérias benéficas às plantas, capazes de promover o biocontrole, induzir o crescimento vegetal e aumentar a produtividade (ROMEIRO, 2007). O controle biológico realizado pelas RPCV pode ocorrer por mecanismos de ação como antibiose, competição por espaço e nutrientes, parasitismo, além da indução de resistência (KUMAR et al., 2012).

Diversos gêneros bacterianos são considerados RPCV, entre os gêneros mais estudados destacam-se: *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Azospirillum* e *Azotobacter* (ARAUJO, 2008), no entanto o gênero *Bacillus* é um dos mais pesquisado, devido à capacidade deste em induzir resistência e antagonismo direto pela produção de compostos antimicrobianos (LATHA et al., 2011; WU et al., 2014), produção de ácido indol-acético e sideróforos (WANI et al., 2007). Este gênero apresenta habilidade para uso como inoculante, pela capacidade de formação de endósporos que possibilita sobrevivência a seca, além da facilidade

de manipulação (FREITAS; AGUILAR-VILDOSO, 2004; LANNA FILHO et al., 2010).

Desta forma, objetivou-se, com este estudo, avaliar *in vitro* e *in vivo* o potencial de bactérias do gênero *Bacillus* spp. no controle de doenças, produção de compostos relacionados a defesa de plantas e *in vivo* a capacidade de promoção de crescimento de plantas de soja nas cultivares Potencia RR e M6210 IPRO.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Isolados bacterianos

Foram utilizadas 32 cepas de bactérias do gênero *Bacillus* spp. pertencentes a coleção do Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campus Pantanal/Brasil.

2.2 Detecção dos genes codificadores de substâncias antimicrobianas

O DNA dos isolados foi extraído seguindo protocolo de extração de Wizard® Genomic DNA Purification Kit. Após a extração o mesmo foi quantificado em espectrofotômetro a 260 nm.

A detecção de genes biosintetizantes de substâncias antimicrobianas foi realizada pela técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) utilizando os iniciadores específicos: ITUD [5'-TTG-AAY-GTC-AGY-GCS-CCT-TT-3' e 5'-TGC-GMA-AAT-AAT-GGS-GTC-GT-3'] para detectar simultaneamente os genes *bamD*, *ituD* e *fenF*, pertencentes à região genômica conservada que codifica malonil-CoA transacilase envolvida na biossíntese de bacillomicina-D, iturina e micosubilitina, respectivamente. E também os iniciadores BACAB [5'-CTT-CTC-CAA-GGG-GTG-AAC-AG-3' e 5'-TGT-AGG-TTT-CAC-CGG-CTT-TC-3'], MRSA [5'-GGG-TAT-ATG-CGG-TAT-AAA-CTT-ATG-3' e 5'-GTT-TCC-CCA-ATG-ATT-TAC-CCT-C-3'] e SFP [5'-ATG-AAG-ATT-TAC-GGA-ATT-TA-3' e 5'-TTA-TAA-AAG-CTC-TTC-GTA-CG-3'] foram utilizados para amplificar as regiões genômicas específicas, identificadas como genes *bacAB*, *mrsA* e *sfp*, que expressam bacilisina, mersacidina e surfactina, respectivamente (Chung et

al., 2008). Os pares de iniciadores ITUD, BACAB, MRSA e SFP tem produtos de amplificação com 482 pb, 815 pb, 597 pb e 675 pb, respectivamente.

Para as reações de PCR utilizou-se 30 ng de DNA, 1,6 pM de cada iniciador, 2,5 µL de tampão 10X, 0,5 µL de dNTP a 0,2 mM, 1,5 U de Taq DNA Polimerase Invitrogen, 3,0 mM de MgCl₂ e 9,2 µL de água ultrapura, para completar o volume final de 25 µL.

A amplificação foi realizada em termociclador Virci 96-Well Thermal Cycler seguindo o protocolo proposto por Chung et al. (2008), com modificações. As etapas da reação foram desnaturação a 95 °C por 1 minuto e mais 40 ciclos compostos de 95 °C por 30 segundos; temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores de 55° C ajustada para 58 °C por 45 segundos; e 72 °C por 45 segundos, para extensão. Finalizados os ciclos, uma extensão final a 72 °C, por 5 minutos.

Todos os produtos de PCR foram corados com 5 µL de tampão de amostra 1X contendo azul de bromofenol + SYBR® Green e submetidos a eletroforese a 50 V, utilizando-se gel de agarose a 1,5% em tampão TBE (Tris, ácido bórico e EDTA) e para observação do tamanho do produto amplificado foi usado o marcador Invitrogen 1 Kb Plus Ladder. Após eletroforese todo material foi visualizado em transluminador LCD Invitrogen Safe Imager TM 2.0.

Os isolados que apresentaram amplificações genômicas para os pares de iniciadores foram utilizados no ensaio subsequente.

2.3 Antibiose

A atividade antagonista dos isolados foi testada contra os fungos patogênicos *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum truncatum* e *Macrophomina phaseolina* pertencentes à coleção do Laboratório de Fitopatologia da Universidade Anhanguera Uniderp, utilizando a técnica de cultura pareada.

As bactérias foram crescidas em meio de cultura TSA (Trypticase soy ágar) por 24 horas, posteriormente as mesmas foram repicadas para placas contendo meio BDA (Batata-dextrose-ágar) para pareamento com disco de micélio (5,0 mm) do fungo. Placas contendo apenas o disco micelial dos fungos

fitopatogênicos foram utilizadas como testemunhas. Em seguida, as placas foram armazenadas em BOD a 22 °C com fotoperíodo de 12 horas de luz.

O delineamento foi inteiramente casualizado com três repetições e uma testemunha para cada isolado bacteriano.

Foram realizadas avaliações diárias do crescimento micelial, até que as testemunhas cobrissem toda a superfície das placas. As avaliações das placas foram qualitativas (presença de halos de inibição do crescimento dos fungos fitopatogênicos) e quantitativas (crescimento micelial), sendo as medições feitas com paquímetro digital.

2.4 Compatibilidade de *Bacillus* com *Bradyrhizobium japonicum*

Em duas placas de Petri contendo meio de cultura YMA (10 g de manitol, 0,5 g K₂PO₄, 0,2 g de MgSO₄·7H₂O, 0,1 g de NaCl, 0,5 g de extrato de levedura e 1000 mL de água destilada) foi repicada a bactéria do inoculante líquido pertence a espécie *Bradyrhizobium japonicum*, posteriormente, estas placas foram mantidas em câmara incubadora a 28 °C por 48 horas.

Em seguida, os *Bacillus* separadamente foram confrontados com a bactéria do inoculante, sendo usado duas repetições para cada *Bacillus* testado. Após 24 horas, foi avaliado o crescimento de ambos os micro-organismos.

2.5 Promoção de crescimento vegetal

Sementes de soja das cultivares Potencia RR e M6210 IPRO foram microbiolizadas com suspensão dos isolados bacterianos, sendo as concentrações dos mesmos ajustadas a $1,5 \times 10^9$ UFC/mL⁻¹.

A microbiolização consistiu em embeber as sementes por 30 minutos em suspensão de 0,3 µL de cada isolado separadamente para os tratamentos contendo somente os isolados de *Bacillus cereus* e 0,5 µL do inoculante de formulação líquida comercial Fertbio Soja® contendo as estirpes *Semia* 7079 e *Semia* 5080 (*B. japonicum*) com serconcentração bacteriana de $5,0 \times 10^9$ UFC/mL⁻¹. A testemunha consistiu de tratamento somente com rizóbio, além de testemunhas sem inoculante tratadas apenas com solução salina (NaCl 0,85%). Nos tratamentos co-inoculados, as sementes foram microbiolizadas com

suspensões de 0,5 µL de inoculante comercial e acréscimo de 0,3 µL de cada isolado bacteriano.

Em seguida, cinco sementes foram semeadas em vasos de 5,0 L contendo solo Neossolo Quartzarenico Órtico previamente adubado. A adubação corretiva foi feita com base na interpretação do resultado da análise química do solo, distribuindo-se 0,4 g/vaso de ureia para testemunha padrão e testemunha com inoculante. Nos demais tratamentos, foram aplicados 0,4 g/vaso KCl e 0,8 g/vaso de fertilizante fosfatado.

Os tratamentos estudados no ensaio de inoculação foram: T1 (testemunha padrão sem inoculante), T2 (VBE19), T3 (VBE03), T4 (VBN02), T5 (VBE05), T6 (VBE57), T7 (VBE01), T8 (VBE17), T9 (testemunha com inoculante), T10 (inoculante + VBE19), T11 (inoculante + VBE03), T12 (inoculante + VBN02), T13 (inoculante + VBE05), T14 (inoculante + VBE57), T15 (inoculante + VBE01) E T16 (inoculante + VBE17).

O delineamento foi inteiramente casualizado com cinco repetições, sendo as médias submetidas a análise de variância e comparadas pelo Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Durante 15 dias após a semeadura (DAS), foi avaliado o índice de velocidade de emergência (IVE) e posteriormente realizado o desbaste, deixando apenas duas plantas por vaso. Em 40 DAS, foram avaliados altura de plantas (cm plantas⁻¹), comprimento de raízes (cm plantas⁻¹) e número de nódulos, após as mesmas foram acondicionadas em sacos de papel e pesadas para determinação da matéria fresca (g plantas⁻¹); em seguida, levadas para estufa de ventilação de ar para secagem e obtenção da massa seca da raiz e parte aérea (g plantas⁻¹).

2.6 Ensaio de biocontrole via microbiolização em casa de vegetação

Os isolados de *Bacillus* spp. foram previamente cultivados em meio TSA por 24 horas à 28°C. Após esse período, foram preparadas suspensões com solução salina (NaCl 0,85%) para cada um dos isolados em concentrações ajustadas para 10⁹ UFC/mL⁻¹. Posteriormente, sementes de soja cv. Potencia RR foram imersas em solução salina contendo cada isolado de *Bacillus* spp. e

submetidas à agitação por 30 minutos. O tratamento controle foi caracterizado por sementes microbiolizadas apenas em solução salina.

Após a microbiolização, cinco sementes foram semeadas em vasos com capacidade de 5,0 L, contendo solo adubado conforme necessidade observada em análise química do solo. Após a emergência das plantas foi realizado o desbaste, deixando apenas uma planta por vaso.

Os tratamentos consistiram em: T1 (Testemunha), T2 (VBE23), T3 (VBE19), T4 (VBE05), T5 (VBE01), T6 (VBE57), T7 (VBE03), T8 (VBE17), T9 (VBN02).

A inoculação de *S. sclerotiorum* foi realizado quando as plantas alcançaram o estágio V4. Para tanto, foi realizado um corte à 2,5 cm de distância no pecíolo do quarto trifólio. Utilizou-se ponteiros descartáveis de 1000 µL cortadas em formato de cone para realizar a transferência do inóculo e manter a umidade. Cada ponteira cortada continha na sua extremidade um disco de micélio do fungo com 36 horas de crescimento.

Estas ponteiros foram introduzidas nos segmentos de pecíolo restantes de modo a promover o contato direto do micélio com a planta, bem como proteger o pecíolo além de manter a umidade no ponto de contato (PETZOLDT; DICKSON, 1996).

As avaliações da severidade da doença foram realizadas no período de 3, 5, 7, 9 e 11 dias após a inoculação (DAI), utilizando a escala de notas de Petzoldt e Dikson (1996) adaptada por Terán et al. (2006) (Tabela 1).

Tabela 1: Escala descritiva de notas para avaliação de mofo branco, baseada na proporção de infecção na planta.

Nota	Severidade
1	Plantas sem sintomas;
2	Invasão do fungo além do sítio de inoculação;
3	Invasão do fungo próximo ao primeiro nó;
4	Invasão do fungo até o primeiro nó;
5	Invasão do fungo além do primeiro nó;
6	Invasão do fungo próximo ao segundo nó
7	Invasão do fungo até o segundo nó;
8	Invasão do fungo além do segundo nó;
9	Morte da planta.

Fonte: Petzoldt e Dikson (1996) adaptada por Terán et al. (2006).

A média dos valores de severidade de cada tratamento foram utilizadas para o cálculo da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) (CAMPBELL; MADDEN, 1990). AACPD foi calculada através da fórmula:

$$AACPD = \sum [(l_i + l_{i+1})/2 \cdot (T_{i+1} - T_i)]$$

Onde: l_i = incidência na época da avaliação e T_i = tempo da avaliação i .

O delineamento foi inteiramente casualizado com cinco repetições, sendo as médias submetidas a análise de variância e comparadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

2.7 Análise Fitoquímica

Amostras de folhas de cada tratamento do ensaio de biocontrole via microbiolização em casa de vegetação foram coletadas e trituradas para realização da análise fitoquímica. o material triturado foi utilizado para obtenção do extrato etanólico a 14% (14g por 100mL de etanol 99,5%) que ficaram em repouso por um período de 24 horas. Posteriormente, as amostras foram filtradas, obtendo-se o extrato etanólico para realização da análise fitoquímica, de acordo com a metodologia descrita por MATOS (2009).

Os extratos foram avaliados por meio de uma sequência de reações qualitativas para: compostos fenólicos (reação de precipitação com cloreto férrico), flavonoides (reação de cianidina e ácido sulfúrico), taninos (reação com sais de ferro, precipitação de proteínas), teste de acidulação e alcalinização para detecção de antocianinas e catequinas, teste de fluorescência sob luz UV para cumarinas, triterpenos e esteróides (reação de Liebermann-Burchard), glicosídeos cardiotônicos (teste de Baljet e de Kedde), teste de espuma para os açúcares redutores (reação de Benedict) (MATOS, 2009).

As avaliações foram realizadas visualmente seguindo protocolo com três repetições, e os resultados foram confrontados com a testemunha (em branco) e também entre si para observação de alguma possível modificação da cor e precipitação com os extratos etanólicos originais. A existência da classe a qual pertence o metabólito secundário foi marcada como positivo (+) e a inexistência de cor e/ ou precipitação como negativo (-). As intensidades de cor foram denominadas como negativa (- = 0%), baixa (+ = 50%), moderada (++ = 75%) e alta (+++ = 100%) (FONTOURA et al., 2015).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos quatro pares de iniciadores utilizados para amplificação dos genes codificadores de substâncias antimicrobianas, apenas dois foram observados nos isolados utilizados nesse estudo. Para o par de iniciadores ITUD, foi observado produto de amplificação do tamanho esperado em 25% dos isolados (Tabela 2).

Tabela 2. Detecção de compostos antimicrobianos, utilizando iniciadores ITUD, BACAB, MRSA e SFP para os genes que codificam *bamD*, *ituD*, *fenF*, *bacAB*, *mrsA* e *sfp*. CPAN/UFMS, Corumbá – MS, 2017.

Isolados	Gênero	Iniciadores			
		ITUD	BACAB	MRSA	SFP
VBNO6	<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-
VBNO3	<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-
VBE11	<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-
VBE54	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	-	-	-	-
MRNO9	<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-
LRPO7	<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-
MRNO3	<i>Bacillus cereus</i>	-	+	-	-
LRPO4	<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-
MRP17	<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-
LRPO8	<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-
LRNO4	<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-
VBNO4	<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-
VBE12	<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-
VBNO5	<i>Bacillus cereus</i>	-	+	-	-
VBE23	<i>Bacillus cereus</i>	+	+	-	-
VBE19	<i>Bacillus cereus</i>	+	+	-	-
VBE03	<i>Bacillus cereus</i>	+	+	-	-
VBNO11	<i>Bacillus cereus</i>	-	+	-	-
VBNO2	<i>Bacillus cereus</i>	+	+	-	-
VBE05	<i>Bacillus cereus</i>	+	+	-	-
VBE57	<i>Bacillus cereus</i>	+	+	-	-
VBE06	<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-
VBE01	<i>Bacillus cereus</i>	+	+	-	-
VBE08	<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-
VBNO1	<i>Bacillus subtilis</i>	-	+	-	-
VBE02	<i>Bacillus cereus</i>	-	+	-	-
VBNO13	<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-
VBE22	<i>Bacillus cereus</i>	-	+	-	-
VBE21	<i>Alcaligenes faecalis</i>	-	+	-	-
VBE29	<i>Bacillus cereus</i>	-	+	-	-
VBE16	<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-
VBE17	<i>Bacillus cereus</i>	+	+	-	-
VBE41	<i>Bacillus cereus</i>	-	+	-	-

(+) = Presença do gene antimicrobiano através da visualização do produto de amplificação usando os iniciadores ITUD, BACAB, MRSA e SFP, (-) Ausência do gene antimicrobiano através da visualização do produto de amplificação usando os iniciadores ITUD, BACAB, MRSA e SFP.

Já os pares de iniciadores BACAB quando submetidos à mesma concentração ajustada para ITUD comprovaram que 53% dos isolados bacterianos apresentaram o gene *bacAB* (Tabela 2).

Os genes utilizados foram previamente descritos em *Bacillus* sp. (STEIN, 2005). Estudos realizados por Carrer Filho et al. (2015), apresentam produtos de amplificação de tamanho esperado, obtidos com os oligonucleotídeos iniciadores ITUD e BACAB, não detectando amplificações dos iniciadores SFP e MRSA.

De acordo com Li et al. (2012), a ausência de genes-alvo envolvidos na biossíntese de mersacidina e surfactina ocorre provavelmente devido a possíveis substituições e/ou inserções de bases no gene *sfP*, reportado para alguns isolados de *Bacillus* sp. produtores parciais dessas substâncias.

Stanković e colaboradores (2012), trabalhando com 205 bactérias do gênero *Bacillus* observaram que 81% apresentaram o gene necessário para a síntese de bacillomicina D, 54% foram positivos para a surfactina, 38% para iturina e 25% para fengicina. O estudo também constatou que a maior parte dos isolados testados foram capazes de produzir mais de um dos lipopeptídeos pesquisados.

Analisando a Figura 1, observa-se que os isolados VBE19 e VBE57 destacaram-se por inibir o crescimento micelial dos quatro patógenos utilizados, proporcionando reduções de 16,15% em *M. phaseolina* (Figura 1b) e 31,9% em *S. sclerotiorum* (Figura 1a), respectivamente.

Embora não tenha sido verificada diferença estatística significativa nos testes de antagonismo com culturas pareadas, todos isolados bacterianos apresentaram potencial inibitório para algum dos fungos fitopatogênicos avaliados.

A bactéria VBE05 apresentou redução de 14,1% do crescimento de *R. solani* quando comparado com a testemunha (Figura 1c). Na figura 1d, observa-se que dos quatro isolados capazes de produzir substâncias com potencial inibitório para *C. truncatum* novamente, VBE57 mostrou-se eficiente, inibindo o crescimento do fungo proporcionando nível de redução de 12% em relação a testemunha.

Durante os primeiros dois dias de avaliação, VBE23 possibilitou controle de *M. phaseolina* e *R. solani*, atrasando seu desenvolvimento, porém no último dia de avaliação, o fungo desenvolveu-se.

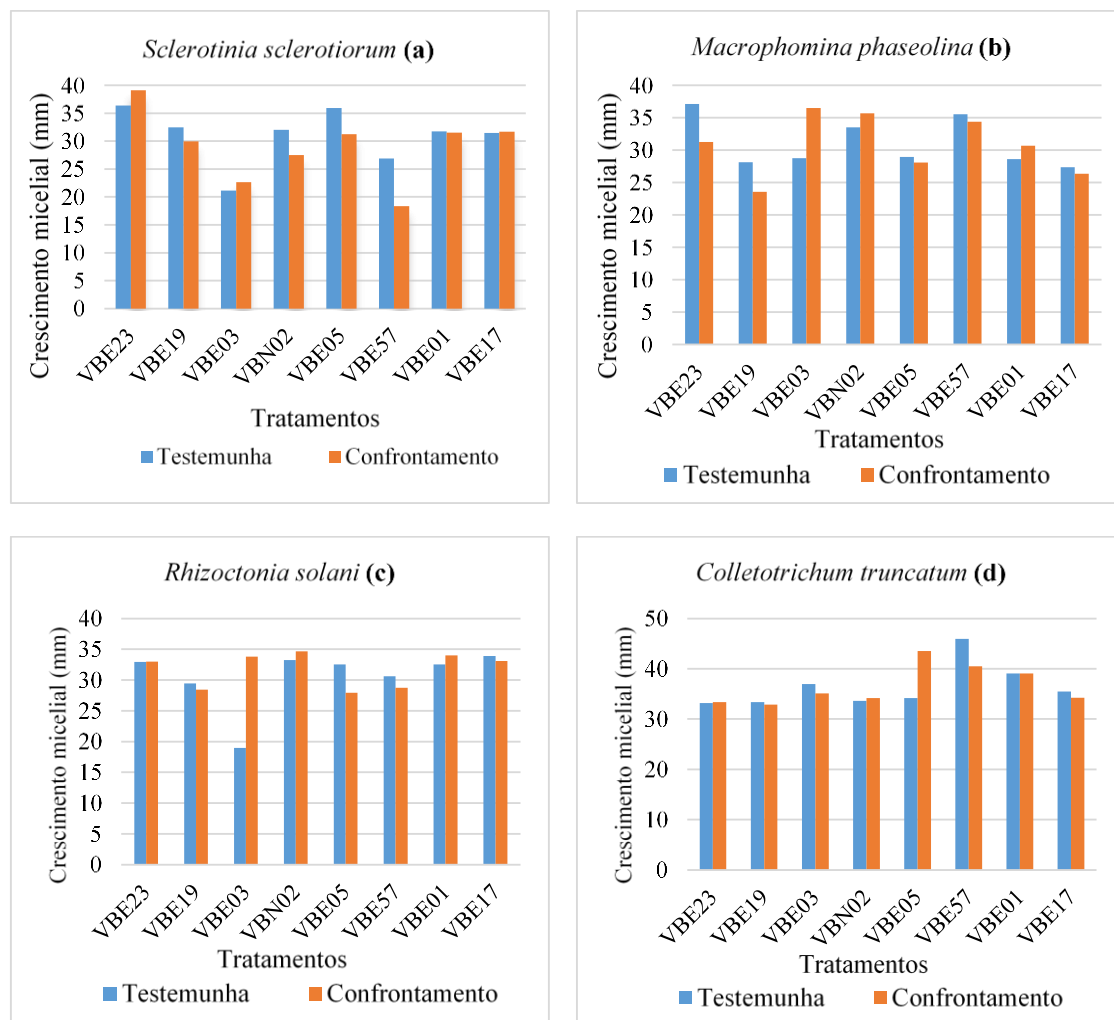


Figura 1: Antibiose por confronto direto dos isolados de *Bacillus* spp. e os fungos fitopatogênico.

Os ensaios de antibiose *in vitro* são indispensáveis no processo de seleção de isolados para biocontrole, pois possibilitam conhecer a competência e a variabilidade dos isolados quando submetidos ao confronto com patógenos. Os resultados deste trabalho, estão em concordância com os obtidos por Chung e colaboradores (2008) e Ayed et al. (2014), sobre a existência de substâncias antibióticas e antifúngicas produzidas por espécies de *Bacillus* contra fungos. No entanto, Sun et al. (2017) e Rahman et al. (2016) obtiveram

1 taxa de biocontrole de *S. sclerotiorum* superior à 80% com cepas de *B. subtilis*
2 (LHS11 e FX2) e *B. amyloliquefaciens*, respectivamente.

3 Quanto à avaliação de compatibilidade, apenas o isolado VBE23 não foi
4 utilizado neste ensaio, pois mostrou-se menos efetivo no ensaio de antibiose. Os
5 demais isolados bacterianos testados não interferiram no crescimento de *B.*
6 *japonicum*. Este resultado indica afinidade entre estes micro-organismos,
7 podendo os *Bacillus cereus* e o *Bradyrhizobium japonicum* serem utilizadas em
8 ensaios de co-inoculação.

9 A avaliação da compatibilidade *in vitro* foi critério utilizado por Mafia et al.
10 (2007) como forma de selecionar combinações de micro-organismos a serem
11 avaliadas *in vivo* comprovando ser uma estratégia eficiente, tendo em vista que
12 todas as combinações aqui testadas, não tiveram seu crescimento afetado. De
13 acordo com Hungria et al. (2013), a utilização de apenas um micro-organismo
14 como bioinoculante em plantas já apresentam resultados eficientes, porém,
15 demais estudos comprovam que a co-inoculação com mais de um micro-
16 organismo pode apresentar melhor desenvolvimento vegetal na planta, podendo
17 assim suprir as necessidades atuais relacionadas a sustentabilidade agrícola.

18 Em relação ao ensaio de promoção do crescimento, observa-se que para
19 a cultivar Potencia RR não foram encontradas diferenças significativas entre os
20 índices de velocidade de emergência, número de nódulos, massa seca da parte
21 aérea e comprimento de raízes (Tabela 3). No entanto, observa-se que o
22 tratamento T13 (inoculante + VBE05) destacou-se por apresentar maior número
23 de nódulos, ou seja, proporcionou incremento na nodulação, sugerindo uma
24 influência do *Bacillus* e do *Bradyrhizobium* inoculado (Tabela 3).

25 Os tratamentos T4 (VBE57), T5 (VBE05), T7 (VBE01) e T15 (inoculante +
26 VBE01) apresentaram médias significativas para altura de plantas, massa fresca
27 da parte aérea e massa fresca das raízes (Tabela 3). Para o parâmetro MSR,
28 T13 (inoculante + VBE05) e T15 (inoculante + VBE01) apresentaram maior
29 incremento de raiz diferindo estatisticamente dos demais tratamentos (Tabela
30 3).

31
32
33

Tabela 3: Índice de velocidade de emergência (IVE), número de nódulos (NN), massa fresca da parte aérea (MFPA), massa fresca das raízes (MFR), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca das raízes (MSR), altura de planta (ALT) e comprimento das raízes (CR) das cultivares de soja Potencia RR e M6210 IPRO, oriundas de sementes microbiolizadas com os isolados de *Bacillus cereus* com o inoculante Fertibio®.

POTENCIA RR								
TRAT.	IVE [†]	NN [†]	ALT*	MFPA*	MSPA [†]	MFR*	MSR*	CR [†]
T1	3,29	1,00	17,56a	1,12d	0,65	3,02c	0,19d	53,50
T2	2,42	4,00	16,12b	1,78b	0,88	4,18b	0,26c	65,37
T3	3,36	5,00	15,25b	1,82b	0,93	4,85a	0,30c	72,62
T4	2,61	4,00	18,31a	2,28a	1,10	4,45a	0,33b	65,00
T5	2,98	4,00	17,06a	1,97a	1,01	4,92a	0,37b	70,12
T6	3,04	13,50	16,87a	1,99a	0,99	4,08b	0,30c	61,37
T7	3,36	4,00	17,56a	2,02a	1,27	4,47a	0,37b	67,00
T8	3,33	5,00	16,68b	1,78b	0,96	5,01a	0,35b	72,62
T9	3,05	4,00	17,62a	1,54c	0,88	2,89c	0,21d	55,87
T10	2,61	15,5	16,62b	1,81b	1,04	4,39a	0,30c	65,50
T11	2,98	1,50	18,12a	1,71b	1,10	4,01b	0,28c	62,62
T12	3,17	0,00	16,00b	1,60c	1,09	3,99b	0,29c	71,25
T13	2,61	24,00	17,06a	1,79b	1,11	5,08a	0,43a	60,00
T14	2,98	1,00	17,18a	1,81b	1,04	4,05b	0,32c	61,12
T15	3,04	4,00	17,37a	2,12a	1,05	5,26a	0,41a	70,50
T16	3,11	18,5	16,93a	1,42c	1,02	3,72b	0,36b	60,88
CV (%) [‡]	21,47	89,66	8,32	17,12	18,43	18,51	17,51	19,90
M6210 IPRO								
TRAT.	IVE*	NN [†]	ALT*	MFPA*	MSPA [†]	MFR*	MSR*	CR*
T1	2,61b	0,50	18,50a	2,10c	0,95	2,62b	0,16b	60,50b
T2	3,27a	4,50	18,06a	3,29b	1,09	3,51b	0,23b	83,37a
T3	3,17a	6,00	16,56b	3,46b	1,19	2,97b	0,27b	81,37a
T4	2,76b	1,00	17,68a	4,45a	1,26	4,70a	0,36a	88,50a
T5	3,15a	4,50	17,37a	3,94a	1,04	4,57a	0,26b	74,62b
T6	2,58b	18,5	17,50a	3,89a	0,90	3,83b	0,22b	84,25a
T7	2,80b	13,50	17,56a	4,04a	0,95	3,70b	0,24b	69,75b
T8	2,86b	7,50	17,25a	3,54b	1,43	4,94a	0,35a	94,00a
T9	3,33a	3,00	18,87a	3,08b	0,87	3,76b	0,22b	67,12b
T10	2,53b	1,50	16,50b	3,40b	0,89	4,47a	0,32a	77,25b
T11	3,33a	2,00	18,00a	3,34b	0,90	3,78b	0,29a	66,87b
T12	3,54a	6,50	15,87b	3,14b	1,08	4,48a	0,32a	82,25a
T13	3,54a	21,00	16,12b	3,54b	1,04	3,71b	0,26b	72,81b
T14	2,53b	2,50	16,25b	3,62a	1,25	5,36a	0,37a	92,50a
T15	2,34b	5,50	16,56b	4,25a	1,81	4,24a	0,34a	89,50a
T16	3,50a	3,50	17,68a	3,18b	1,08	4,81a	0,36a	62,11b
CV (%) [‡]	21,18	124,59	9,05	11,89	18,48	25,13	25,66	22,74

†= não significativo, ‡ = Coeficiente de variação, *Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste Scott- Knott a 5% de probabilidade.

Para a cultivar M6210 IPRO, não foram constatadas diferenças significativas para número de nódulos e massa seca da parte aérea (Tabela 3). Porém, os tratamentos co-inoculados T12 (inoculante + VBN02) e T13

(inoculante + VBE05) apresentaram maiores índices de velocidade de emergência, diferindo estatisticamente de T1 (testemunha padrão sem inoculante) e T9 (testemunha com inoculante). Os tratamentos T4 (VBN02), T14 (inoculante + VBE57) e T15 (inoculante + VBE01) promoveram incremento de massa fresca da parte aérea, massa fresca das raízes, massa seca das raízes e comprimento de raiz (Tabela 3).

Discordando dos resultados obtidos neste ensaio para a cultivar Potencia RR, Bassan et al. (2001) em ensaios de tratamento de sementes com inoculante e sem inoculante, observaram que as sementes tratadas com inoculante tiveram sua velocidade de emergência acelerada. O fato de não haver diferenças significativas em determinada cultivar em relação a velocidade de emergência pode estar relacionada com a ausência de interação entre planta e bactéria, decorrente de características genéticas específicas da planta, como produção de exsudatos radiculares (KUSS et al., 2008).

Embora não tenham ocorrido diferenças significativas para número de nódulos, observou-se que houveram nodulações nos tratamentos com as cepas de *Bacillus* não inoculado, o que sugere a presença de rizóbio nativo no solo utilizado e acréscimo quando utilizados na co-inoculação. Os efeitos positivos na nodulação podem ser relacionados à produção de fitormônios, pectinase ou sinais moleculares, em *Bacillus cereus* (HALVERSON; HANDELSMAN, 1991). A co-inoculação pode promover o aumento da nodulação, desde que os compostos produzidos pelas espécies de *Bacillus* não sejam tóxicos ao rizóbio. (ARAÚJO; HUNGRIA, 1999).

Corroborando com os resultados deste trabalho, Saharan e Nehra (2011) constatou que espécies de *Bacillus* contribuem para a melhoria de comprimento de raízes, enraizamento e teor de matéria seca, enquanto que Moreira e Araújo (2013) verificaram que isolados de *Bacillus* spp. promoveram aumento de 53 a 167% de massa seca da parte aérea de *Eucalyptus urograndis*, quando comparado ao controle.

Huang et al. (2015) verificaram que plantas de milho e tomate tiveram seu crescimento promovido quando inoculados cepas de *Bacillus subtilis*, *B. atrophaeus* e *B. pumilus*. Ensaios realizados por Pandey et al. (2018), mostram que a combinação de *Bacillus pumilus* e *B. subtilis* em sementes de *Amaranthus*

hypochondriacus proporcionou um aumento de 32,2% na matéria seca das plantas, enquanto a inoculação com *B. subtilis* apresentou apenas um aumento de 29,53%. As linhagens de *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. cereus* e *B. amyloliquefaciens*) resultaram em efeitos benéficos no rendimento de tomates cultivados em casa de vegetação (ALMAGHRABI et al., 2013).

Em ensaio com *B. subtilis* conduzidos Araújo (2008) em plantas de soja, nota-se a média de altura de plantas foram superiores a verificada neste estudo para as duas cultivares. A discrepância entre os resultados obtidos neste parâmetro, sugere que as plantas sofreram estresse durante o cultivo devido as condições climáticas da região (elevadas temperaturas) durante as primeiras semanas após a semeadura. Os efeitos dessa interferência resultaram em plantas com baixa estatura, além de impulsionar uma floração precoce. Na fase inicial do ciclo da cultura, temperaturas estão inteiramente relacionadas ao florescimento precoce e o crescimento deficiente das plantas de soja semeadas em época normal (EMBRAPA SOJA, 2010).

Na avaliação de biocontrole do mofo branco “*in vivo*” observou-se que na maioria das variáveis avaliadas houve diferenças estatísticas, não sendo constatadas para a severidade da doença na avaliação que ocorreu aos sete dias após a inoculação (Tabela 4).

Tabela 4: Severidade do mofo branco aos 3, 5, 7, 9 e 11 dias após a inoculação e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em plantas de soja cultivar Potencia RR em casa de vegetação, oriundas de sementes anteriormente microbiolizadas com diferentes bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* spp.

Severidade da doença						
Tratamentos	3 dias*	5 dias*	7 dias [†]	9 dias*	11 dias*	AACPD*
Controle	3,40 b	3,60 b	3,80	4,10 b	4,80 b	31,20 b
VBE23	2,30 a	2,90 ab	2,90	3,00 ab	3,20 ab	23,50 ab
VBE19	2,50 ab	2,50 ab	2,60	2,60 a	2,60 a	20,50 a
VBE05	1,90 a	2,20 a	2,50	2,50 a	2,50 a	19,00 a
VBE01	1,90 a	2,10 a	2,60	2,70 ab	2,80 a	19,50 a
VBE57	2,20 a	2,80 ab	3,00	3,10 ab	3,40 ab	23,40 ab
VBE03	2,00 a	2,60 ab	2,90	3,00 ab	3,10 ab	22,10 ab
VBE17	2,00 a	2,50 ab	2,70	2,70 ab	3,00 ab	20,80 a
VBN02	2,40 ab	2,60 ab	2,80	3,50 ab	4,00 ab	24,2 ab
CV (%)[‡]	22,32	22,72	21,67	23,74	29,09	21,24

[†]= não significativo, [‡]= Coeficiente de variação, *Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

A severidade, ao longo dos onze dias de avaliações mostrou-se crescente em algumas plantas, no entanto, sete dias após a inoculação a severidade

1 permaneceu estagnada até a última avaliação nos tratamentos com os isolados
2 VBE19 e VBE05. Os tratamentos com os isolados VBE23 e VBE17
3 apresentaram paralização parcial entre cinco e sete dias após a inoculação,
4 respectivamente, porém o fungo retomou seu desenvolvimento (Tabela 4).

5 Considerando cada tratamento individualmente, destacou-se os isolados
6 VBE05 e VBE01, que reduziram a severidade do mofo branco
7 consideravelmente, proporcionando ao final do período avaliado, reduções de
8 39,1% e 37,5% da AACPD, respectivamente (Tabela 4). Assim como observado
9 para cada data de avaliação da severidade, individualmente, novamente estes
10 isolados mostraram-se efetivos, proporcionando menores índices de severidade
11 desde a primeira avaliação (Tabela 4).

12 Durante as avaliações diárias VBE17 mostrou bom desempenho apenas
13 na primeira avaliação (3 DAI), não diferindo do tratamento controle nas demais
14 dias avaliados. No entanto, estes resultados não interferiram no progresso da
15 área abaixo da curva de progresso da doença, diferenciando significativamente
16 do controle. De acordo com Ludwing e Moura (2007), esta inconsistência é
17 normal e pode ser atribuída a diferentes fatores. O método da ponteira no pecíolo
18 para inoculação de *Sclerotinia sclerotiorum* no ensaio de controle biológico foi
19 muito eficaz, tendo em vista que todos os pecíolos inoculados apresentaram
20 sintomas característicos da doença.

21 Os tratamentos cuja sementes foram microbiolizadas com *Bacillus spp.*
22 demonstraram maior eficiência na redução da severidade e progresso da doença
23 determinado pela área da curva de progresso da doença, em comparação com
24 o tratamento controle onde as sementes foram microbiolizadas apenas com
25 solução salina.

26 Resultados semelhantes com espécies do gênero *Bacillus* já foram
27 relatados por outros autores. Em estudos de biocontrole *in vitro* e *in vivo* contra
28 patógenos, SANGIOGO et al. (2014) relataram que em ensaios com folhas
29 destacadas de canola, procedentes de sementes microbiolizadas com bactérias
30 dos gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus*, proporcionou redução de 100% do
31 crescimento micelial de *S. sclerotiorum*. WU et. al (2014) demonstraram a
32 eficiência de *Bacillus sp*, que reduziu em 80% a ocorrência de mofo branco em
33 folhas destacadas de canola, via pulverização. ZHANG e XUE (2010), também

1 em ensaios com folhas destacadas de soja, pulverizadas com *Bacillus subtilis*,
2 constataram 90% de redução da severidade de sintomas causados por *S.*
3 *sclerotiorum*.

4 Lahlali et al. (2013), constatou-se que cepas de *B. subtilis* atuam como
5 indutores de resistência à antracnose na cultura do feijão, enquanto que Abdalla
6 e colaboradores (2014) testou capacidade antagonista de quarenta e cinco
7 isolados de *Bacillus*, destes, apenas vinte e sete produziram compostos
8 antimicrobianos contra o fungo fitopatogênico *Alternaria Alternata*.

9 Como o biocontrole geralmente não alcança percentual elevado, os
10 resultados obtidos para as cepas de *Bacillus* VBE01 e VBE05 podem ser
11 consideradas animadoras. De acordo com Lobo Junior (2013), o controle
12 biológico com o uso de microrganismos antagonistas é uma alternativa bastante
13 promissora no controle do mofo branco, pois auxilia na redução da densidade do
14 inóculo que o patógeno produz no solo e, conseqüentemente, tem-se uma menor
15 incidência e/ou severidade da doença.

16 Devido a facilidade em produzir compostos antimicrobianos, bactérias do
17 gênero *Bacillus* spp. são amplamente estudadas em ensaios de biocontrole
18 (ANGONESE et al., 2009; DALAL; KULKARNI, 2013).

19 Na Figura 2, observa-se que alguns isolados bacterianos auxiliaram
20 positivamente na produção de seis classes de metabólitos secundários. Os
21 isolados de *Bacillus cereus* (VBE01 e VBE17) influenciaram na produção de
22 compostos fenólicos.

23 Os esteroides foram evidenciados em maiores frequências nos
24 tratamentos utilizando as cepas VBE23, VBE19 e VBE05. Estes mesmos
25 isolados, mais, VBE03 e VBE17 proporcionaram frequências superiores á
26 observada no tratamento testemunha (Figura 2).

27 Os metabólitos secundários não exercem função evidente nas sequências
28 de crescimento e desenvolvimento vegetal, mas agem no sistema de defesa das
29 plantas contra patógenos, pois apresentam atividades biológicas relacionadas a
30 ação antimicrobiana (TAIZ; ZEIGER, 2009).

31 Os compostos fenólicos apresentam como mecanismo de ação no
32 sistema de defesa, a inibição do crescimento de fungos, pois inutilizam sistemas

enzimáticos que fazem parte da produção de energia e síntese dos constituintes estruturais dos micro-organismos (PORTE; GODOY, 2001).

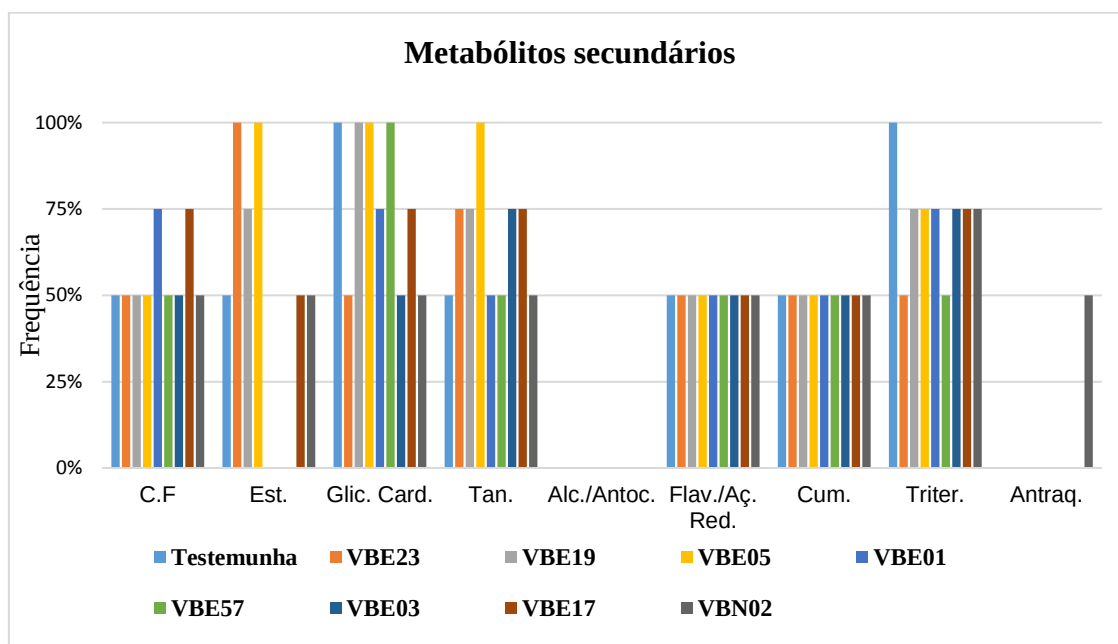


Figura 2: Frequência dos metabólitos secundários (C.F= Compostos Fenólicos, Est. = Esteroides, Glic. Card. = Glicosídeos Cardiotônicos, Tan.= Taninos, Alc. = Alcalóides, Antoc.= Antocianinas, Flav.= Flavanóides, Aç. Red.= Açúcares Redutores, Cum.= Cumarinas, Triter.= Triterpenos e Antraq.= Antraquinonas) oriundos de folhas de soja da cultivar Potencia RR microbiolizadas com bactérias do gênero *Bacillus* spp.

Assim como os compostos fenólicos, os taninos são os encarregados de proporcionar a resistência de tecidos vegetais jovens ao ataque de patógenos e, dessa maneira, são inibidores de várias enzimas hidrolíticas, que são produzidas por patógenos, durante a patogênese (AGRIOS, 2005). SANTOS (2004) relatou que as plantas que dispõem de uma grande quantidade de metabólitos secundários possuem um maior índice de sobrevivência, pois consequentemente são plantas com maior resistência a problemas ocasionados por fatores bióticos e, ou abióticos.

Os açúcares redutores, flavanóides e cumarinas foram evidenciados, em mesma frequência que o tratamento testemunha (Figura 2). Os flavonoides podem atuar como elicitores e também como mecanismos químicos que conferem proteção as plantas contra os fitopatógenos (ZUANAZZI; MONTANHA,

2004). CUSHNIE e LAMB (2005) afirmam que os flavonoides induzem alterações metabólicas nos patógenos, impedindo a síntese de ácido nucléico, a atividade da membrana citoplasmática e o metabolismo. A biossíntese e o acúmulo de flavonoides estão interligados a diversas funções nas plantas, como a proteção contra incidência de raios ultravioletas, contra insetos, fungos, vírus e bactérias, e também como mecanismo de defesa contra estresses ambientais (SIMÕES et al., 2010).

Os compostos cumarínicos estão presentes em plantas, principalmente nas folhas, frutas, raízes e talos (HOULT; PAYÁ, 1996). Neste estudo as cumarinas foram detectadas em todos os tratamentos com a mesma frequência da testemunha (Figuras 2). Segundo Pereira (2002) a produção de cumarinas é influenciada pela sazonalidade, condições ambientais ou estresses provocados por interação com microrganismos, os quais podem afetar a sua ocorrência em diversas partes da planta, nas quais possuem a função de proteção do vegetal contra infecções de fungos e contra herbívoros.

A presença de alcalóides e antocianinas não foram observadas nas amostras de folhas de soja avaliadas, entretanto, Brum et al. (2011) afirma que os resultados negativos não permitem afirmar a sua inexistência, pois o método utilizado pode não detectar constituintes na escala micro e ultramicro.

4. CONCLUSÕES

Os isolados de *B. cereus* (VBE19 e VBE57) se destacaram por apresentar capacidade para biocontrole *in vitro* para os quatro patógenos testados. Os isolados VBN02 e VBE01 apresentaram potencial para promoção de crescimento de plantas de soja para as duas cultivares avaliadas, além do isolado VBE57 ter influenciado positivamente em mais de uma variável avaliada na cultivar M6210 IPRO, sugerindo ser promissor quanto sua aplicação como inoculante na cultura da soja.

Os resultados obtidos indicam respostas de defesa a mofo branco via sementes microbiolizadas com os isolados bacterianos VBE01 e VBE05 e o potencial uso desses micro-organismos como agentes promissores no controle biológico em plantas de soja.

Os isolados VBE05, VBE19 e VBE17 auxiliaram positivamente na produção de classes de metabólitos secundários relacionados ao sistema de defesa em plantas de soja.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdalla SS., Algam SAA, Ibrahim EA, El Naim AM, 2014. *In Vitro* Screening of *Bacillus* Isolates for Biological Control of Early Blight Disease of Tomato in Shambat Soil. *World Journal of Agricultural Research*, 2: 47-50.
- Agrios GN., (2005) How plants defend themselves against pathogens. In: Agrios GN. (Ed.). *Plant Pathology*. 5. ed. California: Academic Press, p.93-114.
- Almaghrabi., OA., Massoud SI, Abdelmoneim TS, 2013. Influence of inoculation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on tomato plant growth and nematode reproduction under greenhouse conditions. *Saudi J Biol Sci*, 20, 57–61.
- Angonese MT., Della-Giustina J, Paim LH, Pansera MR, Pagno RS, Mezzomo F, Zorzi E, Pereira COF, Ribeiro RTS, 2009. Fungistatic effect of *Bacillus* spp on plant pathogenic fungi. *Revista Brasileira de Agroecologia*, 4(2): 97-100.
- Araujo FF, Hungria M. Nodulação e rendimento de soja co-infectada com *Bacillus subtilis* e *Bradyrhizobium japonicum*/B. *elkanii*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 34: 1633-1643.
- Araujo FF., 2008. Inoculação de sementes com *Bacillus subtilis*, formulado com farinha de ostra e desenvolvimento de milho, soja e algodão. *Ciência e Agrotecnologia*, 2: p.456-462.
- Ayed HB., Hmidet N, Béchet M, Chollet M, Chataigné G, Leclère V, Jacques P, Nasri M, 2014. Identification and biochemical haracteristics of lipopeptides from *Bacillus mojavensis* A21. *Process Biochemistry*, Amsterdam, 49: p.1699-1707.
- Bassan DAZ., Arf O, Buzetti S, Carvalho MAC, Santos NCB. Sá ME, 2001. Inoculação de sementes e aplicação de nitrogênio e molibdênio na cultura do feijão de inverno: Produção e qualidade fisiológica de sementes. *Revista Brasileira de Sementes*, 23: p.76-83.
- Brum TF., Zadra M, Froeder ALF, Boligon AA, Frohlich JK, Athayde ML, 2011. Análise fitoquímica preliminar das folhas de *Vitex Megapotamica* (Sprengel) Moldenke. Ahead of print, Santa Maria, 37: p.57-62.

- 1 CAMPBELL, L. C. L.; MADDEN, L. V. Introduction to plant disease epidemiology.
2 New York NY. John Wiley & Sons. 1990.
- 3 Carrer Filho R., Dianese ÉC, Cunha MD da, 2015. Suppression of Fusarium wilt
4 in tomato plants by rhizobacteria from the *Bacillus* genus. Pesq. Agropec. Trop,
5 45: 356-363. <http://dx.doi.org/10.1590/1983-40632015v4535397>
- 6 Chung S., Kong, H, Buyer JS, Lakshman DK, Lydon J, Kim SD, Roberts DP,
7 2008. Isolation and partial characterization of *Bacillus subtilis* ME488 for
8 suppression of soil borne pathogens of cucumber and pepper. Applied Microbial
9 Biotechnology, Berlin, 80: p.115-123. [https://doi.org/10.1007/s00253-008-1520-](https://doi.org/10.1007/s00253-008-1520-4)
10 4
- 11 Cushnie TT., Lamb AJ, 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. International
12 Journal of Antimicrobial Agents, 26: p. 343-356.
- 13 Dalal J., Kulkarni N, 2013. Antagonistic and Plant Growth Promoting Potentials
14 of Indigenous Endophytic Bacteria of Soybean (*Glycine max* (L) Merrill). Current
15 Research in Microbiology and Biotechnology, 1: p. 62-69.
- 16 EMBRAPA SOJA, 2010. Considerações sobre o florescimento precoce.
17 Disponível em: [http://www.cnpso.embrapa.br/alerta/ver_alerta.php?cod_pagina](http://www.cnpso.embrapa.br/alerta/ver_alerta.php?cod_pagina=214&cultura=1)
18 [sa=214&cultura=1](http://www.cnpso.embrapa.br/alerta/ver_alerta.php?cod_pagina=214&cultura=1). Acessado em 05 novembro de 2017.
- 19 Fontoura FM., Matias R, Ludwig J, Oliveira AKM de, Bono JAM, Martins P de
20 FRB, Corsino J, Guedes NMR, 2015. Seasonal effects and antifungal activity
21 from bark chemical constituents of *Sterculia apetala* (Malvaceae) at Pantanal of
22 Miranda, Mato Grosso do Sul, Brazil. Acta Amazonica, Manaus, 45: 283-292.
- 23 Freitas SS., Aguilar-Vildoso CI, 2004. Rizobactérias e promoção do crescimento
24 de plantas cítricas. Revista Brasileira de Ciência do Solo, 28: p.987-994.
- 25 Goulart ACP., 2002. Efeito do tratamento de sementes de algodão com
26 fungicidas no controle de tombamento de plântulas causado por *Rhizoctonia*
27 *solani*. Fitopatologia Brasileira, 27: 399-402.

- 1 Halverson LJ., Handelsman J, 1991. Enhancement of soybean nodulation by
2 *Bacillus cereus* UW85 in the field and in a growth chamber. Applied and
3 Environmental Microbiology, Washington, 57: 2767-2770.
- 4 Hoult JR., Paya M, 1996. Pharmacological and biochemical actions of simple
5 coumarins: natural products with therapeutic potential. Gen Pharmacol, 27:
6 p.713-22.
- 7 Huang, XF., Zhou, D, Guo, J, Manter, DK, Reardon, KF, Vivanco, JM, 2015.
8 *Bacillus* spp. from rainforest soil promote plant growth under limited nitrogen
9 conditions. Journal of Applied Microbiology, 118, 672-684.
- 10 Hungria M., Nogueira MA, Araujo RS, 2013. Co-inoculation of soybeans and
11 common beans with *rhizobia* and *azospirilla*: strategies to improve sustainability.
12 Biology and Fertility of Soils, 49: p.791-801.
- 13 Kumar A., Kumar S, Devi H, Patil S, Payal C, Negi S, 2012. Isolation, screening
14 and characterization of bacteria from Rhizospheric soils for different plant growth
15 promotion (PGP) activities: an in vitro study. Recent Research in Science and
16 Technology, 4: 1-5.
- 17 Kuss AV., Kuss VV, Holtz EK, Lovato T, 2008. Inoculation of diazotrophic bacteria
18 and Development of flooded rice plants in soil and Greenhouse. Revista da
19 FZVA, 15: p. 90-102.
- 20 Lahlali R., Peng G, Gossen BD, McGregor L, Yu FQ, Hynes RK, Hwang SF,
21 McDonald MR, Boyetchko SM, 2013. Evidence that the biofungicide Serenade
22 (*Bacillus subtilis*) suppresses clubroot on canola via antibiosis and induced host
23 resistance. Phytopathology, 103 (3): 245-54.
- 24 Lanna Filho R., Ferro HM, Pinho RSC, 2010. Controle biológico mediado por
25 *Bacillus subtilis*. Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas, 4 (2): 12-20.
- 26 Latha P., Anand T, Prakasam V, Jonathan EI, Paramathma M, Samiyappan R,
27 2011. Combining *Pseudomonas*, *Bacillus* and *Trichoderma* strains with organic
28 amendments and micronutrient to enhance suppression of collar and root rot
29 disease in physic nut. Applied Soil Ecology, 49: 215-223. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2011.05.003>
30

- 1 Li D., Sun M, Han Y, Teng W, Li W, 2010. Identification of QTL underlying soluble
2 content in soybean content in soybean white mold (*Sclerotinia sclerotiorum*).
3 Euphytica, Wageningen, 172: p.49-57. [https://doi.org/10.1007/s00122-009-0994-](https://doi.org/10.1007/s00122-009-0994-5)
4 5
- 5 Li H., Wang X, Han M, Zhao Z, Wang M, Tang Q, Liu C, Kemp B, Gu Y, Shuang
6 J, Xue Y, 2012. Endophytic *Bacillus subtilis* ZZ120 and its potential application in
7 control of replant diseases. Afric. J. Biotech. 11: p.231-242. [https://doi.org/](https://doi.org/10.5897/AJB11.2839)
8 10.5897/AJB11.2839
- 9 Lobo Junior M., 2013. Perspectivas e recentes resultados do uso de
10 microrganismos no controle de doenças do feijoeiro comum. Feijão: produção e
11 sustentabilidade, Piracicaba, p.97-108.
- 12 Ludwing J., Moura AB, 2007. Controle biológico das queimadas em arroz pela
13 microbiolização de sementes com bactérias antagonistas. Fitopatologia
14 Brasileira, 32: 381-386.
- 15 Mafia RG., Alfenas AC, Maffia LA, Ferreira EM, Siqueira L de, 2007. Effect of
16 rhizobacteria on rooting and growth of eucalyptus clones under diferente
17 conditions of clonal propagation. Revista Árvore, 31 (5): 813-821.
- 18 Manandhar JB., Hartman GL, 2008. Anthracnose. In: HARTMAN GL, SINCLAIR
19 JB, RUPE JC. Compendium of soybean diseases. 4 ed., Minnesota: APS, p.13-
20 14.
- 21 Matos FJA (2009). Introdução a Fitoquímica Experimental. 2ed: 141.
- 22 Moreira ALL., Araújo FF, 2013. Bioprospecção de isolados de *Bacillus* spp. como
23 potenciais promotores de crescimento de *Eucalyptus urograndis*. Revista Árvore,
24 37: 933-943.
- 25 Panday C., Bajpai VK, Negi YK, Rather IA, Maheshwari DK, 2018. Effect of plant
26 growth promoting *Bacillus* spp. on nutritional properties of *Amaranthus*
27 *hypochondriacus* grains. Saudi Journal of Biological Sciences.
28 <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.03.003>

- 1 Pereira JOPP., Freitas BM, 2002. Estudo da biologia floral e requerimentos de
2 polinização do muricizeiro (*Byrsonima crassifolia* L.). Revista Ciência
3 Agrônômica, Ceará, 33: 5-12.
- 4 Petzoldt R., Dickson M, 1996. Straw test for resistance to white mold in beans.
5 Annual Report of Bean Improvement Cooperative, 39: 142-143.
- 6 Porte A., Godoy RLO, 2001. Alecrim (*Rosmarinus officinallis* L.): Propriedades
7 antimicrobianas e química do óleo essencial. Revista Boletim do Centro de
8 Pesquisa e Processamento de Alimentos (CEPPA), Curitiba, 19: 193- 210.
- 9 Rahman MD., Hossain DM, Suzuki K, Shiiya A, Suzuki K, Dey TP, Nonaka M,
10 Harada N, 2016. Suppressive effects of *Bacillus* spp. on mycelia, apothecia and
11 sclerotia formation of *Sclerotinia sclerotiorum* and potential as biological control
12 of white mold on mustard. Australas. Plant Pathol. 45: p.103-117.
- 13 Romeiro RS, 2007. Controle biológico de enfermidades de plantas: fundamentos.
14 Viçosa: Editora UFV, 269 p.
- 15 Saharan BS., Nehra V, 2011. Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Critical
16 Review. Life Sciences and Medicine Research, 30p.
- 17 Sangiogo M., Bermudez JMM, Rodriguez DP, Barboza LF, Mocellin R. Avaliação
18 da indução de resistência por bactérias promotoras do crescimento de plantas a
19 *Sclerotinia sclerotiorum* em folhas de canola. In: VII Reunião Brasileira de
20 Indução de Resistência em Plantas a Patógenos, 2014.
- 21 Santos AR., Barros MP, Santin SMO, Sarragiotto MH, Souza MC, Eberlin MN,
22 Meurer EC, 2004. Constituintes polares das folhas de *Machaonia brasiliensis*
23 (Rubiaceae). Química Nova, São Paulo, 27: p. 525-527.
- 24 Simões CMO., Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR.
25 Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre: Editora da UFRGS,
26 Florianópolis: Editora da UFSC. 6 ed, 1102 p.
- 27 SMML, 2015. Systematic Mycology and Microbiology Laboratory Fungus-Host
28 Database. Disponível em: [http://nt.ars-grin.gov/fungalatabases/fungushost/
29 new_frameFungusHostReport.cfm](http://nt.ars-grin.gov/fungalatabases/fungushost/new_frameFungusHostReport.cfm). Acessado em 02 de novembro de 2017.

- 1 Stanković S., Mihajlović S, Draganić D, Dimkić I, Vukotić G, Berić T, Fira D, 2012.
- 2 Screening for the presence of biosynthetic genes for antimicrobial lipopeptides in
- 3 natural isolates of *Bacillus* sp. Archives of Biological Sciences, 64: p.1425-1432.
- 4 Stein T, 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific
- 5 functions. Molecular Microbiology, Oxford, 56: p. 845-857.
- 6 Sun G., Yao T, Feng C, Chen L, Li J, Wang L, 2017. Identification and biocontrol
- 7 potential of antagonistic bacteria strain against *Sclerotinia sclerotiorum* and their
- 8 growth-promoting effects on *Brassica napus*. Biol. Control. 104: 35-43.
- 9 Taiz L., Zeiger E. Fisiologia vegetal. 4.ed. Porto Alegre: Artmed. 2009.
- 10 Terán H., Lema M, Schwartz HF, Duncan R, Gilbertson R, Singh SP, 2006.
- 11 Modified Petzoldt and Dickson scale for white mold rating of common bean.
- 12 Annual Report of the Bean Improvement Cooperative, 49: 115, 2006.
- 13 Thakkar A., Saraf M, 2015. Development of microbial consortia as a biocontrol
- 14 agents for effective management of fungal disease in *Glycine max* L. Archives
- 15 of Phytopathology and Protection, 48: 459 - 474.
- 16 Wani PA., Khan MS, Zaidi, 2007. Synergistic effects of the inoculation with
- 17 nitrogen fixing and phosphate solubilizing rhizobacteria on the performance of
- 18 field grown chickpea. Journal of Plant Nutrition and Soil Science, 170, 283-287.
- 19 Wu Y., Yuan J, Raza W, Shen Q, Huang Q, 2014. Biocontrol traits and
- 20 antagonistic potential of *Bacillus amyloliquefaciens* Strain NJZJSB3 against
- 21 *Sclerotinia sclerotiorum*, a causal agent of canola stem rot. Journal of
- 22 Microbiology and Biotechnology, 24: 1327-1336.
- 23 Yorinori JT, Paiva WM, Frederick RD, Costamilan LM, Bertagnolli PF, Hartman
- 24 GE, 484 Godoy CV, Nunes Junior J. 2005. Epidemics of soybean rust
- 25 (*Phakopsora pachyrhizi*) 485 in Brazil and Paraguay from 2001 to 2003. Plant
- 26 Disease, Saint Paul, 89: p.675-677. 486 <https://doi.org/10.1094/PD-89-067>
- 27 Zhang JX., Xue AG 2010. Biocontrol of *Sclerotinia* stem rot (*Sclerotinia*
- 28 *sclerotiorum*) of soybean using novel *Bacillus subtilis* strain SB24 under control
- 29 conditions. Plant Pathology, 59: p. 382-391.

- 1 Zuanazzi JAS., Montanha JA. Flavonoides. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL,
- 2 E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P. DE; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R.
- 3 (Eds.) Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5. ed. Florianópolis/Porto
- 4 Alegre: UFSC/ UFRGS, 2004, p.577-614.