



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



THIAGO COSTA FERREIRA

***Bacillus* spp. COMO AGENTES DE CONTROLE DE *Thielaviopsis paradoxa* E
Fusarium verticillioides E PROMOTORES DE CRESCIMENTO DE CANA-DE-
AÇÚCAR E MILHO**

Botucatu

2018

THIAGO COSTA FERREIRA

***Bacillus* spp. COMO AGENTES DE CONTROLE DE *Thielaviopsis paradoxa* E
Fusarium verticillioides E PROMOTORES DE CRESCIMENTO DE CANA-DE-
AÇÚCAR E MILHO**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Agronomia – Proteção de Plantas.

Orientador: Prof. Dr. Wagner Bettiol

Botucatu

2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - DIRETORIA TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

F383b Ferreira, Thiago Costa, 1991-
Bacillus spp. como agentes de controle de *Thielaviopsis paradoxa* e *Fusarium verticillioides* e promotores de crescimento de cana-de-açúcar e milho / Thiago Costa Ferreira. - Botucatu: [s.n.], 2018
85 p.: grafs., tabs.

Tese (Doutorado)- Universidade Estadual Paulista Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2018
Orientador: Wagner Bettiol
Inclui bibliografia

1. Cana-de-açúcar. 2. Milho. 3. Crescimento (Plantas). 4. Bacillus (Bacteria). 5. Patógenos de solo. I. Bettiol, Wagner. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Câmpus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas. III. Título.

Elaborada por Ana Lucia G. Kempinas - CRB-8:7310

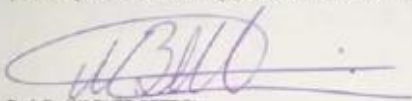
Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

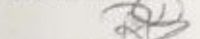
TÍTULO: "Bacillus spp. COMO AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO DE Thielaviopsis paradoxa E Fusarium verticillioides E PROMOTORES DE CRESCIMENTO DE CANA-DE-ACÚCAR E MILHO"

AUTOR: THIAGO COSTA FERREIRA
ORIENTADOR: WAGNER BETTIOL

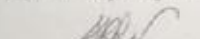
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em AGRONOMIA (PROTEÇÃO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:



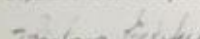
Prof. Dr. WAGNER BETTIOL
Meio Ambiente / EMBRAPA




Prof. Dra. RENATE KRAUSE SAKATE
Departamento de Proteção Vegetal / UNESP - Faculdade de Ciências Agrônomicas de Botucatu



Prof. Dra. SILVIA RENATA SICILIANO WILKEN
Departamento de Produção Vegetal / FCA / UNESP - Botucatu/SP



Prof. Dra. BÁRBARA ECKSTEIN
Recursos Genéticos e Biotecnologia / Embrapa



Dra. LULIAN SIMARA ABREU SOARES COSTA
Meio Ambiente / Embrapa

Botucatu, 03 de agosto de 2018.

AGRADECIMENTOS

Ao Senhor Deus Jeová, pelo dom da vida e por todas as minhas conquistas. Faltam palavras para descrever esta gratidão!

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Proteção de Plantas, pela oportunidade de realização do curso de doutorado;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos;

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001;

Ao Prof. Dr. Wagner Bettiol, pela orientação;

À Embrapa Meio Ambiente, em especial a todos que fazem parte do Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Setor de Campos Experimentais, pela compreensão e auxílios, sem estes esta Tese não teria sido executada;

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia Ambiental: Michelli, Dalton, Mirian, Lucas do Lago, Lucas Guedes, Marina, Mércia, Lílian e Davi, por toda amizade, companheirismo e tudo mais que boas amizades podem prover;

Aos amigos de Campinas: Eric, Lucas Emerick, Bruna, Rudson, Marlon, Aline Maia, por todo amor e momentos de apoio neste processo.

Aos amigos de Botucatu, participantes da República NinguémSai (Zaraga, Perobo, Vidente, Mamik, Mickey, Vivian e Mexicano);

Aos vários outros amigos do Lageado, em especial para: Porteira, Talismã, Guandu, Pai-Jaú, João Negão, Vapu Inferno, Crina e Davizão; os quais levarei para a vida;

Aos meus amigos da minha região natal, por terem me ajudado, mesmo a distância, em se manter firme e sóbrio neste processo. A minha família pelo amor e amizade mesmo a distância neste processo. Também por serem a mola impulsionadora de muitas coisas na minha vida.

“Os céus declaram a glória de Deus; o firmamento proclama a obra das suas mãos. Um dia fala disso a outro dia; uma noite o revela a outra noite. Sem discurso nem palavras, não se ouve a sua voz. Mas a sua voz ressoa por toda a terra e as suas palavras até os confins do mundo. Nos céus ele armou uma tenda para o sol, que é como um noivo que sai de seu aposento e se lança em sua carreira com a alegria de um herói. Sai de uma extremidade dos céus e faz o seu trajeto até a outra; nada escapa ao seu calor” (Salmos 19:1-6).

RESUMO

Microrganismos podem ser utilizados como agentes de promoção de crescimento e biocontrole de fitopatógenos habitantes do solo em diferentes culturas agrícolas. Dentre estes microrganismos, existem relatos que isolados de bactérias do gênero *Bacillus* podem ser promissores para as duas atividades, podendo, portanto, serem efetivos para a promoção de crescimento e o biocontrole de *Thielaviopsis paradoxa* e *Fusarium verticillioides*, importantes patógenos nas culturas da cana-de-açúcar e milho, respectivamente. O objetivo deste trabalho foi selecionar isolados de *Bacillus* com as características de promover o crescimento das plantas e controlar *T. paradoxa* e *F. verticillioides* nas culturas da cana-de-açúcar e milho, respectivamente. Assim, foram realizados estudos *in vitro* com 162 isolados de *Bacillus* sp. quanto à assimilação de nitrogênio, solubilização de fosfato e produção de ácido indolacético, ácido cianídrico e sideróforos e também quanto à inibição do crescimento micelial e germinação de esporos de *T. paradoxa* e no controle da podridão abacaxi e na promoção de crescimento em cana-de-açúcar. Também foram estudados os efeitos de 12 isolados de *Bacillus*, selecionados de acordo com os melhores resultados da fase descrita anteriormente, bem como resultados obtidos em teste no laboratório e consulta a literatura especializada, para a promoção de crescimento e o biocontrole de *F. verticillioides* em milho comum e pipoca, *in vitro* e *in vivo*. De acordo com os resultados obtidos foram selecionados dois isolados, *B. velezensis* AP-03 e *Bacillus* sp. AP-210, como agentes de promoção de crescimento e de biocontrole de *T. paradoxa* e *F. verticillioides* para as culturas da cana-de-açúcar e milho, respectivamente. Isolados de *Bacillus* spp. podem ser utilizados como agentes de promoção de crescimento e biocontrole em cana-de-açúcar e milho na presença destes patógenos.

Palavras-chave: *Saccharum officinarum*, *Zea mays*, antagonismo, patógenos de solo, crescimento vegetal.

ABSTRACT

Microorganisms can be used as plant growth promoter and biocontrol agents of soilborn plant pathogens, in several crops. Among these microorganisms, there are reports that isolates from the *Bacillus* genus can be promising for both these activities and may therefore be effective for the growth promotion and control of *Thielaviopsis paradoxa* and *Fusarium verticillioides*, important pathogens in sugarcane and corn crops, respectively. In this study it was selected *Bacillus* isolates for improving plant growth and controlling *T. paradoxa* and *F. verticillioides*. *In vitro* studies were carried out with 162 *Bacillus* isolates regarding to the assimilation of nitrogen, phosphate solubilization and production of indolacetic acid, hydrocyanic acid and siderophores, as well as the inhibition of mycelial growth and spores germination of *T. paradoxa*, control of pineapple rot and growth promotion in sugarcane. Also, the effects of 12 *Bacillus* isolates, selected according to the previously described phase and literature information, were studied for growth promotion and for the control of *F. verticillioides* in corn and popcorn, *in vitro* and *in vivo*. According to the results, two isolates, *B. velezensis* AP-03 and *Bacillus* sp. AP-210, as growth promoter and biocontrol agents of *T. paradoxa* and *F. verticillioides* for sugarcane and corn crops, respectively. *Bacillus* spp. isolates can be used as plant growth promotion and biocontrol agent in sugarcane and corn in the presence of these soilborn plant pathogens.

Key words: *Saccharum officinarum*, *Zea mays*, antagonism, soilborn plant pathogens, plant growth.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1	A cultura da cana-de-açúcar.....	18
2.2	A cultura do milho.....	19
2.3	Fitopatógenos habitantes do solo.....	21
2.3.1	Doenças da cana-de-açúcar	22
2.3.2	Doenças do milho.....	24
2.4	Uso de microrganismos na agricultura.....	25
2.4.1	<i>Bacillus</i> spp. como promotores de crescimento de plantas e antagonistas a fitopatógenos habitantes do solo.....	26
2.4.2	Controle biológico de doenças e promoção de crescimento em cana-de-açúcar promovidos por isolados do gênero <i>Bacillus</i>	29
2.4.3	Controle biológico de doenças e promoção de crescimento em milho promovidos por isolados do gênero <i>Bacillus</i>	31
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1	Localização dos experimentos, dados climáticos e solo trabalhado.....	31
3.2	Organismos trabalhados.....	31
3.3	Seleção dos isolados de <i>Bacillus</i> spp. com base na produção de metabólitos promotores de crescimento, assimilação e solubilização de nutrientes.....	32
3.4	Seleção dos isolados de <i>Bacillus</i> spp. com base no biocontrole de fitopatógenos.....	35
3.4.1	Seleção de isolados antagônicos a <i>T. paradoxa</i>	35
3.4.2	Seleção de isolados antagônicos a <i>F. verticillioides</i>	37
3.5	Produção de metabólitos promotores de crescimento e assimilação de nutrientes.....	38
3.6	Efeitos de <i>Bacillus</i> spp. no controle da podridão abacaxi, promoção de crescimento e vigor de mudas de cana-de-açúcar.....	39
3.7	Efeitos de <i>Bacillus</i> spp. no controle de <i>F. verticillioides</i>, na promoção de crescimento e vigor de plantas de milho comum e pipoca.....	41
3.7.1	Promoção de crescimento de milho comum e pipoca por <i>Bacillus</i> spp.....	41
3.7.2	Inoculação de <i>F. verticillioides</i> em sementes de milho.....	42
3.7.3	Seleção dos isolados de <i>Bacillus</i> spp. utilizados nos próximos testes com sementes de milho.....	42
3.7.4	Tratamento de sementes de milho comum com <i>Bacillus</i> spp.....	42
3.7.5	Testes de fisiologia e sanidade de sementes de milho inoculadas com <i>F. verticillioides</i> e tratadas ou não com <i>Bacillus</i> spp.....	43
3.7.6	Avaliação do tratamento de sementes de milho inoculadas com <i>F. verticillioides</i> com diferentes cepas de <i>Bacillus</i>	45
4	RESULTADOS.....	47
4.1	Seleção dos isolados de <i>Bacillus</i> spp. com base na produção de metabólitos promotores de crescimento, assimilação e solubilização de nutrientes.....	47

4.2	Seleção dos isolados de <i>Bacillus</i> spp. com base no biocontrole de fitopatógenos.....	48
4.2.1	Seleção de isolados antagônicos a <i>T. paradoxa</i>	48
4.2.2	Seleção de isolados antagônicos a <i>F. verticillioides</i>	49
4.3	Produção de metabólitos promotores de crescimento e assimilação de nutrientes.....	51
4.4	Efeitos de <i>Bacillus</i> spp. no controle da podridão abacaxi, promoção de crescimento e vigor de mudas de cana-de-açúcar.....	52
4.5	Efeitos de <i>Bacillus</i> spp. no controle de <i>F. verticillioides</i>, na promoção de crescimento e vigor de plantas de milho comum e pipoca.....	55
4.5.1	Promoção de crescimento de milho comum e pipoca por <i>Bacillus</i> spp.....	55
4.5.2	Testes de fisiologia e sanidade de sementes de milho inoculadas com <i>F. verticillioides</i> e tratadas com <i>Bacillus</i> spp. ou produtos sintéticos.....	58
4.5.3	Testes de fisiologia e sanidade de plântulas de milho provenientes de sementes inoculadas com <i>F. verticillioides</i> e tratadas ou não com <i>Bacillus</i> spp.....	59
5	DISCUSSÃO.....	64
5.1	Seleção dos isolados de <i>Bacillus</i> com base na produção de metabólitos promotores de crescimento, assimilação e solubilização de nutrientes para vegetais.....	64
5.2	Seleção dos isolados de <i>Bacillus</i> com base no biocontrole de <i>T. paradoxa</i> e na promoção de crescimento de cana-de-açúcar.....	66
5.3	Seleção dos isolados de <i>Bacillus</i> spp. com base no biocontrole de <i>F. verticillioides</i> e na promoção de crescimento de milho.....	70
6	CONCLUSÕES.....	73
	REFERÊNCIAS.....	75
	ANEXOS.....	83

1 INTRODUÇÃO

A agricultura nos países em desenvolvimento econômico vem sendo cada vez mais trabalhada com base em plantios extensos, formados por plantas de alto valor genético e que são dependentes da aplicação maciça de produtos sintéticos. Esta vem sendo trabalhada, portanto, com uma intensa mecanização, tecnificação e, logicamente, com expressivos ganhos de produtividade. Entretanto, muitas dessas tecnologias têm gerado desequilíbrio nos ciclos naturais do planeta, tornando importante a discussão da sustentabilidade dos sistemas agrícolas (WILSON e TISDELL, 2001; WANG et al., 2014; NODARI e GUERRA, 2015; SHARMA et al., 2015).

As espécies vegetais cultivadas apresentam problemas com doenças, dentre estas, as causadas por fitopatógenos habitantes do solo que são de difícil controle. Estes fitopatógenos sobrevivem por longos períodos, a maior parte do seu ciclo de vida, no solo, mesmo na ausência dos hospedeiros. Além disso, infectam órgãos subterrâneos e caules e possuem capacidade de competição saprofítica (NODARI e GUERRA, 2015; SHARMA et al., 2015).

As cadeias de produção da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) e do milho (*Zea mays*), seja o comum ou o pipoca, são caracterizadas pelo uso intensivo de tecnologias. Em ambas, há a necessidade de controle químico para *Thielaviopsis paradoxa* e *Fusarium verticillioides*, importantes fungos habitantes de solo e fitopatogênos da cana-de-açúcar e do milho, respectivamente, que são capazes de reduzir a produtividade destas culturas (CHAPOLA et al., 2014; LIZÁRRAGA-SÁNCHEZ et al. 2015). Deste modo, são necessárias pesquisas para o desenvolvimento de métodos alternativos de controle visando estes fitopatógenos.

O controle biológico de fitopatógenos é uma alternativa que tem-se mostrado viável para o controle de diversas doenças. Dentre os agentes de biocontrole, as espécies do gênero *Bacillus* vêm sendo utilizadas devido a eficiência em controlar fitopatógenos e promover o crescimento das plantas (DORIGHELLO et al., 2014; SIVASAKTHI et al., 2014; MARTINS et al., 2015). *Bacillus* spp. apresentam ação comprovada em cana-de-açúcar e milho como promotores de crescimento e agentes de biocontrole de alguns fitopatógenos (MARTINS et al., 2015; RAZA et al., 2016; XU

et al., 2016). *Bacillus* spp. são bactérias formadoras de endósporos sobrevivendo em diversas condições ambientes e, portanto, com maior facilidade de se obter formulações comerciais.

No Brasil, *Bacillus* spp. são registradas como agentes de biocontrole de *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne javanica*, *Meloidogyne graminicola*, *Pratylenchus brachyurus*, *Botrytis cineria*, *Hemileia vastatrix*, *Colletotrichum gloesporioides*, *Colletotrichum acutatum*, *Cryptosporiopsis perennans*, *Phyllostica citricarpa*, *Sphaeroteca fuliginea*, *Erysiphe polygoni*, *Alternaria solani*, *Alternaria porri*, *Alternaria dauci*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sphaeroteca macularis*, *Mycospaherella fijiensis*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum* e *Xanthomonas vesicatoria* (BRASIL, 2018).

Cardoso e Araújo (2011) e Mazzuchelli et al. (2011) relataram o controle de *Meloidogyne* spp. em cana-de-açúcar utilizando espécies de *Bacillus*. Também Hassan et al. (2010) e Silva et al. (2015) verificaram o controle de *C. falcatum* e *Fusarium* spp. dessa cultura com *Bacillus*. Campos (2010) e Souza et al. (2017) realizaram testes comprovando o aumento de 40% na produção de matéria seca em mudas de cana-de-açúcar na presença de diferentes espécies de *Bacillus* spp.

Szilayi-Zecchin et al. (2014) verificaram inibição de *F. verticillioides*, *Colletotrichum graminicola*, *Bipolaris maydis* e *Cercospora zea-maydis* em milho por isolados de *Bacillus* sp. Também Kulimushi et al. (2017) descreveram a efetividade de isolados de *Bacillus* sp. contra *Rhizomucor variabilis*. O biocontrole de *F. verticillioides* e o restabelecimento da sanidade de sementes e de plântulas de milho utilizando isolados de *Bacillus* foram relatados por Pereira et al. (2011) e Lizárraga-Sánchez et al. (2015). Esses autores verificaram também o estímulo na promoção de crescimento de plântulas de milho com o uso de *Bacillus*.

A viabilidade do uso desses microrganismos para o controle de *T. paradoxa* e *F. verticillioides* depende do desenvolvimento de estudos mais detalhados, sendo esse, o objetivo geral do presente trabalho. Os objetivos específicos foram: selecionar isolados de *Bacillus* spp. para promoção de crescimento e biocontrole de *T. paradoxa*, por meio de técnicas bioquímicas e de testes de antagonismo, realizados em laboratório, e a comprovação destas características *in vivo* com a utilização de mudas de cana-de-açúcar na presença ou não de *T. paradoxa*; e selecionar isolados de

Bacillus spp. com a capacidade de controlar *F. verticillioides* e promover o crescimento das plantas de milho, comum e pipoca.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A cultura da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma das mais importantes espécies cultivadas nas regiões tropicais e subtropicais do planeta. A sacarose, seu principal produto, é extraída para a produção açucareira desde 2500 a.C., no continente asiático. Além da produção de açúcar para a indústria de alimentos, também é destacada a produção de etanol (BRANDI, 2015).

A produção brasileira foi incentivada desde o início da colonização portuguesa, por volta da primeira metade do século XVI, quando a cultura foi introduzida no país através do litoral paulista e depois expandida para o restante do território nacional. A cultura da cana-de-açúcar foi a responsável pelo primeiro ciclo econômico de exploração da coroa portuguesa em terras brasileiras (LODO, 2013). Com o passar dos anos, esta cultura permaneceu como uma das principais culturas agrícolas do país (BORRÁS-HIDALGO et al., 2005; DOMINGUES, 2014).

A produção brasileira estimada para a safra 2017/18 é de 647,6 milhões de toneladas de cana-de-açúcar em cerca de 8,84 milhões de hectares. A produção está distribuída entre São Paulo, maior produtor com 51,3% (4.558,2 mil hectares), seguido por Goiás com 10% (939 mil hectares), Minas Gerais com 9% (841,7 mil hectares), Mato Grosso do Sul com 7,9% (636,4 mil hectares), Paraná com 6,8% (624,8 mil hectares), Alagoas com 4,2% (301,5 mil hectares), Pernambuco com 3% (259,6 mil hectares) e Mato Grosso com 2,5% (221,33 mil hectares). Estes oito estados são responsáveis por 94,8% da produção nacional. Os outros 14 estados produtores possuem áreas menores, com representações abaixo de 1,4%, totalizando 5,2% da área total (CONAB, 2017).

A cana-de-açúcar pertence a divisão Angiospermae, classe Monocotyledonea e família Poaceae. As variedades cultivadas, atualmente no mundo, pertencem ao gênero *Saccharum*, o qual compreende seis espécies: *Saccharum robustum*, *Saccharum spontaneum*, *Saccharum sinense*, *Saccharum barberi*, *Saccharum edule* e *Saccharum officinarum*. *S. officinarum* é a espécie mais difundida no Brasil (CAMPOS, 2010; CHAPOLA et al., 2014; CONAB, 2017). O gênero tem como

características gerais: a formação de touceiras, nas quais se encontram as partes vegetativas (colmos, folhas, raízes e rizomas) e na maturidade do ciclo vegetativo a inflorescência (panícula); metabolismo tipo C4; semiperenidade; adaptação à alta intensidade luminosa e resgate de CO₂ atmosférico. O sistema radicular é composto por raízes adventícias, formando um complexo fasciculado, com mais de dois metros de crescimento, com maior distribuição nos vinte primeiros centímetros da superfície do solo. Normalmente sua propagação é feita por meio de rebolos (toletes) contendo gemas. Ao serem plantados os toletes se desenvolvem e fixam por meio do sistema radicular a touceira, representada pela planta principal e os perfílios. Esta espécie apresenta colmo cilíndrico, com a formação de nós e entre nós. As folhas são distribuídas sobre estas estruturas. Estas folhas têm forma lanceolada, com a formação de filotaxia oposta, com uma ligação membranosa denominada de lígula. Apresentam sementes pequenas, produzidas em um fruto denominado cariopse cuja produção é realizada por sua panícula composta de flores hermafroditas. A produção e o acúmulo de material seco, rico em açúcares e lignina, são as características mais importantes para a sua exploração agrícola (ARALDI et al., 2010; LODO, 2013).

O plantio da cana-de-açúcar é realizado em diversas épocas do ano. No entanto, na região Centro – Sul a maior parte da lavoura canavieira é plantada entre setembro e outubro, tendo seu máximo desenvolvimento entre novembro a abril dos anos seguintes. Porém, com o aumento do consumo de açúcar e etanol, muitas vezes os plantios são realizados durante as épocas do outono e inverno (DIAS, 2011).

2.2 A cultura do milho

O milho pertence a divisão Angiospermae, classe Monocotyledonea, família Poacea, gênero *Zea* e espécie *Zea mays*. O centro de origem do milho é o México. A sua domesticação e cultivo ocorreram há cerca de 10.000 anos por indígenas ameríndios (CARVALHO et al., 2014; CAIRES et al., 2014; MENDES et al., 2016; PEREIRA et al., 2016). O milho é um dos alimentos mais conhecidos e consumidos no mundo. As principais características da espécie são: ciclo anual; hábito de pedúnculo único; múltiplas folhas, não forma touceiras; inflorescência masculina (panícula) e feminina (espigas) separadas; sementes com alto valor proteico; planta

ereta; com baixo ou ausente perfilhamento; metabolismo C4; adaptação a alta intensidade luminosa e ao resgate de CO₂ atmosférico (MENDES et al., 2016; PEREIRA et al., 2016).

O milho comumente pode ser dividido em milho comum, em que os grãos são consumidos para a produção de alimentos em geral, e em milho pipoca, no qual são produzidos grãos em que em contato com altas temperaturas promovem alterações bioquímicas e físicas que produzem a pipoca. A biologia e os patossistemas que atacam estas plantas são semelhantes, porém, a morfologia de muitas estruturas é diferenciada, o que permite a visualização de caracteres diferenciados (CATI, 2001).

Lavouras de milho produzem grãos e palha cuja utilização é para alimentação humana e animal, combustível e produção de fibras para diversas finalidades. Esta versatilidade do milho também é verificada na amplitude de sua faixa de cultivo, a qual está estendida desde o Equador até áreas com clima temperado e em altitudes superiores a 3.000 m (CAIRES et al., 2014; CARVALHO et al., 2014).

No Brasil, a produção de milho esteve relacionada com as tribos indígenas antes do período colonial, perfazendo um importante item para a alimentação humana. Atualmente, é cultivada em todas as regiões do país (CARVALHO et al., 2014; CAIRES et al., 2014; MENDES et al., 2016).

Melhoramento genético e tecnologias de manejo permitem que o milho seja um dos mais importantes produtos agrícolas do país. Além disso, é importante ser frisadas a adaptabilidade e produtividade desta gramínea em diferentes climas, solos e épocas de plantio no país. Outra qualidade é a adequabilidade do seu ciclo vegetativo, podendo ser curto (em torno de 90 dias) ou longo (em torno de 120 dias) (CARVALHO et al., 2014; CAIRES et al., 2014). No Brasil, este cereal pode ser plantado em duas safras, uma no verão, denominada de primeira safra, e uma safrinha, cujo plantio é iniciado no final do verão ou início do outono para ser colhida no inverno, tanto em condições de áreas irrigadas ou de sequeiro, acompanhando o período chuvoso do ano (CARVALHO et al., 2014; CAIRES et al., 2014).

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de milho, com produção estimada para a safra 2017/18 de 26.826,6 milhões de toneladas de grãos em uma

área de 5.073,0 milhões de ha para a primeira safra e 55.354,7 milhões de toneladas para a segunda safra, em uma área de cerca de 12 milhões de ha. Os estados com maior produção no país são: Minas Gerais (5.395,9 milhões de ton) e Rio Grande do Sul (4.827,8 milhões de ton) para a primeira safra. Já para a segunda safra, o estado do Mato Grosso é o maior produtor (28.201,2 milhões de ton). O restante da produção do país está distribuída entre os demais estados da federação (CONAB, 2018).

2.3 Fitopatógenos habitantes do solo

Dentre os grupos de fitopatógenos, os que são habitantes de solo apresentam características específicas e importantes quanto a viabilidade e a disseminação no campo. De modo geral, os patógenos habitantes do solo sobrevivem neste por longos períodos de tempo mesmo na ausência dos hospedeiros, também formam estruturas de resistência, atacam uma ampla gama de hospedeiros, infectam órgãos subterrâneos e caules das plantas, possuem capacidade de competição saprofítica e partes do seu ciclo ocorrem no solo. As principais doenças causadas por esse grupo de patógenos estão relacionadas com o sistema radicular, tombamento, podridões de colo e raiz, murchas e galhas. Em clima tropical, são inúmeros os problemas com estes patógenos, pois as condições naturais favorecerem as flutuações populacionais e o crescimento ao longo do ano das populações (MICHERREF et al., 2005; DAGUERRE et al., 2014; GHORBANPOUR et al., 2018).

Esses patógenos podem ser controlados com o uso de diferentes métodos de controle. Esses métodos podem ser utilizados isoladamente ou realizar manejo considerando os aspectos físicos, químicos e culturais, bem como as características genéticas do hospedeiro. Métodos alternativos como o controle biológico também são empregados, tanto em conjunto como isoladamente (DAGUERRE et al., 2014; LALIBERTÉ et al., 2015; LIZÁRRAGA-SÁNCHEZ et al., 2015; GHORBANPOUR et al., 2018).

O controle biológico de fitopatógenos habitantes do solo é reportado na literatura como uma alternativa eficaz, com alta resiliência a intempéries e sustentável. Também podem ser destacadas as seguintes características destes agentes de controle: facilidade de serem isolados dos solos, sobrevivência em materiais

orgânicos e formação de estruturas de resistência. Diversos são os gêneros de microrganismos que podem ser utilizados como agentes de biocontrole de fitopatógenos habitantes do solo dentre estes, destacando-se, principalmente, espécies dos gêneros *Bacillus* e *Trichoderma* (LIZÁRRAGA-SÁNCHEZ et al., 2015; GHORBANPOUR et al., 2018).

2.3.1 Doenças da cana-de-açúcar

Carvão (*Sporisorium scitamineum*), ferrugem marrom (*Puccinia melanocephala*), mancha amarela (*Mycovellosiella koepkei*), mancha ocular (*Bipolaris sacchari*), mancha parda (*Cercospora longipes*) e a podridão abacaxi (*T. paradoxa*) são as doenças fúngicas mais comuns na cultura da cana-de-açúcar no Brasil (TOKESHI, 1997; SANTOS, 2013; CHAPOLA et al., 2014).

O gênero *Thielaviopsis* é um grupo de fungos pertencente a divisão Ascomycota, classe Sordiales, ordem Microascales e família Ceratocystidaceae. Este gênero inclui vários patógenos agrícolas importantes, como *Thielaviopsis basicola*, *Thielaviopsis ethacetica*, *Thielaviopsis parasitica*, *Thielaviopsis fimbriata* e *T. paradoxa*. A podridão abacaxi da cana-de-açúcar tem como agente etiológico *T. paradoxa* (De Seynes), fase imperfeita do fungo *Ceratocystis paradoxa* (De Seynes) Dade. A forma anamorfa deste fungo é mais encontrada nas condições brasileiras de cultivo, exceto alguns relatos em canaviais no estado de São Paulo (RAID e ROTT, 2013). Este fungo pode parasitar inúmeras espécies vegetais, sendo mais ocorrente em *Ananas* spp.; *Cocos* spp.; *Ipomoea* spp.; *Musa* spp.; *Theobroma* spp. e *Saccharum* spp. (FIRMINO e FURTADO, 2014).

Thielaviopsis paradoxa, fitopatógeno habitante do solo, na fase anamórfica produz microconídios com tamanho de 10-15 x 3,5-5,0 µm, ligeiramente ovais, usualmente hialinos, eretos, formados no interior do conidióforo e eliminados de maneira blástica; tornando-se escuros com a maturidade; e macroconídios que apresentam tamanho de 80 x 4-5 µm, são escurecidos. Na fase teleomorfa são produzidos peritécios com ascas clavadas (7-10 x 2,5 µm), sendo os ascósporos eliminados em massa hialina ou levemente rosada. Isolados de *T. paradoxa* apresentam limites de temperatura entre 10 e 34°C e de pH próximo a 3 e 9, bem

amplios para o seu desenvolvimento e crescimento. Porém, em cana-de-açúcar, as épocas de clima ameno do ano (médias de temperatura do ar próximas aos 20°C) são as mais adequadas para a ocorrência da doença. Segundo Gheller (1995), nos períodos de temperatura mais amena as gemas de cana-de-açúcar tendem a iniciar sua brotação mais tardiamente. Este fator é crucial para o ataque do *T. paradoxa* em áreas de plantio com cana-de-açúcar, permitindo que o fungo seja mais efetivo em suas funções parasitárias (TOKESHI, 1997).

Os efeitos parasitários deste fungo iniciam logo após o contato com o hospedeiro. Este contato ocorre por meio de ferimentos na planta, principalmente através da mecanização utilizada no plantio ou por ferimentos causados por insetos, como *Diatraea*. Em ambos os métodos os propágulos do fungo estão aderidos ao solo ou ao corpo do inseto, entrando em contato com os tecidos da planta (LODO, 2013; FIRMINO e FURTADO, 2014). Após esta fase ocorre a produção de enzimas degradadoras de tecidos e outras substâncias relacionadas ao parasitismo e estas liberam um odor de abacaxi amadurecido nas touceiras de cana-de-açúcar atacadas.

O fungo coloniza os vasos da planta e provoca um bloqueio temporário no crescimento, os colmos afetados apresentam cor avermelhada a preta. Dentre as mais importantes substâncias produzidas por este fungo destaca o acetato de etila por sua grande produção. Esta substância é um éster ($C_4H_8O_2$) com característica de solvente, que deteriora os tecidos da cana-de-açúcar, degradando os açúcares e outras substâncias orgânicas presentes. Esta substância é a principal causadora da mudança de coloração dos colmos (resposta de resistência das plantas) e do odor característico de abacaxi em toletes e colmos de cana-de-açúcar atacados pelo patógeno (BORRÁSHIDALGO et al., 2005; LODO, 2013). O parasitismo dos colmos promove, nos toletes ou gemas, o apodrecimento dos mesmos antes de emergência ou originando plantas debilitadas. O ataque em toletes de cana-de-açúcar pode reduzir em até 50% a brotação e em até 42% a produtividade de colmo (LODO, 2013; CHAPOLA et al., 2014).

O controle desta doença, na maioria dos cultivos, é realizado por meio da aplicação de fungicidas nos toletes e no solo, plantio de variedades que emergem mais rápido e vigorosamente e a evasão de áreas com infestadas nas épocas amenas do ano. No entanto, têm-se observado, em muitas áreas de plantio que tais métodos

não estão sendo eficazes no controle deste fungo (CHAPOLA et al., 2014). Desta maneira, a busca por métodos alternativos, como o de agentes de biocontrole, vem sendo realizada para diminuir os efeitos deste patógeno nas áreas de plantio.

Há poucos relatos demonstrando o êxito do controle alternativo de *T. paradoxa* em plantios de cana-de-açúcar. Eziashi et al. (2006/2007) descreveram o biocontrole do fungo com o uso de cepas de *Trichoderma* spp., e também, o uso desse antagonista em associação com o benomyl. Além disso, o emprego do benomyl em associação com o extrato cru de dendê (EZIASHI et al., 2010a) e a utilização de lipoproteínas extraídas de *Trichoderma* (EZIASHI et al., 2010b). Ferreira et al. (2008) e Lodo (2011) relataram a utilização de fungicidas associado a evasão de épocas mais frias do ano, como sendo um importante ponto a ser seguido no manejo deste fungo em plantios de cana-de-açúcar. Brandi (2015) descreveu a efetividade de cepas de *Bacillus* spp. no controle do patógeno.

2.3.2 Doenças do milho

Uma gama de fitopatógenos atacam as plantas de milho em diversos estágios fenológicos, desde a emergência das plântulas até o armazenamento de grãos e sementes. Cercosporiose (*Cercospora zea-maydis* e *Cercospora sorghi* f. sp. *maydis*); ferrugem (*Puccinia polysora* e *Puccinia sorghi*), helmintosporiose (*Bipolaris maydis*), antracnose (*Colletotrichum graminicola*), podridões de colmo e raízes (*Fusarium* spp., *C. graminicola*, *Stenocarpella maydis* e *Stenocarpella macrospora*), podridões bacterianas (*Pseudomonas* spp. e *Erwinia* spp.), viroses (*Maize Rayado Fino Virus*, *Maize Dwarf Mosaic Virus* e *Sugar Cane Mosaic Virus*), nematoses (*Pratylenchus* spp., *Meloidogyne* spp. e *Xiphinema* spp.), grãos ardidos e podridões em sementes e espigas (*Stenocarpella* spp., *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp.) estão entre as doenças mais importantes do milho no Brasil (REIS et al., 2004; MACHADO et al., 2013; LIZÁRRAGA-SÁNCHEZ et al., 2015).

Dentre estes patógenos, pode ser destacado o gênero *Fusarium* como sendo importante por sua agressividade à cultura. *Fusarium* spp. podem ser patogênicas em diversas fases da planta. Este gênero pode causar damping-off; podridões de colo,

raiz e colmo; manchas foliares e grãos ardidos no milho (MACHADO et al., 2013; LIZÁRRAGA-SÁNCHEZ et al. 2015; NGUYEN et al., 2017).

Como patógeno de sementes em milho, o fungo *F. verticillioides* é relatado em diferentes artigos sendo responsável, dentre outros, por problemas de emergência nos cultivos com esta gramínea. Este fator está relacionado ao fato deste fungo apresentar alta sobrevivência no solo como saprófita, também são produzidas estruturas de resistências e sua transmissão para as sementes pode ocorrer de várias maneiras. Outro importante fator é o fato deste fungo poder ser encontrado como endofítico em plantas de milho, em muitos casos sem causar sintomas e podendo ser transmitido para as sementes, plantas do entorno destas e grãos. Os grãos infectados com este fungo são classificados como grãos ardidos e sua utilização na alimentação humana e animal causa problemas de saúde por causa das micotoxinas produzidas por este fungo, dentre estas as fumomisininas, causadoras de diversas patologias em animais e humanos (MACHADO et al., 2013; LIZÁRRAGA-SÁNCHEZ et al., 2015). Existem no mercado diversas moléculas sintéticas que podem ser utilizadas no tratamento de sementes de milho contra *F. verticillioides*. No entanto, tem sido descrito na literatura que algumas populações deste fungo têm apresentado um aumento na resistência a estes fungicidas (MACHADO et al., 2013). Sendo então necessárias pesquisas com a utilização de métodos alternativos de controle deste patógeno (LIZÁRRAGA-SÁNCHEZ et al., 2015).

2.4 Uso de microrganismos na agricultura

Microrganismos podem ser utilizados na agricultura de maneira racional promovendo processos biológicos benéficos. Dentre os processos, podem ser destacados o controle biológico e a promoção de crescimento de plantas (WU et al., 2015; RAZA et al., 2016).

O controle biológico de doenças de plantas está baseado na utilização de agentes de biocontrole (organismos capazes de causar distúrbios em outros organismos), por meio de uma relação íntima, dinâmica e dependente de diversos fatores bióticos e abióticos. De acordo com Chowdhury et al. (2015), Wu et al. (2015) e Raza et al. (2016) as principais ações, diretas e indiretas, de biocontrole e promoção

de crescimento vegetal são devidas seguintes características: antibiose, competição, parasitismo, predação, hipovirulência, indução de resistência, assimilação de nitrogênio, solubilização de fosfatos, produção de sideróforos e hormônios de crescimento.

Diversos são os gêneros microbianos habitantes de solo utilizados como agentes de biocontrole de fitopatógenos e promoção de crescimento vegetal. *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Xanthomonas*, *Acetobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Herbaspirillum*, *Paenibacillus*, *Microbacterium*, *Trichoderma*, *Pocchonia* e *Clonostachys* são os gêneros mais estudados (BANIK et al., 2016; GUPTA et al., 2016).

2.4.1 *Bacillus* spp. como promotoras de crescimento de plantas e antagonistas a fitopatógenos habitante do solo

O gênero *Bacillus* pertence à classe Bacilli, filo Firmicutes e Reino Bacteria. São bactérias Gram positivas, correspondendo a um grupo altamente heterogêneo de espécies com característica marcante de aerobiose. Apresentam células na forma de bastonetes, de tamanho entre 0,5 x 1,2 µm até 2,5 x 10 µm, com motilidade variável, produtoras de biofilme e habitam diversos nichos como solo, gêneros alimentícios ou água. (EARL et al., 2008; RAZA et al., 2016; WU et al., 2015). *Bacillus* spp. podem ser aeróbias, facultativas ou anaeróbias; tendo como característica marcante a produção de endósporos a partir de mecanismos desencadeados por fatores físicos ou químicos, como por exemplo altas temperaturas e alguns produtos químicos (EARL et al., 2008; LANNA FILHO et al., 2010; XU et al., 2016).

As funções biológicas gerais desse grupo de organismos são: reciclagem de matéria orgânica, promoção de crescimento de plantas e controle biológico de microrganismos (EARL et al., 2008; CAWOY et al., 2014; MARTINS et al., 2015; RAZA et al., 2016; XU et al., 2016). Dentro do gênero *Bacillus* existem espécies que agem como agentes de promoção de crescimento vegetal em razão das seguintes características: produção de hormônios vegetais, compostos antimicrobianos e sideróforos; assimilação e solubilização de nutrientes (ARAUJO e GUERREIRO,

2010; MAZZUCHELLI et al., 2011; BAYSAL e TOR, 2014; SIVASAKTHI et al., 2014; WU et al., 2015).

Esses serviços biológicos são realizados por meio do metabolismo natural de isolados de *Bacillus* podendo ser úteis aos vegetais. Tais processos de afinidade entre isolados de *Bacillus* e vegetais são iniciados pela liberação pelos vegetais de exsudatos ricos em açúcares, ácidos dicarboxílicos e aminoácidos, além de grande variedade de metabólitos secundários produzidos pelas plantas. Os exsudatos formam um ambiente atrativo para isolados de *Bacillus* e para outros microrganismos presentes no ambiente, no qual as plantas se desenvolvem. Este quadro alimentar é continuado enquanto as condições forem satisfatórias, propiciando a multiplicação e colonização por microrganismos (SIVASAKTHI et al., 2014; CAMPOS, 2010).

Bacillus spp. podem ser encontradas endofiticamente no interior de tecidos vegetais, na rizosfera (rizosférico), dentro (epifítico) e sobre (filoplano) os vegetais (HASSAN et al., 2010; WU et al., 2015). Este é um dos mais importantes grupos de microrganismos utilizados comercialmente para promoção de crescimento vegetal e o biocontrole de fitopatógenos (KUNDAN et al., 2015; GUPTA et al., 2016; XU et al., 2016).

Mecanismos biológicos em vegetais podem ser promovidos, direta ou indiretamente, por isolados de *Bacillus*. Tais mecanismos podem gerar uma melhor adaptação dos vegetais ao ambiente. Além disso, podem ser efetivos na produção de enzimas líticas que degradam compostos orgânicos complexos em moléculas menores e com melhor absorção pelas plantas de diversos nutrientes, principalmente os macronutrientes. Também podem ser efetivos na promoção da ligação de efetores que são os indutores de resistência sistêmica dos vegetais, tornando-os assim ativos para defesa das plantas contra o ataque de patógenos (WU et al., 2015; BAYSAL et AL., 2014; GUPTA et al., 2016).

As características diretas de promoção de crescimento vegetal são: produção de hormônios vegetais e sideróforos e promoção da assimilação e solubilização de nutrientes. E como características indiretas: indução de resistência e ação contra microrganismos patogênicos (BAYSAL et AL., 2014; KUNDAN et al., 2015; WU et al., 2015; GUPTA et al., 2016; XU et al., 2016). As principais espécies de *Bacillus*

reconhecidas como agentes promotores de crescimento são: *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus* e *Bacillus firmus*. Isolados de *Bacillus* podem ser efetivos para a promoção de crescimento em cana-de-açúcar, milho, soja, arroz e feijão entre outras culturas agrícolas (MARIANO et al., 2004; CHOWDHURY et al., 2010; DORIGHELLO et al., 2014; FERREIRA, 2015; MARTINS et al., 2015; WU et al., 2015).

Também é importante o biocontrole de fitopatógenos realizado por diversos isolados de *Bacillus*. Sua eficácia é descrita em trabalhos na literatura mundial, onde isolados apresentaram uma ou mais características desejáveis a um agente de controle biológico (CAWOY et al., 2014; CHOWDHURY et al., 2015; MARTINS et al., 2015; RAZA et al., 2016). Muitos isolados de *Bacillus* apresentam características de produção de substâncias inibidoras de determinados grupos de fitopatógenos (LANNA FILHO et al., 2010; CAWOY et al., 2014; DORIGHELLO et al., 2014). Diversos autores relataram a efetividade de isolados de *Bacillus* contra fitopatógenos, inclusive aos que são habitantes do solo. As espécies de *Bacillus* mais utilizadas para o controle de fitopatógenos são: *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus*, *B. firmus*, *B. insolitus*, *B. methylotrophicus* e *B. megaterium* (EARL et al., 2008; DORIGHELLO et al., 2014; FERREIRA, 2015; MARTINS et al., 2015; WU et al., 2015; RADHAKRISHNAN et al., 2017). A efetividade de *Bacillus* sobre os seguintes gêneros: *Sclerotinia*, *Sclerotium*, *Fusarium*, *Thielaviopsis*, *Cercospora*, *Alternaria*, *Botrytis*, *Colletotrichum*, *Micosphaerella*, *Sphaerotheca*, *Rhizoctonia*, *Cryptosporiopsis*, *Uncinula*, *Pyricularia*, *Pythium*, *Phytophthora*, *Erwinia*, *Ralstonia*, *Xanthomonas*, *Meloidogyne* e *Pratylenchus* é relatada por Martins et al. (2015); Wu et al. (2015); Gupta et al. (2016); Le et al. (2018) e Reis et al. (2018) entre outros.

Isolados de *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens* reduziram, em condições controladas, a severidade de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em feijoeiro (MARTINS et al., 2015). Também foi descrito a efetividade de isolados de *B. subtilis* e *B. pumilus* no controle de *Phakopsora pachyrhizi* em soja (DORIGHELLO et al., 2014).

No Brasil, existem produtos registrados junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento à base de *Bacillus* com as recomendações de controle de fitopatógenos do solo. *B. firmus* é registrado para controle de *Meloidogyne javanica*,

Meloidogyne incognita e *Pratylenchus brachyurus*; *B. subtilis* para o controle de *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *P. brachyurus*; e *B. methylotrophicus* para o controle de *M. incognita* e *P. brachyurus* (BRASIL, 2018).

2.4.2 Controle biológico de doenças e promoção de crescimento da cana-de-açúcar promovidos por isolados do gênero *Bacillus*

Em cana-de-açúcar, os estudos com microrganismos para promoção de crescimento é realizada por diversos grupos de pesquisa que preconizam o uso espécies de rizobactérias promotoras de crescimento (PRPG) do grupo das diazotróficas (MARIANO et al., 2004; SANTOS et al., 2012; SILVA et al., 2015). Essas bactérias têm boa relação com plantas de cana-de-açúcar e podem promover resultados eficientes para a cultura. São exemplos de PRPGs: *Acetobacter*, *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia* e *Herbaspirillum* (CANUTO, 2008; CAMPOS, 2010; CHAVES et al., 2015; HASSAN et al., 2015; JOSHI e JOSHI, 2017). Existem vários isolados de *Bacillus* recomendados para promoção de crescimento vegetal em cana-de-açúcar, em razão de diversas características, como a assimilação de nitrogênio, a solubilização de fosfato e a produção de fitohormônios.

Isolados de *B. subtilis* apresentaram característica de fixar o N atmosférico e disponibilizar este nutriente para plantas de cana-de-açúcar (GARLI et al., 2014). Baldini et al. (2005) descrevem, em uma revisão bibliográfica, que populações indígenas de *Bacillus* podem ser manejadas nos solos brasileiros para favorecer essa característica. Santos et al. (2012) afirmaram que isolados de *Bacillus* permitiram absorção de outros nutrientes pelas plantas (fósforo e enxofre) e promoveram melhores condições fisiológicas em resposta às condições de estresse salino. Santos et al. (2017) descreveram que algumas variedades de cana-de-açúcar respondem bem a presença de *Bacillus* sp., com aumento da quantidade de N em sua biomassa. Chauanan et al. (2012) e Santos et al. (2012) afirmaram que a utilização de determinados isolados de *Bacillus* spp. permitiram melhor abastecimento de fósforo para plantas de cana-de-açúcar, elevando sua biomassa. Estes autores comprovaram a informação, após testarem por meio de testes bioquímicos *in vitro* e *in vivo* (na

presença de mudas de cana-de-açúcar), isolados de *Bacillus* obtidos de diversas fontes (solos e plantas). Campos (2010) descreve incremento em mudas de cana-de-açúcar na presença de isolados de *Bacillus* spp. Este aumento está relacionado à produção de auxina por esses microrganismos. A resistência a estresse salino também é relatada em plantas de cana-de-açúcar na presença de isolados de *Bacillus* spp. (GARLI et al., 2014).

2.4.3 Controle biológico de doenças e promoção de crescimento da milho promovidos por isolados do gênero *Bacillus*

Wu et al. (2005) descreveram que a inoculação de isolados *Bacillus* spp. favoreceu um melhor aproveitamento de nutrientes do solo. Lizárraga-Sánchez et al. (2015), testando diferentes isolados de *Bacillus* spp. provenientes de áreas de plantio com milho, afirmaram que houve um acréscimo produtivo de plantas de milho. Kulimushi et al. (2017) verificaram que plantas de milho tratadas com *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*, na presença de *Rhizomucor variabilis*, desenvolveram melhor que a testemunha.

Isolados de *Bacillus* podem ser utilizados, segundo relatos da literatura, como agentes de biocontrole, direto ou indireto, de microrganismos fitopatogênicos ao milho (WU et al., 2005; LIZÁRRAGA-SÁNCHEZ et al., 2015; KULIMUSHI et al., 2017). Kulimushi et al. (2017) descreveram a efetividade de diferentes isolados de *Bacillus* sp. contra *R. variabilis*, na qual isolados de *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* promoveram o aumento de enzimas de defesa nas plantas, produziram substâncias antagônicas a este fungo e ainda foram efetivas na promoção de crescimento vegetal. Pereira et al (2011) e Lizárraga-Sánchez et al. (2015) afirmaram que isolados indígenas de *Bacillus* spp. podem ser úteis para o biocontrole de *F. verticillioides* em plântulas de milho, reestabelecimento da sanidade e fisiologia de sementes e plântulas desta gramínea.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Localização dos experimentos, dados climáticos e solo trabalhado

Os ensaios foram desenvolvidos no Laboratório de Microbiologia Ambiental e casa-de-vegetação pertencentes a Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna – SP. O clima da localidade é descrito como Cfa, com temperatura média de 19.9 °C e umidade média em torno de 80%.

Em todos os ensaios *in vivo* foi utilizado um Latossolo Vermelho Amarelo com as seguintes características químicas e físicas (0–20 cm): pH em água = 5,8; Matéria orgânica = 25,5 g kg⁻¹; P = 3,5mg cm⁻³; K = 1,51, Ca = 27,5, Mg = 8,5, Al=1, H = 35; Condutividade Elétrica = 73,5 mmol dm⁻³; SB% = 50,8 e argila = 450 g kg⁻¹.

3.2 Organismos trabalhados

Os 162 isolados de *Bacillus* spp. utilizados no presente estudo (BETTIOL, 1988) foram reativados em meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA), com incubação a 28±2°C, por 48 h no escuro. Também foi utilizado o biofungicida à base de *Bacillus subtilis* QST 713 (Serenade®, Bayer© San Felipe, México) para os ensaios *in vivo*.

O isolado de *T. paradoxa* (CMAA 1194) foi multiplicado em placas de Petri contendo meio BDA e foram mantidas a 25±2 °C, no escuro por oito dias. A suspensão de esporos foi obtida transferindo 5 ml de água de torneira esterilizada para cada placa e a sua superfície foi raspada com alça de Drigalski. A suspensão foi homogeneizada e a concentração de 10⁶ conídios/mL calibrada em hematocítômetro. Foi testada a patogenicidade deste isolado inserindo palitos de dente previamente colonizados pelo fungo em toletes de cana-de-açúcar livres do patógeno, estes foram incubados em câmara úmida (25° C, no escuro e por 4 dias) e pode-se verificar a patogenicidade deste por meio do postulado de Koch.

O isolado de *F. verticillioides* utilizado foi o F405 (CNPMS), proveniente de Manaus – AM e referenciado por Lanza *et al.* (2014). Quando necessário este isolado foi multiplicado em placas de Petri contendo BDA e mantidas a 25±2 °C, no escuro, por oito dias. A suspensão de esporos foi obtida transferindo 5 ml de água de torneira

esterilizada para cada placa e a sua superfície foi raspada com alça de Drigalski. A suspensão foi homogeneizada e a concentração de 10^6 conídios/mL calibrada em hematocitômetro para uso logo após o seu preparo. A patogenicidade do isolado *F. verticillioides* F405 foi constatada em milho comum e milho pipoca. Para este teste, uma suspensão de conídios foi utilizada para infestação do solo na concentração de 10^6 conídios/g de solo. Em seguida, foram semeadas dez sementes de milho em cada vaso, com quatro repetições para cada isolado, onde cada repetição correspondia a um vaso. Após 10 dias da semeadura, as plântulas foram retiradas dos vasos, lavadas e uma secção de 1 cm de comprimento foi feita no colo de cada planta. Estes fragmentos foram desinfestados em NaClO (1% por 2 minutos), transferidos para placas de Petri contendo BDA e incubadas em BOD por cinco dias, a 25 ± 2 °C, com 12 h de luz. Após este período foi avaliada a porcentagem de incidência de *F. verticillioides* nos fragmentos. Também foi analisada a capacidade deste isolado em causar os sintomas característicos desta patologia nas plântulas de milho trabalhadas (Machado et al., 2013).

As variedades de milho utilizadas foram: o milho comum AL Bandeirante, com ciclo semiprecoce (130-140 dias) e produtividade média de 7.000 kg/ha e a de milho pipoca a IAC 367 que tem como característica o ciclo precoce (90-100 dias) e produtividade média de 4.000 kg/ha (CATI, 2001). A variedade de cana utilizada foi a RB92579 que apresenta as seguintes características: ótima produtividade, perfilhamento e brotação de soca, fechamento entre linha e colheitabilidade, porte semiereto, eficiente no uso da água, boa produção de sacarose e resistência à escaldadura das folhas e resistência moderada ao carvão (RIDESIA, 2010).

3.3 Seleção dos isolados de *Bacillus* spp. com base na produção de metabólitos promotores de crescimento, assimilação e solubilização de nutrientes

Para a realização dos testes de produção de ácido cianídrico (HCN), ácido indolacético (AIA) e sideróforos (SID); solubilização de fosfato (FOSF), assimilação de nitrogênio (AN) e catalase (CAT), os isolados de *Bacillus* foram previamente crescidos em Trypticaseina-Soja-Ágar (TSA) a 28°C por 96 h no escuro.

Para avaliar a produção de HCN, discos de 5 mm de diâmetro de TSA com o crescimento dos isolados de *Bacillus* foram transferidos para Placas de Petri contendo meio TSA autoclavado, diluído 10 vezes e acrescido de 15 g de ágar por litro de água destilada. Na outra face da placa de Petri foi colocado um disco de papel de filtro saturado com solução de ácido pícrico (0,5% v/v) e Na₂CO₃ (2,0% p/v). As placas foram vedadas com plástico-filme, invertidas e incubadas a 28°C por 24 h no escuro. A mudança da coloração do papel de filtro de amarelo para marrom-alaranjado, após o tempo de incubação, indicava a produção de HCN (MISHRA e ARORA, 2012).

Para avaliar a produção de AIA foi adicionado 1,021 g L⁻¹ de L-triptofano no meio TSA modificado (mesma condição do parágrafo anterior), este foi autoclavado e vertido em placas de Petri esterilizadas. Em seguida, discos de 5 mm de diâmetro de TSA, com o crescimento dos isolados de *Bacillus* spp. foram transferidos para o centro das placas e essas foram incubadas a 28°C por 24 h no escuro. Posteriormente, foram colocados no interior das placas de Petri discos esterilizados de membrana de nitrocelulose saturada com a solução de Salkowski (1 mL de solução de FeCl₃.6H₂O 0,5 mol L⁻¹ em 50 mL de HClO₄ 35,0%). Os isolados que formaram um halo avermelhado na membrana foram considerados produtores de AIA (CAMPOS, 2010; QUECINE, 2014);

A solubilização de fosfatos foi avaliada utilizando o meio de cultura NBRIP autoclavado [10,0 g de glicose, 5,0 g de MgCl₂.6H₂O, 0,25 g de MgSO₄.7H₂O, 0,2 g de KCl, 0,1 g (NH₄)₂SO₄, 50 g de Ca₃(PO₄) e 15 g de ágar para cada 1000 mL de água destilada] (NAUTIYAL, 1999). Foi avaliado um isolado por placa, esta foi incubada a 28°C, por 7 dias e no escuro. Como resultados positivos para esta característica foi considerada a formação de um halo transparente em volta das colônias de *Bacillus* (CAMPOS, 2010; MISHRA e ARORA, 2012);

Para a avaliação da assimilação de nitrogênio foi empregado o meio de cultura NFB autoclavado [5,0 g de ácido málico; 0,5 g de K₂HPO₄; 0,2 g de MgSO₄.7H₂O; 0,1 g de NaCl; 0,002 g de CaCl₂.2H₂O; 2 mL de solução de micronutrientes (0,04 g de CuSO₄.5H₂O; 1,20 g de ZnSO₄.7H₂O; 1,40 g de H₃BO₃; 1,00 g de Na₂MoO₄.2H₂O e 1,175 g de MnSO₄.H₂O para cada 1000 mL de água destilada), 2 mL de azul de bromotimol (solução de 0,5% em 0,2 N de KOH); 4 mL de FeEDTA (solução 1,64%), 1 mL de solução de vitaminas (10 mg de biotina; 20 mg de piridoxol - HCl dissolvidos

em banho-maria e com o complemento com água destilada até completar o volume de 100 mL de solução) e 4,5 g de KOH]. Os reagentes foram adicionados na ordem descrita em Becker com capacidade de 2000 mL, o pH foi ajustado para 6,5 a 6,8 com a adição de NaOH e foi completado o volume da solução para 1000 mL com água destilada (DOBENREINER et al., 1995). A solução foi preparada com utilização de um agitador, adicionando 10 g de ágar por litro e foi colocada um alíquota de 5 mL em frascos de penicilina com capacidade de 15 mL. Estes frascos foram fechados com um tampão de algodão e gaze. Estes conjuntos foram autoclavados (121 °C, 1 atm por 20 minutos) e, posteriormente, quando resfriados em temperatura ambiente foram colocados em ambiente asséptico e para cada frasco foram transferidos 100 µl de suspensão de *Bacillus*, previamente crescido por 24 h a 28°C em TSA diluído 10 vezes com o acréscimo de 15 g de ágar por litro de água destilada (CAMPOS, 2010; QUECINE, 2014). Os fracos foram incubados em BOD por dez dias a 28°C, no escuro e avaliados de acordo com a metodologia proposta por Quecine (2014). Nesta avaliação foram identificados isolados produtores de crescimento entre o terço médio e inferior da coluna do meio semisólido evidenciando assim a assimilação de nitrogênio (CAMPOS, 2010).

Para o teste de identificação da produção de sideróforos, foi utilizado 100 µl de suspensão de crescimento dos isolados de *Bacillus*, previamente crescido TSA modificado e autoclavado, com as seguintes condições de incubação: temperatura de 28°C, por 24 h, no escuro e em agitação constante a 400 rpm. Os isolados de *Bacillus* foram transferidas para meio líquido KB (20,0 g de Proteose Peptona n° 3; 1,5 g de K₂HPO₄; 1,5 g de MgSO₄.7H₂O; 15 mL de glicerol e 1000 mL de água destilada) e incubados a 28°C por 24 h, no escuro e em agitação constante a 400 rpm. Após este período, adicionou-se 1 mL das culturas em microtúbulos estes foram centrifugados durante cinco minutos a aproximadamente 9500 rpm (DÖBEREINER et al., 1995). Em seguida, 100 µl do sobrenadante de cada cultura foram adicionados a poços de microplacas juntamente com 100 µl do reagente Cromo Azurol (CAS). O CAS foi preparado misturando de 7,5 mL da solução A (12,2 mg de Cromo Azurol S e 10 mL de água deionizada) a 1,5 mL da solução B (84 mL de HCl concentrado; 100 mL de água deionizada e 27 mg de FeCl₃.6H₂O). Depois a solução produzida anteriormente foi adicionada a solução C (21,9 mg de HDTMA e 25 mL de água deionizada morna) juntamente com a solução D (4,307 g de piperazina anidra, 40 mL de água deionizada

e ajustado o pH para 5,6 com HCl) e por fim o volume desta solução foi completado para 100 mL com a adição de água deionizada (RIBEIRO, 2010). Após trinta minutos da agregação entre o CAS com a cultura dos isolados de *Bacillus* avaliou-se a presença da coloração alaranjada ou amarelada das amostras, apontando assim a produção de sideróforos pela cultura. Para controle negativo foi usado o meio KB, sem inóculo (RIBEIRO, 2010).

O teste de catalase foi procedido utilizando placas de Elisa, nas quais foram depositados 0,5 mL de peridóxido de hidrogênio e 100 µl de suspensão de crescimento de *Bacillus* (crescido por 24 h a 28°C em TSA no escuro). Os isolados foram classificados como positivos para esta característica quando houve a formação de bolhas (ROMEIRO, 2001; MARINGONI, 2010).

Os testes de seleção dos isolados com base na produção de metabólitos promotores de crescimento, assimilação e solubilização de nutrientes, produção de hormônios e sideróforos apresentaram resultados positivo (+) e negativos (-). Também foram realizados os testes de média em função do número de isolados de apresentaram resultados positivos para cada uma das variáveis em questão.

3.4 Seleção dos isolados de *Bacillus* com base no biocontrole de fitopatógenos

3.4.1 Seleção de isolados antagônicos a *T. paradoxa*

A inibição do crescimento micelial *in vitro* de *T. paradoxa* com a utilização dos 162 isolados *Bacillus* foi avaliada por meio da técnica de pareamento. Para uma das extremidades de placas de Petri contendo BDA foram transferidos discos de 0,5 cm de diâmetro do crescimento dos isolados de *Bacillus*. Em seguida, as placas foram incubadas por 48 h, com a temperatura de 25°C sob fotoperíodo de 12 h. Depois da incubação, foram transferidos discos de 0,5 cm de diâmetro contendo micélio de *T. paradoxa* na outra extremidade da placa e novamente incubadas a temperatura de 25°C, por 72 h e sob fotoperíodo de 12 h. Após este processo foi avaliada a inibição do crescimento do fitopatógeno pelos isolados de *Bacillus*. Foi calculada a porcentagem de inibição do crescimento micelial de *T. paradoxa* em função da

testemunha absoluta. Também foram atribuídas notas de inibição do crescimento micelial de *T. paradoxa*: <25,0% de inibição (+); entre 25,1-75,0% de inibição (++) e mais que 75,1% de inibição (+++).

Os isolados de *Bacillus* spp. foram selecionados dentre os 162 testados, por meio da maior frequência de resultados positivos para os atributos: metabólitos promotores de crescimento; assimilação e solubilização de nutrientes; e inibição do fitopatógeno. Os isolados selecionados foram usados nas próximas fases.

Os isolados de *Bacillus* spp. (AP-03, AP-12, AP-61, AP85, AP-88, AP-106, AP-115, AP117, AP-165, AP-210, AP-240 e AP-512) selecionados foram avaliados quanto a inibição do crescimento micelial, com a utilização do delineamento inteiramente casualizado, sendo realizada o teste estatístico da ANOVA e teste de Tukey para a análise das médias.

Também foi avaliada a inibição da germinação de conídios de *T. paradoxa* por meio da mistura de uma suspensão de *Bacillus* com uma suspensão de conídios do fungo. Para a obtenção da suspensão de células, os isolados de *Bacillus* foram inoculados no meio TSB (agitação constante de 400 rpm, pelo período de 24 h, na temperatura de 28°C e no escuro) e depois a suspensão foi padronizada em 10^8 UFC/mL, sendo esta equivalente a $OD_{550} = 0,1$ para cada isolado em separado. A suspensão de *T. paradoxa* foi obtida em colônias deste fungo previamente crescidas em BDA (cinco dias, temperatura de 25°C, por 72 h e com fotoperíodo de 12 h) em que foram colocados 10 mL de água estéril em cada placa, esfregados com alça de Drigasliki e filtrados em gaze. Esta suspensão de *T. paradoxa* foi calibrada em hemacitômetro ($2,0 \times 10^6$ conídios/mL). Foram colocados 1 mL de cada suspensão em microtúbulos de 3,0 mL. Esta suspensão foi incubada em BOD a 25°C, por 48 h e com fotoperíodo de 12 h. Após este período foram analisados 100 conídios em cada repetição, registrando o número dos conídios germinados ou não germinados com o auxílio de hemacitômetro. Foram realizadas quatro repetições para cada isolado. Os valores obtidos foram transformados em porcentagem de inibição em função do controle. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, realizada ANOVA e teste de Tukey para a comparação das médias.

3.4.2 Seleção de isolados antagônicos a *F. verticillioides*

A inibição do crescimento micelial e a germinação de conídios de *F. verticillioides* F405 foram realizadas com a utilização dos isolados de *Bacillus*: AP-03, AP-12, AP-61, AP85, AP-88, AP-106, AP-115, AP117, AP-165, AP-210, AP-240 e AP-512.

Para a inibição do crescimento micelial foram utilizadas placas de Petri contendo BDA. Para tal foram transferidos discos de micélio de 0,5 cm de diâmetro provenientes de colônias do isolado de *F. verticillioides* F405 com sete dias de crescimento em BDA, no escuro e com temperatura de 25 ± 2 °C e dos isolados de *Bacillus* com dois dias de crescimento em BDA, no escuro e com temperatura de 28 ± 2 °C. Os discos foram mantidos distantes 5 cm entre si. Estas placas foram acondicionadas em sala climatizada por oito dias, no escuro e com temperatura de 25 ± 2 °C. Para cada isolado foram utilizadas três repetições. A cada 48 h foi mensurado o crescimento micelial do *F. verticillioides* e calculada a taxa de crescimento e o crescimento total. A fórmula utilizada para o cálculo da taxa de crescimento foi: TAXA DE CRESCIMENTO = $\Sigma [(D1+D2)/ 2]/N$ (Sendo D1= diâmetro médio da colônia no transsecto 1; D2= diâmetro médio da colônia no transsecto 2; N= número de dias após a inoculação).

Para avaliar o efeito dos isolados de *Bacillus* na germinação de conídios, os isolados foram multiplicados em meio TSB (Tryptic Soy Broth) autoclavado (28 ± 2 °C por 48 h, no escuro, em agitação constante de 400 rpm em mesa agitadora). Após este período, para cada isolado de *Bacillus*, foi calibrada uma suspensão com o uso de espectrofotometro ($OD_{550} = 0,1 - 10^8$ UFC/mL). Também foi produzida uma suspensão de conídios do isolado *F. verticillioides* F405 (CNPMS) (10^6 conídios/mL), obtidas em placas de Petri provenientes de colônias com sete dias de cultivo. Em seguida, foi realizada a mistura destas suspensões com a adição de 10 µl de cada uma sob lâminas de vidro. As lâminas foram colocadas no interior de placas de Petri contendo folhas de papel toalha úmido. Foram realizadas quatro repetições para cada isolado. Estes conjuntos foram incubadas em BOD por 24 h. Após este período foram analisados 100 conídios por lâmina e contados o número dos conídios germinados. Os resultados foram transformados em porcentagem de inibição em relação ao tratamento controle.

3.5 Produção de metabólitos promotores de crescimento e assimilação de nutrientes

Os próximos testes foram realizados utilizando os isolados AP-03, AP-12, AP-61, AP-85, AP-88, AP-106, AP-115, AP-117, AP-165, AP-210, AP-240 e AP-512 de *Bacillus*. Os isolados foram previamente crescidos em meio TSB, por 48 h, com a temperatura de $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ e no escuro. Após este período, uma alíquota de 100 μl de suspensão de crescimento foi utilizada para inocular cada um dos meios de cultura nos processos descritos abaixo. Esta suspensão padronizada em 10^8 UFC/mL, sendo esta equivalente a $\text{OD}_{550} = 0,1$ para cada isolado em separado.

Para a determinação da produção de AIA os isolados foram incubados a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$, por 4 dias a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$, com a agitação constante de 120 rpm, no escuro e em meio BD acrescido de 100 mg L^{-1} de triptofano. Após quatro dias de crescimento as fases do material em crescimento foram separadas por centrifugação (12.000 rpm por 15 minutos). O sobrenadante foi recuperado da fase sólida e colocado em microtubos de 3 mL. O reagente de Salkowski (proporção de 2:1) foi adicionado ao sobrenadante e a reação ocorreu na temperatura do ambiente (25°C), no escuro. Depois de 25 min. a intensidade da coloração foi avaliada em espectrofotômetro com o comprimento de 530 nm. As concentrações de AIA, em mg mL^{-1} , foram calculadas a partir de uma equação: $y = 2,101x - 0,2829$; $R^2 = 0,91$ (OLIVEIRA et al., 2012).

A solubilização de fosfato foi avaliada por meio da utilização do meio NBRIP (descrito anteriormente), sem a adição de Ágar, por 7 dias, com a temperatura de $28\pm 2^{\circ}\text{C}$, com a agitação de 120 rpm e no escuro. Após este período o crescimento foi centrifugado (10.000 rpm por 5 minutos) e o volume de 1,5 mL do sobrenadante foi recuperado. Logo o sobrenadante foi misturado à solução reveladora de molibdato-vanadato de amônio (5% molibdato de amônio e 0,25% de vanadato de amônio; 1:1, v/v), em seguida esta mistura foi incubada em temperatura ambiente por 10 minutos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro calibrado para o comprimento de onda de 420 nm de absorbância. A quantificação dos fosfatos solubilizados, em mg mL^{-1} , foi por meio da equação: $y = 191,02x + 25,02$ ($R^2 = 0,92$) (CHEN et al., 2006);

A quantificação da produção de sideróforos foi realizada através da utilização do meio líquido KB, onde foram incubados os isolados, mantidos a 28°C por 24 h, no escuro e em agitação constante a 400 rpm. Uma alíquota de 1,5 mL do crescimento

foi centrifugada (10.0000 rpm por 5 minutos), o sobrenadante foi suspenso e depositado em poços de placas de Elisa (0,25 mL em cada poço). Em seguida foi adicionado 0,25 mL de CAS (descrito anteriormente), em seguida esta mistura foi incubada em temperatura ambiente, por 10 minutos e no escuro. A quantificação foi realizada com auxílio de espectrofotômetro calibrado com a absorvância de 630 nm. As concentrações de sideróforos, em mg/mL^{-1} , foram calculadas a partir de uma equação: $y=0,9571x-0,1071$; $R^2=0,89$ (RIBEIRO, 2010). Em todos os ensaios foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado e realizada ANOVA e teste de Tukey para a comparação das médias.

3.6 Efeitos de *Bacillus* spp. no controle de podridão abacaxi, na promoção de crescimento e vigor de mudas de cana-de-açúcar

Os ensaios foram conduzidos em casa de vegetação com o cultivo de mudas de cana em bandejas plásticas com capacidade para 4 L de solo.

Os toletes de cana-de-açúcar receberam os seguintes tratamentos: 1) Controle (água); 2) *B. subtilis* QST 713 (14,37 g/L – recomendação comercial do produto Serenade); 3) fungicida químico (Azoxistrobina + Ciproconazole - 200 + 80 g/L– recomendação comercial, produto Priori Xtra); 4) *B. velezensis* AP-03 e 5) *Bacillus* sp. AP-210. Em todos os tratamentos os toletes foram imersos nas respectivas suspensões por 1 hora, com agitações periódicas dos recipientes. Para os tratamentos com os isolados *B. velezensis* AP-03 e *Bacillus* sp. AP-210, a concentração da suspensão foi padronizada em 10^8 UFC/mL, sendo esta equivalente a $OD_{550}= 0,1$ para cada isolado em separado (CARDOSO e ARAÚJO, 2011).

Os toletes tratados foram transferidos para solo não infestado (ensaio de promoção de crescimento) e solo infestado com o patógeno (ensaio de biocontrole). O ensaio de promoção de crescimento foi realizado entre os meses de outubro a dezembro de 2017 e o de biocontrole entre maio e julho de 2017. Para o ensaio de biocontrole a infestação do solo ocorreu antes do plantio dos toletes, com a utilização de uma suspensão de esporos de *T. paradoxa* para obter a concentração de 10^4 esporos/g de solo. Além dos tratamentos descritos houve uma testemunha absoluta

sem inoculação do patógeno. O delineamento experimental utilizado foi em blocos ao acaso, com quatro repetições compostas de 15 toletes cada, sendo cada repetição constituída por uma caixa.

Em ambos os ensaios as avaliações consistiram na contagem do número de plantas emergidas e foram realizadas semanalmente até a coleta do material aos 60 dias após o plantio, após isto foi calculado o índice de velocidade de brotação (IVB), por meio da fórmula proposta por Maguire (1962) e adaptada por Chapola (2010): $(B1/N1) + (B2/N2) + \dots + (Bn/Nn)$; onde B1, B2...Bn é igual ao número de plantas emergidas nas respectivas avaliações e N1, N2...Nn o número de dias após o plantio.

No final do experimento foram avaliadas as seguintes variáveis: porcentagem de brotação, avaliando a porcentagem de brotação em cada repetição; altura total (cm), medindo toda a parte aérea das plantas; número de folhas, com a contagem das folhas de cada planta; diâmetro caulinar (mm), medida na altura do substrato com a utilização de um paquímetro digital; massa fresca e seca (para estas variáveis as plantas foram colhidas, lavadas, divididas em parte aérea e sistema radicular e os tecidos foram secados em estufa de ventilação forçada por 3 dias a 60°C, logo foram novamente pesados); incidência da doença, somente no ensaio de biocontrole, foi avaliada por meio do plaqueamento em BDA de fragmentos dos toletes de cada repetição que foram incubados por 48 h a 25±2°C e avaliados por meio da identificação do crescimento de *T. paradoxa* (%). Esta técnica foi utilizada devido a inexistência de sintomas visíveis nas condições do ensaio.

Para todas as variáveis os resultados foram transformados em médias dentro de cada repetição, exceto para a variável: índice de velocidade de brotação e porcentual de brotação. Os testes em casa-de-vegetação foram instalados em delineamento em blocos ao acaso, com quatro repetições cada, os resultados foram analisados pela ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5%. Estas análises estatísticas foram realizadas no programa Sisvar e as Figuras produzidos no programa Sigma Plot.

3.7 Efeitos de *Bacillus* spp. no controle de *F. verticillioides*, na promoção de crescimento e vigor de plantas de milho comum e pipoca

3.7.1 Promoção de crescimento de milho comum e pipoca por *Bacillus* spp.

Sementes de milho, das variedades milho comum e pipoca, foram imersas por uma hora nas suspensões dos isolados de *Bacillus* spp. (AP-3, AP-12, AP-61, AP85, AP-88, AP-106, AP-115, AP-117, AP-165, AP-210, AP-240 e AP-512) multiplicados em GPL (10 g de glicose; 10g de peptona; 5 g de extrato de levedura; 3 g de NaCl; 1 g de KH_2PO_4 ; 0,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 100 ml de água destilada e pH 6,0) na temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 h, no escuro, em agitação constante de 400 rpm, em mesa agitadora). A suspensão foi calibrada com o uso de espectofotômetro ($\text{OD}_{550} = 0,1 - 10^8$ UFC/mL).

Após imersão as sementes foram semeadas em vasos com capacidade de 500 mL preenchidos com o solo referido anteriormente. Em cada vaso foram semeadas dez sementes de milho. Para cada isolado foram utilizadas cinco repetições, sendo um vaso cada repetição. No tratamento controle as sementes foram imersas somente em água destilada. Este ensaio foi conduzido em casa-de-vegetação por oito dias após a semeadura. Foi utilizado o delineamento estatístico inteiramente casualizado.

Diariamente foram contadas as plantas emergidas para a determinação do índice de velocidade de emergência (IVE) (STANCATTE et al., 2015). Para o cálculo foi utilizada a fórmula proposta por MAGUIRE (1962): $(B1/N1) + (B2/N2) + \dots + (Bn/Nn)$; onde B1, B2...Bn é igual ao número de plantas emergidas nas respectivas avaliações e N1, N2...Nn o número de dias após o plantio. No final foram avaliados o teor de clorofila com auxílio do aparelho medidor de clorofila (SPAD Clorofila), a altura das plantas (desde o colo até a extremidade da maior folha), o comprimento do sistema radicular (desde o colo até a extremidade da raiz), o diâmetro da haste com auxílio de paquímetro digital e a massa seca da parte aérea e do sistema radicular.

3.7.2 Inoculação de *F. verticillioides* sementes de milho

O isolado de *F. verticillioides* F405 (CNPMS) foi inoculado nas sementes de milho comum pelo método de condicionamento osmótico. Placas de Petri foram vertidas com BDA acrescido de Manitol (73,5 g/L) em condições assépticas. Nestas foram inoculados discos de micélio do isolado de *F. verticillioides* e incubadas em BOD (cinco dias com a temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 12 h). Após este período as placas foram abertas em ambiente asséptico e sementes de milho foram colocadas sobre crescimento micelial de *F. verticillioides* formando uma camada única. Estas placas foram incubadas em BOD por 48 h, a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 12 h (MACHADO et al., 2013). As sementes inoculadas foram misturadas na proporção de 2:8 com sementes não inoculadas com o isolado *F. verticillioides* F405 (CNPMS) e esta mistura foi utilizada para a realização dos testes.

3.7.3 Seleção dos isolados de *Bacillus* spp. utilizados nos próximos testes com sementes de milho comum

Para os testes descritos a seguir foram utilizados isolados de *Bacillus* com bons resultados nos testes de antagonismo (crescimento micelial, taxa de crescimento e inibição da germinação de conídios), bem como os resultados dos testes de promoção de crescimento (item 3.6). Também foram usados dados referentes a caracterização das qualidades bioquímicas de assimilação e solubilização de nutrientes (itens 3.4, 3.5. e 3.6), produção de compostos hormonais e substâncias antagônicas a outros fitopatógenos (dados não publicados) e resultados obtidos em outros testes com o uso de outras culturas e fitopatógenos (DORRIGUELLO et al., 2013; DORRIGUELLO, 2017).

3.7.4 Tratamento de sementes de milho comum com *Bacillus* spp.

As sementes foram tratadas de acordo com a metodologia proposta por Machado (2000) com os seguintes tratamentos: a) Testemunha absoluta, com a utilização de água destilada; b) Testemunha inoculada, com a utilização de água destilada; c) Tratamento químico com o uso de Carboxina (200 g/L) + Thiram (200

g/L) (Vitavaz-Thiram®, Chemtura®), de acordo com as especificações do fabricante; d) *B. subtilis* QST-713, de acordo com as especificações do fabricante (Serenade®, Bayer Crop Science®), d) *B. velezensis* AP-03 e e) *Bacillus* sp. AP-210, ambas na proporção de 10^8 UFC/mL ($OD_{550}=0.1$) de acordo com a metodologia descrita no item 3.7.1. Para o tratamento com o uso do produto comercial *B. subtilis* QST 713 foi utilizado o produto diluído (10^8 UFC/mL). Em todos os tratamentos foram utilizadas sementes inoculadas com *F. verticillioides*, exceto na testemunha absoluta.

3.7.5 Testes de fisiologia e sanidade de sementes de milho inoculadas com *F. verticillioides* e tratadas ou não com de *Bacillus*

As avaliações da qualidade fisiológica e sanitária das sementes foram realizadas de acordo com as metodologias descritas em Brasil (2009). Germinação - para este teste foram colocadas as sementes de cada tratamento entre folhas de papel de germinação, estas folhas foram enroladas e acondicionadas em BOD (sete dias, a 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 12 h), após este período foram contados as sementes germinadas. Envelhecimento acelerado – as sementes de cada tratamento foram dispostas em camada única, dentro de caixas do tipo gerbox, a porção inferior do recipiente foi preenchida com 50 ml de água. Estas caixas foram incubadas a 42°C, por dois dias, sem luz e depois foi realizado o método descrito para a avaliação da Germinação em papel. Sanidade - para este teste sementes de milho foram dispostas sobre papel de filtro umedecido dentro de placas de Petri, estas placas foram acondicionadas em BOD por 24 horas (25 ± 2 °C, fotoperíodo de 12 h). Após este período foram acondicionadas em freezer por 24 horas (temperatura de -20°C, no escuro). Depois as sementes foram acondicionadas em BOD (cinco dias, a 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 12 h). Em seguida as sementes foram avaliadas em microscópio estereoscópico para a verificação do crescimento fungico sob as mesmas.

Para os ensaios de avaliação da germinação e do envelhecimento acelerado foram utilizadas quatro repetições com 50 sementes cada. Para o teste de sanidade foram utilizadas oito repetições de 25 sementes cada.

3.7.6 Avaliação do tratamento de sementes de milho inoculadas com *F. verticillioides* com diferentes cepas de *Bacillus*

Para avaliar a eficiência do tratamento das sementes sobre o controle de *F. verticillioides*, dez sementes de milho tratadas conforme descrito anteriormente foram semeadas em vasos com capacidade de 500 mL preenchidos com solo infestado com *Fusarium*. Estes vasos foram acondicionados em casa-de-vegetação por 10 dias. Após este período as plantas emergidas foram avaliadas conforme descrito anteriormente (item 3.7.1) e também avaliada a incidência de *F. verticillioides* nas plântulas (item 3.2).

Ainda foram estudados os efeitos dos tratamentos sobre os pigmentos fotossintetizantes em plântulas de milho. Assim, oito dias após a emergência das plântulas foi retirada a terceira folha de todas as plantas de cada repetição e, portanto, foi formada uma amostra composta para cada repetição em separado. Em laboratório foram analisadas as variáveis: clorofila a; clorofila b; clorofila a+b, carotenoides e clorofila a+b/ carotenoides, de acordo com a metodologia proposta por Szafranska et al. (2017). Os resultados foram expressos em $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Também foram realizadas análises de proteínas totais (PT), fenilalanina amônia-liase (FAL), peroxidase (PO) e polifenoloxidase (PPO) nas plântulas de milho. Para a realização destas análises foram coletadas as folhas restantes nas plântulas utilizadas para a análise de clorofilas. Estas amostras compostas foram acondicionadas em envelopes de papel alumínio, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer a -80°C . Em seguida foi realizada a maceração de 1 g de tecido vegetal utilizando almofariz, pistilo e nitrogênio líquido, para cada amostra composta. Após a obtenção de um pó fino e homogêneo foi adicionado 10 mL de uma solução tampão [$\text{C}_6\text{H}_9\text{NO}$ a 1%, $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 50 mM, pH 14 6.5 e fluoreto de fenilmetilsulfonila 1 mM (PMSF)] a este almofariz e ocorreu a homogeneização deste conteúdo com o auxílio do pistilo. Estas soluções foram colocadas em tubos plásticos com capacidade de 10 mL, estes foram centrifugados (3000 rpm, 4°C , 25 min), posteriormente o sobrenadante (extrato bruto) resultante do processo foi recuperado e armazenado em ultrafreezer a -80°C (BARACAT-PEREIRA et al., 2001).

A quantificação da atividade das proteínas totais foi realizada incubando 20 µL do extrato bruto em 200 µL de solução de Bradford:Água (7:3). Tal ação foi realizada em poços de placas de Elisa. A concentração de sólidos nos poços da placa foi lida em espectrofotômetro calibrado para a absorvância de 595 nm. Os resultados obtidos foram comparados com a seguinte curva padrão obtida com albumina $y = 207,25x - 3,9695$ ($R^2 = 0,9712$). Sendo então feita a correlação entre a absorvância e a quantidade de proteína dissolvida. Os dados obtidos foram expressos em mg mL^{-1} .

A quantificação da enzima FAL foi realizada com a colocação em poços de placas de Elisa de 20 µL do extrato bruto, logo após foi utilizado espectrofotômetro para a leitura do comprimento de onda (290 nm). Os resultados obtidos foram comparados com uma curva padrão de ácido cinâmico ($y = 146,45x + 11,125$; $R^2 = 0,9538$). Os dados obtidos foram expressos em $\mu\text{mol \acute{a}c. cin\acute{a}mico \cdot mg\ prote\acute{i}na^{-1} min^{-10}}$ (PASCHOLATI et al., 1986; CAKIR E SULE, 2009).

A quantificação de PPO foi determinada utilizando 20 µL de extrato bruto, colocado em poços de placas de Elisa e lido em espectrofotômetro calibrado com a seguinte programação: comprimento de onda 420 nm e programação cinética de 11 ciclos de 30 segundos cada. Os resultados obtidos foram expressos em unidades de PPO em $\text{mg}^{-1} \text{ tecido min}^{-1}$, com o um incremento de absorvância de 0,0001 por minuto de reação por miligrama de tecido (DUANGMAL; APENTEN, 1999).

A enzima PO esta foi determinada com a utilização de 20 µL do extrato, em poços de placas de Elisa e lido em espectrofotômetro calibrado com a seguinte programação: absorvância de 470 nm, em ciclo cinético de 8 ciclos por 30 s cada a 30°C de temperatura (HAMMERSCHMIDT et al., 1982). Os resultados obtidos foram expressos em unidades de PO em $\text{mg}^{-1} \text{ tecido min}^{-1}$, com um incremento de absorvância de 0,001 por min. de reação por mg de tecido (HALFELD VIEIRA et al., 2006).

Para os testes de germinação de conídios, análise da qualidade fisiológica e sanitária de sementes de milho, análise dos pigmentos fotossintetizantes em plantas de milho e análises proteica e enzimática de plântulas de milho foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado e realizada ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey. Para o teste de Promoção de crescimento de milho por *Bacillus* spp. e para o teste de biocontrole de *F. verticillioides* e promoção de crescimento em

plântulas de milho por *Bacillus* spp. foi utilizado o delineamento em blocos ao acaso, realizada ANOVA e teste de Tukey para a comparação das médias. Todas estas análises foram realizadas utilizando o programa estatístico R.

4 RESULTADOS

4.1 Seleção dos isolados de *Bacillus* com base na produção de metabólitos promotores de crescimento, assimilação e solubilização de nutrientes

Os 162 isolados trabalhados nesta pesquisa apresentaram diferenças entre si quanto a assimilação de nitrogênio; solubilização de fosfatos; produção de AIA, HCN e sideróforos e de catalase. Dentre estes, os que apresentaram maior frequência de características foram os isolados de *Bacillus* AP-12, AP-88, AP-165 e AP-240 com quatro resultados positivos cada (Figura 1). A maior parte dos isolados testados assimilaram nitrogênio (125 isolados – 77,16% dos isolados) ou produziram catalase (137 isolados - 84,56% dos isolados). Poucos isolados solubilizaram fosfato (32 isolados – 19,75% do total), sideróforos (15 isolados - 9,25% dos isolados) e apenas dois isolados (1,85% dos isolados) são produtores de HCN e de AIA (Figura 1). A descrição detalhada das características bioquímicas de cada isolado está apresentada no Anexo 1.

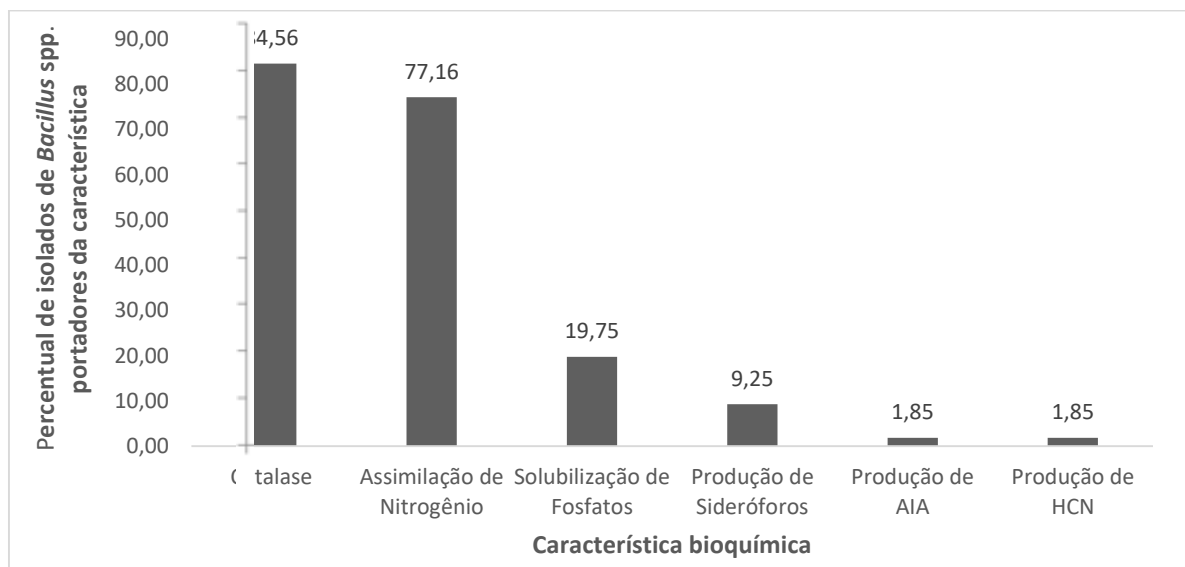


Figura 1 - Porcentual de isolados de *Bacillus* spp. que apresentaram resultados positivos quanto a assimilação de nitrogênio; solubilização de fosfatos; produção de ácido indolacético (AIA), ácido cianídrico (HCN), sideróforos e catalase.

4.2 Seleção dos isolados de *Bacillus* spp. com base no biocontrole de fitopatógenos

4.2.1 Seleção de isolados de *Bacillus* antagonísticos a *T. paradoxa*

Os 162 isolados de *Bacillus* spp. apresentaram diferenças entre a inibição de *T. paradoxa*, conforme descrito no anexo 2. Para 91 isolados (56,2% do total) a inibição de *T. paradoxa* foi inferior a 25%; para 68 isolados (41,97% do total) a inibição foi entre 25,1 e 75,0%; e para três isolados (1,84% do total) foi acima de 75,1%, sendo estes: AP- 115, AP-159 e AP-512, os quais inibiram totalmente o crescimento micelial do patógeno (Anexo 2).

Analisando a porcentagem de inibição micelial e germinação de conídios de *T. paradoxa* pela ação dos diferentes isolados de *Bacillus* spp., assinalados no item 3.4.1, pode-se afirmar que houveram diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,0001$) para essas variáveis. Os isolados AP-61, AP-117 e AP-512 inibiram completamente o crescimento micelial de *T. paradoxa*. Os isolados AP-03 e AP-210 inibiram a germinação de conídios de *T. paradoxa* em 82,9 e 85,9%, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1. Porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIM) e da germinação de conídios (PIC) de *Thielaviopsis paradoxa* por isolados de *Bacillus* spp.

Isolados	PIM	PIC
AP-03	30,5 bcd	82,9 gh
AP-12	37,1 de	45,4 bc
AP-61	100,0 g	67,8 ef
AP-85	44,6 e	37,1 ab
AP-88	8,0 a	29,7 a
AP-115	31,3 cd	51,8 cd
AP-117	100,0 g	53,4 cd
AP-161	75,7 f	72,7 fg
AP-165	22,9 bc	59,8 de
AP-210	21,4 b	85,9 h
AP-240	26,7 bc	71,9 fg
AP-512	100,0 g	60,2 de
p (12,2)	<0,0001	<0,0001
CV (%)	6,30	6,56

Legenda: ¹ As letras iguais na mesma coluna não diferem entre si (Teste de Tukey a 5% de probabilidade)

4.2.2 Seleção dos isolados de *Bacillus* spp. antagônicos a *F. verticillioides*

Os isolados de *Bacillus* apresentam características diferentes entre si em relação a efetividade do controle de crescimento micelial de *F. verticillioides* F405 (CNPMS). O isolado de *B. velezensis* AP-03 apresentou a maior inibição do crescimento micelial de *F. verticillioides*, com cerca de 2,3 cm e 3,14 de crescimento médio micelial e de taxa de velocidade de crescimento, respectivamente (Tabela 2). Os resultados referentes à inibição de germinação de conídios de *F. verticillioides* pelos isolados de *Bacillus* sp. estão descritos na Tabela 2. Estes apresentaram diferenças estatísticas entre si ($p < 0,0001$) e os isolados AP-03, AP-88, AP-210 e AP-512 foram diferentes dos demais, com inibição de 57,5%; 41,1%; 56,2% e 52,2%, respectivamente, em relação à testemunha (Tabela 2).

Tabela 2. Porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIM) e da germinação de conídios (PIC) e taxa de crescimento micelial (TCM) de *Fusarium verticillioides* promovidos por diferentes isolados de *Bacillus* spp..

Isolados	PIM	TCM	PIC
AP-03	62,1 ab	1,4 ab	57,5 e
AP-12	23,9 a	2,5 bc	38,4 cd
AP-61	24,5 a	2,6 c	35,8 bcd
AP-85	23,2 a	2,4 bc	53,1 e
AP-88	34,8 ab	2,1 ab	41,1 d
AP-115	26,7 a	2,4 bc	34,0 abcd
AP-117	43,3 ab	1,9 ab	27,8 ab
AP-161	46,3 ab	1,7 ab	29,6 abc
AP-165	30,1 ab	2,6 bc	25,2 a
AP-210	38,4 ab	1,5 ab	56,2 e
AP-240	22,9 a	2,5 bc	41,5 d
AP-512	66,0 b	1,0 a	52,2 e
p (12,2)	0,0043	0,0004	<0,0001
CV (%)	7,18	9,37	7,38

Legenda: ¹ As letras iguais na mesma coluna não diferem entre si (Tukey 5% de probabilidade)

4.3 Produção de metabólitos promotores de crescimento e assimilação de nutrientes

De acordo com os resultados obtidos para os testes bioquímicos quantitativos [produção de AIA; solubilização de fosfato; produção de sideróforos] houveram diferenças significativas entre os isolados trabalhados ($p < 0,005$). Para a produção de AIA, o isolado AP-12 foi o mais efetivo (16,96 mg/ml). Para a solubilização de fosfato os isolados *B. velezensis* AP-03 e *Bacillus* sp. AP-240 apresentaram os mais expressivos resultados dentre os isolados testados, com 305,13 mg/mL e 300,25 mg/mL, respectivamente. Para a variável produção de sideróforos o isolado AP-210 obteve melhor resultado dentre os demais (2,30 mg/mL) (Tabela 3).

Tabela 3 - Produção de ácido indolacético (AIA) e de sideróforos (SID) e solubilização de fosfato (FOSF) por isolados de *Bacillus* spp.

Isolados	AIA (mg/ml)	FOSF (mg/ml)	SID (mg/ml)
AP-03	11,86 abcd	305,13 f	1,96 ef
AP-12	16,96 d	135,13 a	1,66 ab
AP-61	13,68 bcd	163,35 abc	1,29 a
AP-85	12,96 abcd	216,41 e	1,31 a
AP-88	9,40 abc	215,56 d	1,49 abc
AP-115	7,51 a	169,51 bc	1,41 ab
AP-117	11,57 abcd	249,73 e	1,70 cde
AP-161	13,71 bcd	188,61 cd	1,90 de
AP-165	12,18 abcd	157,62 ab	1,70 cde
AP-210	14,86 cd	163,77 abc	2,30 g
AP-240	8,72 ab	300,25 f	1,69 cde
AP-512	11,64 abcd	189,03 cd	2,18 fg
p (12,2)	0,0002 **	<0,0001**	<0,0001**
CV (%)	16,07	4,80	5,34

Legenda: ¹ As letras iguais na mesma coluna não diferem entre si (Tukey 5%).

4.4 Efeitos de *Bacillus* spp. no controle de podridão abacaxi e na promoção de crescimento e vigor de cana-de-açúcar

Para o ensaio de promoção de crescimento vegetal foram observadas diferenças significativas para as variáveis clorofilas totais ($p = 0,0075$); massas frescas da parte aérea ($p=0,0044$), do sistema radicular ($p=0,0179$) e total ($p=0,0017$); e para as variáveis massas secas da parte aérea ($p=0,0085$) e total ($p=0,0174$). As demais variáveis não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos.

Em linhas gerais, foi verificado que os isolados *B. velezensis* AP-03 e *Bacillus* sp. AP-210 apresentaram resultados superiores quando comparados aos demais isolados (Tabela 4).

No ensaio de biocontrole foram verificadas diferenças significativas para porcentagem de brotação; altura das plantas; diâmetro caulinar; massas frescas da parte aérea, do sistema radicular e total das plantas; e massas secas da parte aérea e total para os diferentes tratamentos ($p=0.005$) (Tabela 5).

Em todas as variáveis o tratamento controle inoculado com *T. paradoxa* apresentou incidência da doença superior os demais tratamentos. O tratamento com *B. subtilis* QST 731 apresentou valores de diâmetro caulinar, altura total, massa fresca do sistema radicular e massa fresca total superiores e diferentes estatisticamente dos demais e da testemunha, de acordo com o teste de médias (Tabelas 5).

Tabela 4 - Resultado médio (Teste de Tukey) em relação às variáveis: Percentual de brotação (BR); diâmetro do caule (DC); altura total (AT); clorofila (CT); massa fresca da parte aérea (MFA), do sistema radicular (MFR) e total (MFT); massa seca da parte aérea (MSA), do sistema radicular (MSR) e total (MST) de mudas de cana-de-açúcar provenientes de toletes tratados com diferentes cepas de *Bacillus*.

Tratamentos	VARIÁVEIS									
	BR (%)	DC (mm)	AT (cm)	CT (mg g ⁻¹)	MFA (g/planta)	MFR (g/planta)	MFT (g/planta)	MSA (g/planta)	MSR (g/planta)	MST (g/planta)
Controle	60,41 a	4,04 a	24,47 a	37,57 a	3,06 c	0,80 ab	3,86 c	0,35 a	0,04 a	0,39 a
Azoxistrobina + Ciproconazole – 200 + 80 g/L	62,50 a	3,28 a	22,56 a	35,51 a	2,26 a	0,68 ab	2,94 a	0,49 b	0,04 a	0,53 b
<i>B. subtilis</i> QST 731	66,66 a	3,76 a	22,95 a	41,30 ab	2,48 abc	0,64 a	3,12 ab	0,35 a	0,04 a	0,39 a
<i>B. velezensis</i> AP-03	66,66 a	4,06 a	23,71 a	41,84 b	2,40 ab	0,82 ab	3,22 ab	0,34 a	0,05 a	0,39 a
<i>Bacillus</i> sp. AP-210	64,58 a	3,32 a	25,13 a	43,94 b	2,86 bc	0,87 c	3,74 bc	0,34 a	0,04 a	0,38 a
p (4,3)	0,3657	0,1049	0,244	0,0075	0,0044	0,0179	0,0017	0,0085	0,6332	0,0174
CV(%)	7,78	13,16	7,11	7,05	9,88	12,13	8,14	13,97	20,12	13,57

Legenda: ¹ As letras iguais na mesma coluna não diferenciam entre si (Teste de Tukey); ² * Significativo a 5,00% , ** Significativo a 1,00% e ns – não significativo.

Tabela 5 - Resultado médio (Teste de Tukey) em relação às variáveis: porcentual de brotação (BR); índice de doença (IN); diâmetro do caule (DC); altura total (AT); clorofila (CT); massa fresca da parte aérea (MFA), do sistema radicular (MFR) e total (MFT); massa seca da parte aérea (MSA), do sistema radicular (MSR) e total (MST) de mudas de cana-de-açúcar provenientes de toletes tratados com diferentes cepas de *Bacillus* e plantados em solo infestado com *Thielaviopsis paradoxa*.

Tratamentos	BR (%)	IN (%)	DC (mm)	AT (cm)	CT (mg g ⁻¹)	MFA (g/planta)	MFR (g/planta)	MFT (g/planta)	MSA (g/planta)	MSR (g/planta)	MST (g/planta)
Controle	75,0 bcd	0,0 a	5,04 a	28,80 b	36,00 ab	2,39 ab	1,85 ab	4,24 ab	0,45 ab	0,30 a	0,75 ab
Controle inoculado	50,0 a	83,3 c	4,51 a	23,36 a	34,03 a	1,83 a	1,32 a	3,15 a	0,25 a	0,19 a	0,44 a
Azoxistrobina + Ciproconazole – 200 + 80 g/L	88,3 d	35,0 b	5,06 a	25,22 ab	40,23 bc	2,41 ab	1,42 ab	3,83 ab	0,54 b	0,23 a	0,77 b
<i>B. subtilis</i> QST 731	70,0 bc	33,3 b	5,35 a	29,69 b	39,63 bc	2,84 b	1,97 b	4,81 b	0,52 b	0,32 a	0,84 b
<i>B. velezensis</i> AP-03	63,3 ab	26,7 b	4,65a	28,15 ab	42,34 c	2,75 ab	1,62 ab	4,37 ab	0,67 b	0,34 a	1,01 b
<i>Bacillus</i> sp. AP-210	78,3 cd	30,0 b	4,69 a	27,51 ab	37,06 ab	2,68 ab	1,78 ab	4,46 ab	0,52 b	0,35 a	0,87 b
p (5,3)^{2 3}	<0,0001	<0,0001	0,1655	0,1210	0,0007	0,0381	0,0843	0,0843	0,0013	0,2276	0,0012
CV(%)	9,03	14,28	9,56	8,43	5,60	16,56	19,58	19,58	20,96	34,23	17,71

Legenda: ¹ As letras iguais na mesma coluna não diferem entre si (Tukey 5%).

4.5 Efeitos de *Bacillus* spp. no controle de *F. verticillioides*, na promoção de crescimento e vigor de plantas e sementes de milho comum e pipoca

4.5.1 Promoção de crescimento de milho comum e pipoca por *Bacillus* spp.

Para o ensaio com milho comum, as variáveis comprimento radicular ($p < 0,0001$); altura ($p = 0,0059$); massas secas da parte aérea ($p < 0,0001$), do sistema radicular ($p < 0,0001$) e total ($p < 0,0001$) apresentaram valores significativos dentre os tratamentos pela ANOVA. O isolado *B. velezensis* AP-03 foi superior aos demais isolados em relação ao estande. O isolado *Bacillus* sp. AP-210 apresentou valores de clorofilas totais, massas secas radicular e total superior aos demais isolados (Tabela 6).

Para o ensaio com milho pipoca, as variáveis clorofilas totais ($p = 0,0165$), índice de velocidade de emergência ($p = 0,0234$), comprimento radicular ($p < 0,0001$); altura ($p = 0,0096$); massas secas do sistema radicular ($p < 0,0001$) e total ($p < 0,0001$) apresentaram valores significativos dentre os tratamentos pela ANOVA (Tabela 7).

Tabela 6. Efeito do tratamento de sementes de milho comum com *Bacillus* spp. no estande final de plantas (EF); clorofilas totais (CLO); massa seca do sistema radicular (MSR); massa seca da parte aérea (MSA); massa seca total (MST); diâmetro caulinar (DC); altura (A); comprimento do sistema radicular (CR) e índice de velocidade de emergência (IVE). Jaguariúna, SP.

Isolado	EF (%)	CLO (mg/g)	IVE	DC (mm)	CR (cm)	AL (cm)	MSR (g/planta)	MSA (g/planta)	MST (g/planta)
Controle	95,00 a	30,0513 a	9,4029 a	2,5092 a	25,1305 b	16,1250 b	0,2419 a	0,08416 b	0,3260 a
AP-03	100,00 a	29,0075 a	9,4285 a	2,3880 a	26,6375 b	17,8000 b	0,2377 a	0,0910 b	0,3287 a
AP-12	90,00 a	29,5932 a	9,4398 a	2,5585 a	26,3569 b	18,3743b	0,2806 b	0,0833 b	0,3639 b
AP-61	92,50 a	29,3425 a	8,6089 a	2,4831 a	26,6529 b	18,7444 b	0,2935 b	0,1045 c	0,3980 b
AP-85	97,50 a	29,2955 a	9,9470 a	2,4005 a	26,0527 b	18,3125 b	0,3067 b	0,0878 b	0,3945 b
AP-88	97,50 a	29,8888 a	9,8428 a	2,4089 a	26,6402b	18,5486 b	0,2971 b	0,0979 c	0,3950 b
AP-106	92,50 a	28,0635 a	9,1089 a	2,2968 a	26,3159 b	18,3034b	0,2506 a	0,1244 d	0,3750 b
AP-115	90,00 a	29,2801 a	9,1690 a	2,3793 a	26,4906 b	18,6062 b	0,3053 b	0,08775 b	0,3930 b
AP-117	97,50 a	29,7462 a	9,8428 a	1,9692 a	22,5069 b	17,5555 b	0,2819 b	0,0845 b	0,3664 b
AP-165	90,00 a	30,1013 a	8,2315 a	2,2071 a	26,2635 a	17,2680 b	0,2669 a	0,0892 b	0,3562 b
AP-210	95,00 a	30,3325 a	9,2988 a	2,3583 a	26,3888 b	17,7583 b	0,3136 a	0,0854 b	0,3991 a
AP-240	95,00 a	30,0991 a	8,4238 a	2,1843 a	25,8208 a	17,4819 b	0,2353 b	0,0688 a	0,3041a
AP-512	95,00 a	27,3894 a	7,4208 a	2,3780 a	20,9756 b	12,5270 a	0,2285 b	0,0665 a	0,3045 a
p (12,3)	0,7249 ns	0,4870 ns	0,1343 ns	0,2755 ns	<0,0001 **	0,0059 *	<0,0001 **	<0,0001 **	<0,0001 **
CV (%)	8,13	5,85	12,74	11,74	4,99	10,99	8,64	9,82	8,43

¹Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem entre si (Tukey 5%).

Tabela 7. Efeito do tratamento de sementes de milho pipoca com *Bacillus* spp no estande final de plantas (EF); clorofilas totais (CLO); massa 6 seca do sistema radicular (MSR); massa seca da parte aérea (MSA); massa seca total (MST); diâmetro caulinar (DC); altura (A); comprimento do 7 sistema radicular (CR) e índice de velocidade de emergência (IVE).

Isolado	EF (%)	CLO (mg/g)	IVE	DC (mm)	CR (cm)	AL (cm)	MSR (g/planta)	MSA (g/planta)	MST (g/planta)
Controle	97,05 a	30,77 ab	8,00 ab	1,68 a	27,17 bcde	19,78 ab	0,0900 a	0,0400 a	0,1300 bc
AP-03	90,00 a	31,65 b	7,46 ab	1,64 a	25,32 ab	22,07 ab	0,0775 a	0,0525 ab	0,1300 bc
AP-12	97,50 a	31,48 b	8,24 b	1,58 a	30,57 f	21,23 ab	0,0750 a	0,0575 ab	0,1325 bc
AP-61	95,00 a	30,47 ab	7,69 ab	1,63 a	29,96 def	21,15 ab	0,0750 a	0,0525 ab	0,1325 bc
AP-85	92,50 a	32,33 b	8,62 b	1,61 a	29,25 def	21,46 ab	0,0900 a	0,0600 ab	0,1300 bc
AP-88	95,00 a	30,16 ab	8,43 b	1,56 a	28,72 cdef	18,90 a	0,0625 a	0,0500 ab	0,1125ab
AP-106	100,00 a	30,06 ab	7,71 ab	1,59 a	29,50 def	21,52 ab	0,0675 a	0,0500 ab	0,1175 ab
AP-115	95,00 a	30,66 ab	7,81 ab	1,67 a	25,32 ab	20,97 ab	0,0775 a	0,0550 ab	0,1385 bc
AP-117	97,50 a	31,22 b	7,68 ab	1,45 a	27,10 bcd	20,87 ab	0,0675 a	0,0425 ab	0,1100 ac
AP-165	90,00 a	31,12 ab	7,68 ab	1,47 a	24,08 ab	25,23 b	0,0825 a	0,0450 ab	0,1275 ab
AP-210	100,00 a	30,71 ab	8,37 b	1,46 a	26,14 bc	21,15 ab	0,0700 a	0,0450 ab	0,1150 ab
AP-240	87,50 a	29,12 ab	7,23 ab	1,54 a	30,32 ef	22,11 ab	0,0775 a	0,0625 b	0,1400 c
AP-512	87,50 a	26,73 a	5,41 a	1,45 a	22,62 a	15,93 a	0,0700 a	0,0450 ab	0,1150 a
p value (12,3)	0,4207 ns	<0,0165	0,00234 *	0,5681ns	<0,0001 **	0,0096 *	0,2236 ns	0,0137*	<0,0001 **
CV (%)	9,03	5,75	7,73	11,45	4,62	12,059	17,27	17,05	7,47

¹Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem entre si (Tukey 5%); *Significativo a 5% **Significativo a 1% e ns—não significativo

4.5.2 Testes de fisiologia e sanidade de sementes de milho inoculadas com *F. verticillioides* e tratadas com *Bacillus* spp. ou produtos sintéticos

Nos testes de fisiologia de foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos para a germinação ($p < 0,0001$) e envelhecimento acelerado ($p < 0,0001$). Para a variável germinação, *B. subtilis* QST 713 diferiu dos demais tratamentos e apresentou germinação cerca de 9,71% acima da testemunha. Para a variável envelhecimento acelerado, os isolados *B. subtilis* QST 713, *B. velezensis* AP-03 e *Bacillus* spp. AP-210 foram semelhantes entre si e diferentes dos demais tratamentos, com destaque para o tratamento com o *B. velezensis* AP-03 que apresentou germinação de 11,11% acima da testemunha (Figura 2).

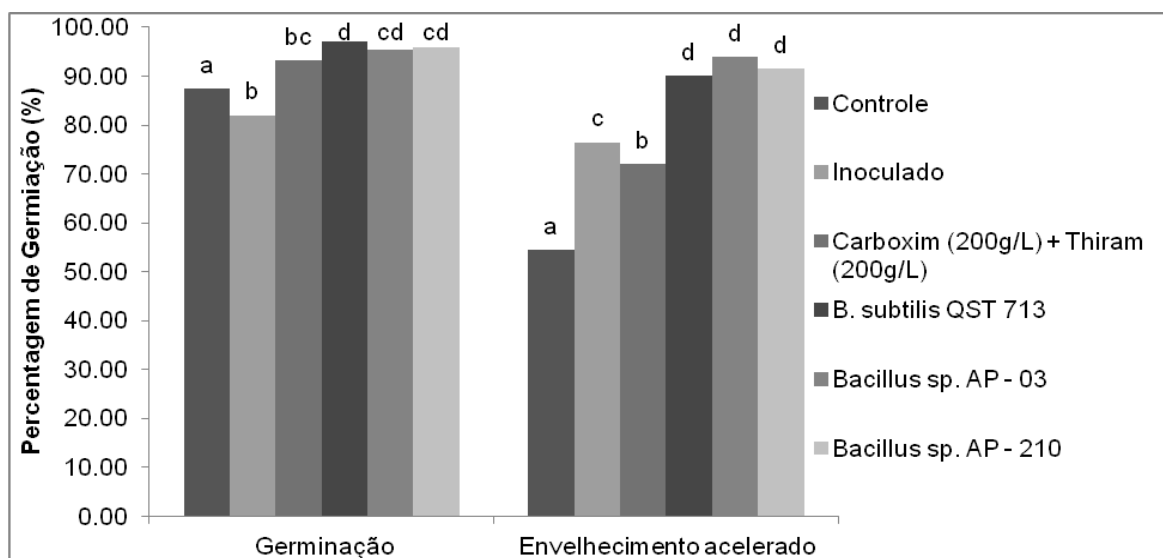


Figura 2 Efeito de *Bacillus* no tratamento de sementes de milho comum inoculadas com *Fusarium verticillioides* sobre a qualidade fisiológica destas por meio do teste de germinação e de envelhecimento acelerado.

No teste de sanidade das sementes as incidências foram de 40%, 32,4%, 30,2%, 3,5%, 1,7%, 1,4% e 0,91% para *F. verticillioides*, *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp.; *F. graminearum*, *Cladosporium* spp., *Coletotrichum* spp. e *Rhizopus* spp., respectivamente. Houve diferenças significativas quanto à incidência de *F. verticillioides* ($p < 0,0001$), *Aspergillus* spp. ($p = 0,0283$) e *Penicillium* spp. ($p < 0,0001$). Os demais fungos incidentes apresentaram incidência insignificante. Os isolados de

Bacillus spp. não diminuíram a porcentagem de incidência de *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. Para o *F. verticillioides*, *Bacillus* sp. diminuíram a incidência em 20%. O tratamento químico com Carboxim + Thiram foi o mais efetivo quando se avaliou a sanidade das sementes trabalhadas (Figura 3).

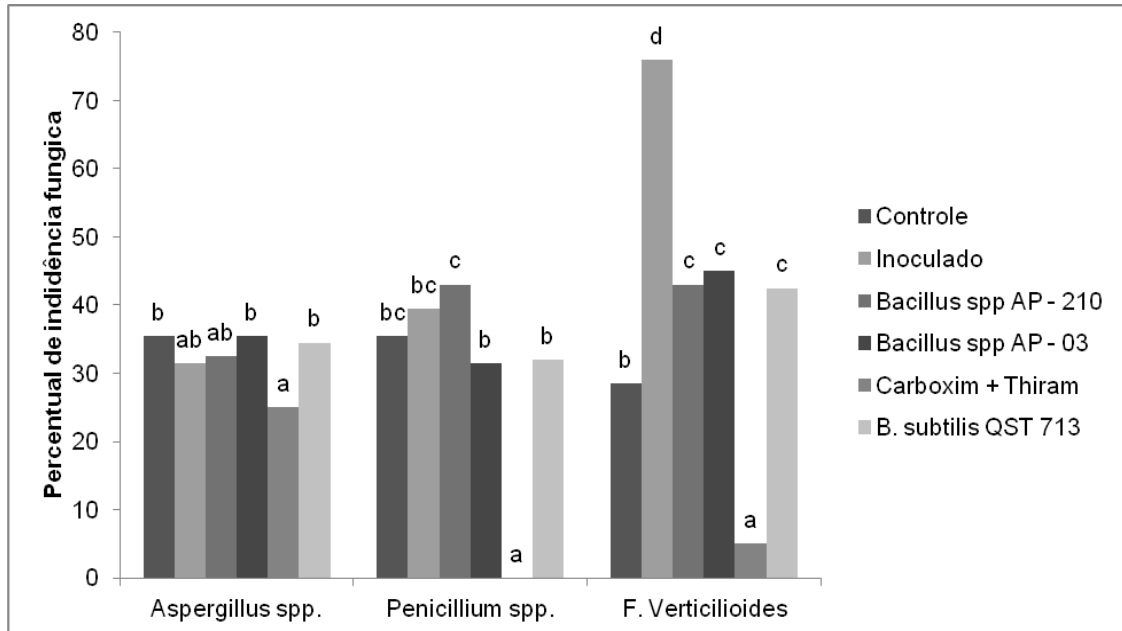


Figura 3. Efeito de *Bacillus* no tratamento de sementes de milho comum inoculadas com *Fusarium verticillioides* sobre a qualidade fisiológica destas por meio do teste de sanidade em relação a incidência de *Aspergillus* spp.; *Penicillium* spp. e *Fusarium verticillioides*.

4.5.3 Testes de fisiologia e sanidade de plântulas de milho provenientes de sementes inoculadas com *F. verticillioides* e tratadas ou não com *Bacillus* spp.

Para o experimento de biocontrole em vasos, as variáveis massa seca da parte aérea ($p < 0,0397$); massa seca total ($p < 0,0342$); diâmetro caulinar ($p < 0,0001$); altura ($p = 0,0073$); comprimento do sistema radicular ($p < 0,0001$) e incidência de *Fusarium* ($p < 0,0001$) foram significativamente influenciadas pelos tratamentos. Por outro lado, o estande ($p = 0,3331$); a massa seca do sistema radicular ($p = 0,1296$) e índice de velocidade de emergência ($p = 0,3116$) não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos (Tabela 8). As sementes tratadas com fungicidas

químicos e com os produtos biológicos apresentaram a menor incidência da doença (Tabela 8), sendo o tratamento com fungicidas o mais eficiente.

Tabela 8. Efeito do tratamento de sementes de milho com *Bacillus* spp. sobre o estande final de plantas (EF); massa seca do sistema radicular (MSR); massa seca da parte aérea (MSA); massa seca total (MST); diâmetro caulinar (DC); altura (A); comprimento do sistema radicular (CR), índice de velocidade de emergência (IVE) e incidência da doença (IN) em plantas de milho comum provenientes de sementes infestadas com *Fusarium verticillioides*.

TRATAMENTOS	EF (%)	MSR (g/planta)	MSA (g/planta)	MST (g/planta)	DC (mm)	A (cm)	CR (cm)	IVE	IN (%)
Controle	88,0 a	0,31 a	0,08 ab	0,39ab	1,85 a	14,08 ab	30,46 b	4,19 a	36,60 ab
Controle inoculado	76,0 a	0,27 a	0,06 a	0,33 a	1,59 a	13,59 a	24,47 a	3,72 a	97,14 d
Carbendazim + thiram	90,0 a	0,32 a	0,08 ab	0,40 ab	2,13 b	14,71 ab	32,77 b	4,17 a	25,38 a
<i>B. subtilis</i> QST 713	88,0 a	0,33 a	0,06 ab	0,39 ab	2,18 ab	14,76 ab	31,24 b	4,11 a	41,11 ab
<i>B. velezensis</i> AP-03	88,0 a	0,31 a	0,08 b	0,39 ab	2,33 ab	15,24 b	31,51 b	4,21 a	40,77 ab
<i>Bacillus</i> sp. AP-210	90,0 a	0,35 a	0,07 ab	0,42 b	2,44 b	14,53 ab	30,89 b	4,40 a	54,11 c
p value (5,4)²	0,3331	0,1296	0,0397	0,0342	<0,0001	0,0073	<0,0001	0,3116	<0,0001
CV (%)	11,23	13,34	12,03	10,76	6,69	4,24	6,03	11,01	19,31

¹Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem entre si (Tukey 5%); *Significativo a 5% **Significativo a 1% e ns—não significativo.

Maior produção de pigmentos verdes (lorofilas a, b e a/b) foi observada em todos os tratamentos com *Bacillus*. Para as análises de pigmentos fotossintetizantes, todas as variáveis (clorofila a; clorofila b; clorofila a+b, carotenóides e clorofila a+b/carotenóides) apresentaram diferenças significativas entre seus tratamentos ($p < 0,0001$). Maior produção de carotenóides foi observada nas plantas originadas de sementes infestadas com *Fusarium* e sem tratamento sanitário (Figura 4)

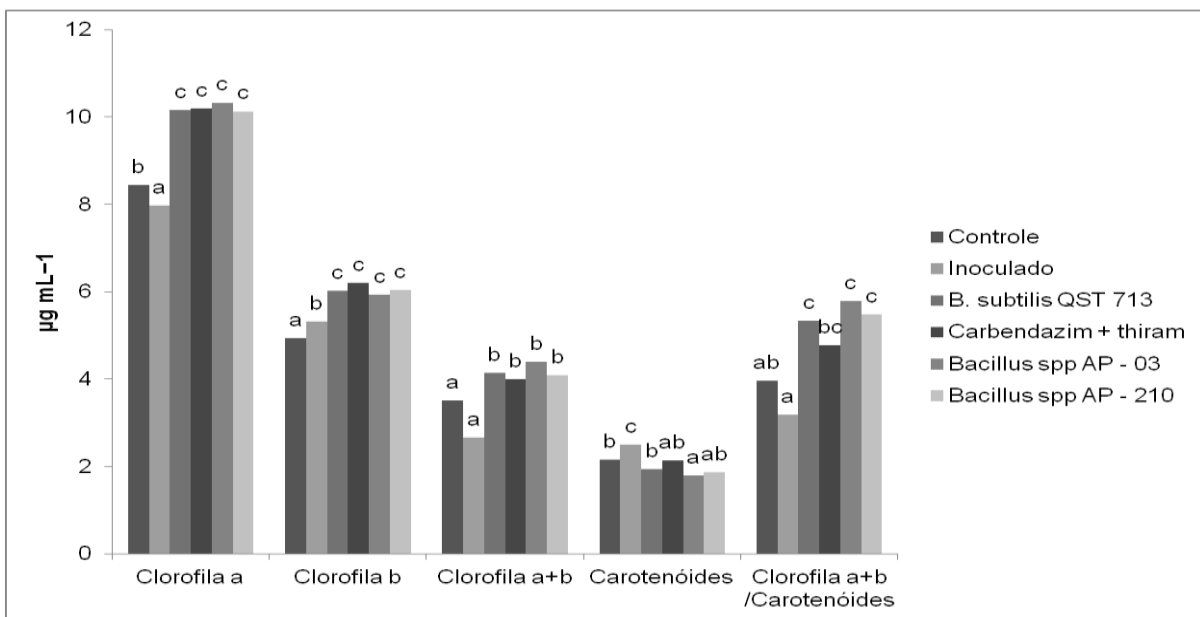


Figura 4 Efeito dos produtos biológicos sobre os pigmentos fotossintetizantes em plântulas de milho: clorofila a; clorofila b; clorofila a+b; carotenóides; clorofilas a+b/carotenóides.

Em relação às enzimas estudadas, foram verificados efeitos significativos para os tratamentos, sendo para FAL ($p = 0,0016$), PO ($p = 0,0004$) e PPO ($p = 0,0472$) (Tabela 5). A resposta a FAL foi maior nas plantas tratadas com o isolado *Bacillus* spp. AP-210 e diferente estatisticamente quanto aos demais, com um valor cerca de 75% acima da testemunha absoluta. Para PO e PPO o isolado *B. subtilis* QST 713 foi superior aos demais tratamentos, com um valores cerca de 13 e 83% acima da testemunha absoluta, respectivamente.

Tabela 9. Efeito de produtos biológicos sobre proteínas totais (PT), fenilalanina amônia liase (FAL), peroxidase (PO) e polifenoloxidase (PPO) em plantas de milho provenientes de sementes inoculadas com *Fusarium verticillioides*.

Tratamento	PT (mg mL ⁻¹)	FAL (μmol ác. cinâmico . mg proteína ⁻¹ min ⁻¹⁰)	PO (U mg ⁻¹ tecido min ⁻¹)	PPO (U mg ⁻¹ tecido min ⁻¹)
Controle	0,1591 a	0,0426 a	1,9328 b	0,8600 ab
Inoculado	0,1661 a	0,0596 abc	1,9720 c	1,1600 ab
Carbendazim + Thiram	0,1640 a	0,049 ab	1,6873 ab	0,5133 a
<i>B. subtilis</i> QST 713	0,1730 a	0,0495 ab	2,1984 c	1,5866 b
<i>B. velezensis</i> AP-03	0,1759 a	0,0677 bc	2,0661 c	1,0766 ab
<i>Bacillus</i> sp. AP-210	0,1625 a	0,0760 c	1,466 a	1,4166 ab
p value (5,2)	0,6176	0,0016	0,004	0,0472
CV (%)	7,11	11,71	7,25	12,87

¹Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem entre si (Tukey 5%); *Significativo a 5% **Significativo a 1% e ns—não significativo.

5 DISCUSSÃO

5.1 Seleção dos isolados de *Bacillus* com base na produção de metabólitos promotores de crescimento, assimilação e solubilização de nutrientes para vegetais

Microrganismos selecionados por testes *in vivo* e *in vitro* podem ser utilizados em formulações de biofertilizantes e biopesticidas favorecendo o cultivo de diversas culturas agrícolas, dentre estas, o milho e a cana-de-açúcar. Neste estudo foram avaliados isolados de *Bacillus* spp. provenientes de diversas fontes, dentre estes haviam isolados com reconhecida ação como agentes de biocontrole contra diversos patógenos e promotores de crescimento para importantes culturas comerciais (CARDOSO E ARAUJO, 2011; DORIGHELLO et al., 2015; BETTIOL et al., 1994).

Os isolados foram selecionados neste trabalho por meio de métodos bioquímicos que serviram para a descrição da efetividade destes microorganismos como agentes de promoção de crescimento vegetal. Os isolados produziram diversas substâncias relacionadas com o crescimento vegetal (Figura 1).

Adhikari et al. (2017) também testaram isolados bacterianos visando a seleção de cepas adaptadas a cultura do melão. Estes autores descreveram que dentre 35 cepas de bactérias Gram negativas e positivas foram selecionados, isolados de *Paenibacillus polymyxa* e de *Sinomonas atrocyanea* com potencial para a promoção de crescimento de plantas de melão e o biocontrole de *Acidovorax citrulli*. De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, de 162 isolados de *Bacillus* spp. foram selecionados 12 para os estudos subsequentes (*in vitro*) e dois para os estudos com plantas.

Sobre as características de promoção de crescimento verificadas nos isolados de *Bacillus* spp., a capacidade de assimilar nitrogênio atmosférico foi a segunda mais presente nos isolados avaliados (Figura 1). Esta função biológica é descrita na literatura como uma importante maneira de favorecer a absorção deste elemento pelos vegetais principalmente por conta do seu baixo custo energético. Esta característica biológica permite que moléculas de N₂ atmosférico sejam transformadas em amônia ou óxido nitroso, facilitando a sua absorção pelos vegetais e diminuindo a necessidade da utilização de fontes nitrogenadas. Este elemento é essencial em todos os

processos bioquímicos do vegetal e a possibilidade da utilização de microrganismos para este fim pode ser uma opção para a agricultura (SIVASAKTHI et al., 2014; KUNDAN et al., 2015; WU et al., 2015; XU et al., 2016). Os isolados de *Bacillus* spp. selecionados de acordo com a presença desta característica foram identificados por meio de resultados positivos no meio de cultura NFB (OLAREWAJU et al., 2017; XU e KIM, 2017). Os efeitos reflexos dessa ação podem ser visualizados na Figura 1, no qual os microrganismos promoveram maior aporte de N as mudas de cana-de-açúcar e milho (Tabelas 3, 4, 5 e 6). Os dois isolados selecionados para a terceira fase, o *B. velezensis* AP-03 e o *Bacillus* sp. AP-240, apresentam esta característica (Figura 1 e Anexo 1).

Sobre a solubilização de fosfato (Figura 1 e Tabela 3), o isolado *B. velezensis* AP-03 apresentou a maior solubilização de fosfato (Tabela 3). A solubilização deste elemento pelos isolados, provavelmente aconteceu por meio da transformação de moléculas maiores em moléculas mais simples: H_2PO_4 e HPO_4^{2-} , que são assimiláveis pelos vegetais (WU et al., 2015; XU et al., 2016). Sharma et al (2017) explicaram a dificuldade da aquisição de fontes naturais e sintéticas de fósforo para a agricultura, sua dinâmica diferenciada no solo e na planta são fatores limitantes para a produção mundial. Estes autores ainda discutem que a utilização de microrganismos capazes de solubilizar fosfato de diferentes fontes pode ser uma iniciativa importante para a agricultura. Sobre a quantificação de P-solúvel promovida por alguns isolados pode-se descrever que esta é considerada alta de acordo com Kavamura (2013). Este autor descreve que valores acima de 150 mg/mL de fosfatos solubilizados por um microrganismo é considerado alto e a maioria dos isolados testados neste parâmetro apresentaram resultados acima deste valor (Tabela 3).

Os sideróforos são responsáveis pela quelatização do elemento ferro. Assim, os íons deste elemento ocorrentes na suspensão do solo são capturados, armazenados e disponibilizados para os vegetais de maneira mais eficiente. Esta função permite que o ferro esteja menos disponível aos microrganismos não benéficos aos vegetais, inclusive ao fitopatógenos (KUNDAN et al., 2015; WU et al., 2015), como é o caso do *T. paradoxa* ou de *F. verticillioides*. Isolados de *Bacillus* spp. são conhecidos por serem bons produtores das mais diferentes formas de sideróforos (OLAREWAJU et al., 2017; XU e KIM, 2017). Os isolados *B. velezensis* AP-03 e

Bacillus sp. AP-210 apresentam esta característica e foram os que mais produziram estas substâncias (Tabela 3).

Outro importante fator verificado foi a produção de fitohormônios por alguns isolados de *Bacillus* spp. (Figura 1 e Tabela 3). Os isolados AP-12, AP-42 e AP-165 apresentaram alta produção de ácido-indol-acético (Tabela 3). Quando os isolados selecionados foram testados quanto à capacidade de produção de AIA em meio líquido todos produziram este composto (Tabela 3). O isolado *Bacillus* sp. AP-12 foi o maior produtor. Este hormônio, quando sintetizado por microrganismos, pode ser absorvido e utilizado pelos vegetais, promovendo a melhoria do balanço entre o crescimento e o desenvolvimento vegetal (OLAREWAJU et al., 2017).

Também foi constatada a produção de ácido cianídrico (HCN) pelos isolados AP-12, AP-61 e AP-165. O HCN apresenta ação comprovada de promoção de crescimento vegetal, principalmente com o favorecimento da emissão de radículas e controle de fitopatógenos (MISHRA e AHORA, 2012).

5.2 Seleção dos isolados de *Bacillus* spp. com base no biocontrole de *T. paradoxa* e na promoção de crescimento de cana-de-açúcar

Os resultados obtidos neste trabalho são importantes para se discutir as possibilidades da utilização de isolados de *Bacillus* spp. como agentes de biocontrole de *T. paradoxa* e promoção de crescimento para a cultura da cana-de-açúcar. Os resultados podem servir de base para que mais pesquisas com esta sejam desenvolvidas, a fim de melhorar a condução desta cultura com os componentes observados e descritos nos resultados apresentados nas Tabelas 2 a 5.

De modo geral, os isolados de *Bacillus* spp. apresentaram resultados pouco expressivos no controle *in vitro* de *T. paradoxa* (Anexo 2). Entretanto, com os 12 isolados selecionados para os testes *in vitro* (biocontrole, assimilação de nutrientes e produção de substâncias promotoras de crescimento vegetal) foram verificados resultados mais animadores, principalmente no que pode ser referido como características que podem promover ações diretas ou indiretas com a ação do patógeno em questão. Mesmo que sejam resultados que podem não ser tão

evidenciados pelos testes de biocontrole (Figura 1 e Tabelas 1, 3 - 5). Como ação direta, que pode ser observada como positiva contra fitopatógenos habitantes do solo, inclusive o *T. paradoxa*, seria que alguns isolados trabalhados apresentam a característica de produção de HCN e sideróforos.

Os isolados de *Bacillus* spp. apresentaram diferenças quanto a inibição do crescimento micelial des *T. paradoxa* (Anexo 1 e Tabela 1). De acordo com os resultados obtidos, houve a inibição total do crescimento micelial de *T. paradoxa* pelos isolados de *Bacillus* sp. AP-115, AP-159 e AP-512. Alguns isolados foram eficientes na inibição da germinação de conídios, dentre estes os isolados AP-03 e AP-210 inibiram a germinação de conídios de *T. paradoxa* em 82,9 e 85,9%, respectivamente (Tabela 1). A ação destes isolados pode ter sido efetiva pela produção de substâncias antibióticas Venturini et al. (2014), George et al. (2013) e Alvindia et al. (2009) e Alvindia et al. (2012) descrevem o controle de *T. paradoxa* com a ação *in vitro* de isolados de *Bacillus* spp provenientes de mudas de bananeiras e em seus frutos. Nestes trabalhos foi observado que os isolados de *T. paradoxa* apresentaram alto nível de crescimento e desenvolvimento, sendo semelhante ao que pode ser visualizados no Anexo 2 e na Tabela 1. Brandi (2015), semelhantemente ao que foi observado neste estudo, descreve que o isolado *B. subtilis* QST 731 também apresentou um padrão alto de inibição do crescimento de *T. paradoxa*.

O isolado *B. velezensis* AP-03 é relatado como agente de biocontrole de diferentes fitopatógenos além de ser relatado como sendo um promotor de crescimento vegetal (DORIGHELLO et al., 2013; DORIGHELLO, 2017). AP-03 apresentou resultados positivos para a inibição da germinação de conídios e valor positivo para o teste de catalase, fatores importantes para a inibição de um fungo como o *T. paradoxa*, que se reproduz assexuadamente de maneira eficaz (FIRMINO e FURTADO, 2014), e ainda apresentaram resultados positivos nos testes de assimilação de N e solubilização de fosfatos. Já o isolado *Bacillus* sp. AP-210, pode ser escolhido pela sua ação contra a germinação de conídios e crescimento micelial de *T. paradoxa* (Tabela 1 e Anexo 2), além da produção de AIA (característica importante quando se trabalha com plantas C4, caso da cana-de-açúcar), solubilização de fosfatos e produção de sideróforos (ação importante contra fitopatógenos de habitantes do solo).

Estes isolados foram estudados em cana-de-açúcar, na presença ou não de *T. paradoxa*, e comparados com *B. subtilis* QST 731, recomendado pela ação contra diversos fitopatógenos (BRANDI, 2015; DORIGHELLO et al, 2013; DORIGHELLO, 2017) e do produto Azoxistrobina + Ciproconazole - 200 + 80 g/L, recomendado para o tratamento de toletes de cana-de-açúcar contra patógenos diversos. Foi evidenciado que os isolados selecionados nesta pesquisa apresentam características promissoras para a nutrição vegetal e para o controle de *T. paradoxa* (Tabelas 1 a 4). Os resultados da seleção foram confirmados em testes com mudas de cana-de-açúcar. Na última fase foi verificado que os isolados promoveram o crescimento de cana-de-açúcar e controlaram *T. paradoxa* (Tabelas 4 e 5).

Essa característica também pode ter favorecido o crescimento vegetal e a defesa das mudas de cana a *T. paradoxa*, através da ativação e melhoria de rotas bioquímicas de construção de tecidos e ativação de defesas presentes nos vegetais estudados na última fase desta pesquisa (Tabelas 4 e 5).

Semelhantemente aos dados descritos nesse trabalho, Campos (2010) e Souza et al. (2017) observaram aumento de mais de 40% na produção de matéria seca em mudas de cana-de-açúcar pela presença de diferentes isolados de *Bacillus* spp. no sistema e que estes produziam sideróforos. Mudas de cana debilitadas pela ação de *T. paradoxa* podem apodrecer antes de emergirem ou produzirem plantas debilitadas, este fato foi constatado nos resultados descritos na Tabela 5, em que houve uma diminuição do percentual de brotação das mudas. A literatura descreve que, em condição de campo, pode ser observada redução de cerca de 50% de brotação (LODO, 2013; CHAPOLA et al., 2014).

Uma diminuição da brotação em cerca de 85%, quando comparado com o tratamento controle, foi observada na testemunha absoluta e também foi constatada incidência de 83,3% de *T. paradoxa* nos toletes examinados. Nos tratamentos em que foi realizado algum tipo de tratamento sanitário foi observada redução de 50% do fungo nos toletes. *Bacillus* sp. AP-210 proporcionou aumento de cerca de 60% em relação à testemunha sem tratamento e somente 32% dos toletes apresentaram a incidência de *T. paradoxa* (Tabela 5). Provavelmente, a produção de substâncias antibióticas, a competição por nutrientes e a produção de sideróforos realizadas por esses isolados podem estar envolvidos na inibição do patógeno (KULIMUSHI et al.,

2017; OLAREWAJU et al., 2017; XU e KIM, 2017). Isolados de *Bacillus* spp. são conhecidos como produtores de diversas moléculas que inibem outros microrganismos, como por exemplo iturinas e fegicinas (KULIMUSHI et al., 2017; OLAREWAJU et al., 2017; XU e KIM, 2017; CAWOY et al., 2014).

O isolado de *B. velezensis* AP-03 é relatado como eficiente na promoção de crescimento e no controle da ferrugem asiática da soja (DORIGHELLO et al., 2013) e no controle de outros patógenos, como *Pyricularia oryzae* e *Hemileia vastatrix* (BETTIOL et al., 1991; BETTIOL et al., 2004). *B. velezensis* AP-03 e *Bacillus* sp. AP-210 promoveram o controle de *T. paradoxa* em cerca de 25 e 40% em condições de laboratório (Tabelas 4 e 5). Na presença de *T. paradoxa* no solo foi observada a promoção de crescimento das mudas de cana-de-açúcar por *B. velezensis* AP-03 e *Bacillus* sp. AP-210 em tratamento dos toletes (Tabela 5). Estes dois isolados foram superiores ao produto comercial a base do isolado *B. subtilis* QST 731 (Tabelas 4 e 5). O isolado *B. velezensis* AP-03 aumentou a massa seca total das plantas de cana-de-açúcar e promoveu diminuição da efetividade de *T. paradoxa* (Tabelas 4 e 5).

A promoção de crescimento é importante para que as plantas de cana-de-açúcar estejam mais nutridas, assim estas podem crescer mais rapidamente e tornar resistentes contra *T. paradoxa*, pois este fungo tem uma maior facilidade de atacar as plantas de cana-de-açúcar quando ocorre retardo no crescimento e desenvolvimento, causado por problemas nutricionais e temperaturas amenas (CHAPOLA et al., 2014; FIRMINO E FURTADO, 2014). A promoção de crescimento observada nas mudas plantadas em substrato com a presença de *T. paradoxa* pode ter sido um dos fatores que promoveu a diminuição da efetividade do patógeno. As ações de promoção de crescimento e de biocontrole de *T. paradoxa* em mudas de cana-de-açúcar promovidas por *B. velezensis* AP-03 e *Bacillus* sp. AP-210 podem ser ferramentas importantes para o favorecimento da cultura da cana-de-açúcar (Tabelas 2-5).

5.3 Seleção dos isolados de *Bacillus* spp. com base no biocontrole de *F. verticillioides* e na promoção de crescimento de milho

A ocorrência de *F. verticillioides* em sementes e grãos de milho tem sido apontada como um dos mais importantes problemas ocorrentes nesta cultura. Os isolados de *Bacillus* spp. avaliados neste estudo indicam um potencial de melhorar a

sanidade de sementes de milho infectadas com *F. verticillioides* e estimular os processos fisiológicos nas plantas.

O método de inoculação de *F. verticillioides* nas sementes de milho permitiu a transmissão deste fungo das sementes infectadas para as sementes saudáveis e para as plântulas produzidas, fato comprovado pelo alto índice de transmissão visualizado nos testes realizados com sementes e plântulas. No entanto, não foram observados sintomas de damping-off nas plantas. Sendo interessante este fato, pois o patógeno pode sobreviver em plântulas de milho como endofítico, sem provocar sintomas e ainda ser transmitido para as sementes produzidas por estas plantas (MACHADO et al., 2013; NGUYEN et al., 2017). Ainda sobre os sintomas decorrentes da infecção deste fungo em plântulas de milho, o amarelecimento das plantas e a diminuição de produção de biomassa foram observados (Tabelas 2, 6 a 9; Figuras 2 e 3).

Os resultados obtidos podem ser úteis para a melhoria do manejo da cultura para o controle de *F. verticillioides*, enfatizando o uso de *Bacillus* spp. como agentes de biocontrole e promotores de crescimento de plantas.

Os resultados indicam que a utilização dos isolados de *Bacillus* spp. selecionados poderá ser promissora para diferentes culturas agrícolas. Os isolados de *Bacillus* spp. promoveram crescimento e biocontrole de *F. verticillioides* em diferentes níveis de ação. De maneira geral, os isolados de *B. velezensis* AP-03 e *Bacillus* sp. AP-210 apresentaram resultados semelhantes ao produto comercial à base de *Bacillus*.

O antagonismo apresentado pelos isolados *Bacillus* sp. está relacionado à produção de metabólitos que inibem o crescimento micelial e a germinação de conídios do patógeno. Iturina e fengicina estão entre as moléculas produzidas por isolados de *Bacillus* spp. (NGUYEN et al., 2017; KULIMUSHI et al., 2017). Kulimushi et al. (2017) observaram que diferentes isolados de *Bacillus* sp., inclusive o isolado *B. subtilis* QST-713, são descritos como produtores destes lipopeptídeos, possivelmente os isolados AP-3 e AP-210 também produzam esses metabólitos. Ainda estes autores descrevem que o isolado *B. subtilis* QST-713 controlaram *Rhizomucor variabilis*, patógeno de plântulas e sementes de milho.

Os isolados de *Bacillus* sp. melhoraram a qualidade fisiológica das sementes e plântulas (Figura 4). Estes organismos aumentaram a germinação das sementes que sofreram injúria no teste de envelhecimento acelerado, em comparação com a testemunha. Tal ação pontua provavelmente que possíveis compostos produzidos pelos isolados de *Bacillus* spp. melhoraram a fisiologia de sementes de milho, mesmo em condições de estresse (Nguyen et al., 2017).

Associado a isto, a presença dos fungos *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* foi diminuída pela ação dos isolados de *Bacillus* spp. (Figura 3). Pereira et al. (2011) descrevem que o tratamento de sementes de milho, artificialmente inoculadas com *F. verticillioides* F405, com *B. amyloliquefaciens* melhorou a sanidade e a fisiologia destas plântulas. Também foi observado que carboxim (200g/L) + thiram (200 g/L) diminuíram a incidência de *F. verticillioides* e dos demais fungos de armazenamento (Figura 3).

O isolado *Bacillus* sp. AP-210 promoveu o crescimento das plantas (Tabelas 2, 3). Estes resultados, provavelmente, ocorreram pela ação de produção de hormônios e pela absorção de nutrientes (N, P) mediados pelos isolados de *Bacillus* spp. e utilizados pelas plantas de milho (NGUYEN et al., 2017; KULIMUSHI et al., 2017). Este resultado contrapõem os descritos por Wu et al. (2005), os quais verificaram que os isolados *B. megaterium* e *B. mucilaginosus*, em consórcio ou não com fungos arbusculares (*Glomus mosseae* e *Glomus intraradices*), só promoveram uma melhor nutrição das plantas de milho na presença de adubação. No presente trabalho não houve adubação do solo do plantio.

Lizárraga-Sánchez et al. (2015) descreveram que a ação de determinados isolados de *Bacillus* spp. em plantas de milho permite que estas possam estar melhor nutridas e protegidas contra a ação de *F. verticillioides* por meio das ações de controle biológico e promoção de crescimento promovidas por estes isolados bacterianos. A mesma tendência foi observada com os isolados de *Bacillus* utilizadas neste estudo. Houve aumento da produção de pigmentos fotossintetizantes nas plantas tratadas com *Bacillus*, aumentando a produção de clorofila a, b e a+b. Diferentemente da testemunha inoculada, em que as plantas estavam amareladas e produziram mais carotenoides. Fato este, descrito por Szafranska et al. (2017), como sendo um sintoma de desordem fisiológica causada por algum fator de estresse na planta. Este

amarelecimento é um dos principais sintomas do ataque de *F. verticillioides* em plantas de milho (MACHADO et al., 2013; LIZÁRRAGA-SÁNCHEZ et al., 2015; NGUYEN et al., 2017). Desta forma, os tratamentos com *Bacillus* sp. melhoraram a condição de funcionamento das reações de fotossíntese nas plantas de milho, mesmo com a presença de *F. verticillioides* nas sementes (LIZÁRRAGA-SÁNCHEZ et al., 2015; NGUYEN et al., 2017; KULIMUSHI et al., 2017).

Os isolados *B. velezensis* AP-03 e o *Bacillus* sp. AP-210 são promissores agentes de biocontrole de *F. verticillioides* e promotores de crescimento em milho (Tabelas 6 a 9; Figuras 2 e 3), possivelmente pelo fato destes isolados produzirem hormônios e facilitarem o acesso das plantas aos nutrientes e pelos mecanismos de ação. Estas características também foram encontradas em outros isolados de *Bacillus* (XU et al., 2016; OLAREWAJU et al., 2017; XU e KIM, 2017).

Neste sentido pode-se afirmar, conforme Lizárraga-Sánchez et al. (2015), que o biocontrole de *F. verticillioides* em milho por isolados de *Bacillus* pode ser utilizado como uma ferramenta de manejo da cultura.

6 CONCLUSÕES

Isolados de *Bacillus* spp. são conhecidos pela ação como agentes de biocontrole contra diversos patógenos e promotores de crescimento para importantes culturas comerciais. De acordo com os resultados obtidos no presente estudo dos 162 isolados de *Bacillus* spp. testados foram selecionados 12 para os estudos subsequentes (*in vitro*) e somente dois para os estudos com plantas. Os isolados selecionados para o estudo *in vivo*, foram: *B. velezensis* AP-03 e *Bacillus* sp. AP-210.

Por meio dos resultados obtidos nos ensaios *in vivo*, pode-se inferir que os isolados *B. velezensis* AP-03 e o *Bacillus* sp. AP-210 apresentaram o comportamento de agentes de promoção de crescimento vegetal e de biocontrole de *T. paradoxa* e *F. verticillioides*, para as culturas da cana-de-açúcar e do milho, respectivamente. Entretanto, antes de recomendação de uso destes isolados na agricultura, há necessidade de realizar mais estudos em condições de campo.

REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5. ed. Burlington: Elsevier Academic Press, 2005.
- AHMAD, Z. et al. Isolated *Bacillus subtilis* strain 330-2 and its antagonistic genes identified by the removing PCR. **Science Reports**, n. 7, p. 1-14, 2017.
doi:10.1038/s41598-017-01940-9
- ALUJA, M. et al. Pest management through tropical tree conservation. **Biodiversity Conservation**. n. 23, p.831-853. 2014.
- ALVINDIA, D. G. et al. Symptoms and the associated fungi of postharvest diseases on non chemical bananas imported from the Philippines. **Japanese Journal of Tropical Agriculture**, v. 44, p. 87– 93, 2000.
- ALVINDIA, D.G. et al. Improving control of crown rot disease and quality of pesticide free banana fruit by combining *Bacillus amyloliquefaciens* DGA14 and hot water treatment. **European Journal Plant Pathology**, v. 136, p. 183–191, 2013.
Doi:10.1007/s10658 012 0154 7.
- AMORIM, L.; et al. **Manual de Fitopatologia. Volume 1. Princípios e Conceitos**. 4ª Edição. Editora Agronômica Ceres Ltda. São Paulo. 2011. 704p.
- ARAUJO, F.F.; GUERREIRO, R.T. Bioprospecção de isolados de *Bacillus* promotores de crescimento de milho cultivado em solo autoclavado e natural **Ciência e agrotecnologia**, v. 34, n. 4, p. 837 844, jul./ago., 2010.
- BALDINI, I.J. A brief story of nitrogen fixation in sugarcane – reasons for success in Brazil. **Funcional Plant Biology**, v. 29, p. 417-423, 2014.
- BANIK, A., et al. Characterization of N₂ fixing plant growth promoting endophytic and epiphytic bacterial community of Indian cultivated and wild rice (*Oryza* spp.) genotypes. **Planta**. v. 243, p. 799–812, 2012. DOI 10.1007/s00425 015 2444 8
- BARACAT PEREIRA, et al. Biochemical properties of soybean leaf lipoxygenases: presence of soluble and membrane bound forms. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 39, p. 91 98, 2001.
- BARDIN, M. et al. Is the efficacy of biological control against plant diseases likely to be more durable than that of chemical pesticides? **Frontiers in Plant Science**, v. 6, 2015.
- BAYSAL, O.; TOR, M. Smart biologics for crop protection in agricultural systems. **Turkey Journal Agriculture Formation**, v. 38, p. 723- 731, 2014. doi:10.3906/tar 1309 26
- BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Ed.). **Biocontrole de doenças de plantas. Uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. 332. p

BORRÁS HIDALGO, et al. Identification of sugarcane genes induced in disease resistant somaclones upon inoculation with *Ustilago scitaminea* or *Bipolaris sacchari*, **Plant Physiology and Biochemistry**, v.43, n.3, p.1115- 1121, 2005.

BOZZOLA, J.J., RUSSELL, L.D. **Electron Microscopy: Principles and Techniques for Biologists**. 2nd Ed., Boston – Jones and Bartlett Publishers, 1999. 670p.

BRANDI, F. **Formulações comerciais de *Bacillus* spp. no controle de podridão abacaxi da cana de açúcar**. Dissertação (Mestrado), Pós Graduação em Agronomia/ Proteção de Plantas, Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 2015. 53 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: MAPA/ACS, 2009. 395p.

BUKATSCH, F. Bemerkungen zur Doppelfärbung Astrablau Safranin. **Mikrokosmos**, v. 61, p.255, 1972.

CAIRES, E. F.; MILLA, R. Adubação nitrogenada em cobertura para o cultivo de milho com alto potencial produtivo em sistema plantio direto de longa duração. **Bragantia**, v. 75, n. 1, p. 87 95, 2016.

CAKIR, O., SULE, A. Defensive and secondary metabolism in *Astragalus chrysochlorus* cell cultures, in response to yeast extract stressor. **Journal Environmental Biology**, v. 30, págs 51 55, 1986.

CAMPOS, J.T. **Rizobactérias promotoras do crescimento de cana de açúcar**. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós Graduação em Agricultura Tropical e Subtropical, Instituto Agronômico. Campinas, SP. 2010. 71 p.

CAPORAL, F. R.; COSTABEBER, J. A. **Agroecologia e sustentabilidade**. Ematerce. 2002.

CARDOZO, R.B.; ARAUJO, F.F. Multiplicação de *Bacillus subtilis* em vinhaça e viabilidade no controle da meloidoginose, em cana de açúcar. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.15, n.12, p.1283–1288, 2011.

CARVALHO, P. C. F.; et al. Definições e terminologias para Sistema Integrado de Produção Agropecuária. **Revista Ciência Agronômica**, v. 45, p. 1040-1046, 2014. DOI: 10.1590/S1806 66902014000500020.

CAWOY, H. et al. Plant defense stimulation by natural isolates of *Bacillus* depends on efficient surfactin production. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 27, n. 2, pp. 87–100, 2007. <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI.09.13.0262>

CHAPOLA, R.G. et al. Controle da podridão abacaxi da cana de açúcar por meio da pulverização de fungicidas em rebolos no sulco de plantio. **Ciência Rural**. v. 44, n.2, 2014.

CHAUHAN, H.; et al. Plant growth promoting bacterial endophytes from sugarcane and their potential in promoting growth of the host under field conditions.

Esplanation Agricola, v. 49, n 11, p. 43-52 2014.

CHOWDHURY, S.P. et al. Biocontrol mechanism by root associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42: a review. **Frontiers in microbiology**. v. 6, n. 780, 2014. doi: 10.3389/fmicb.2015.00780.

COMPANT, S.; CLEMENT, C.; ESSITCH, A. Plant growth promoting bacteria in the rhizo and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology & Biochemistry**. v. 42, 2010.

doi:10.1016/j.soilbio.2009.11.024

CONAB. **Produção Agrícola – 2017**. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos> Acesso em: 31/08/2018.

COSTA, S. S. et al. Development of a PCR protocol for the identification and detection of *Fusarium solani* f. sp. *piperis* from soil and roots of black pepper (*Piper nigrum*). **Tropical Plant Pathology**, v. 42, p. 1-12, 2017. doi:10.1007/s40858 016 0124 2

DAGUERRE, Y. et al. Fungal proteins and genes associated with biocontrol mechanisms of soil-borne pathogens: a review. **Fungal Biological Reviews**, v. 28, n. 97–125, 2014.

DIAS, C.M.O. **Indicadores fisiológicos, fitotécnicos e agroindustriais de variedades de cana de açúcar cultivadas sob duas condições hídricas**. Dissertação (mestrado). Programa de Pós Graduação em Produção Vegetal no Semiárido. Universidade Estadual de Montes Claros, 2011. 67 p.

DÖBEREINER, J. et al. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas**. Brasília: EMBRAPA SPI / Itagua: Embrapa CNPAB, 1995a. 80p.

DOMINGUES, A.T. As políticas da agroindústria canavieira e o proálcool no Brasil. **Revista Pegada**, v. 15 n.2, p. 15-27, 2014.

DORIGHELLO, D.V. et al. Controlling Asian soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) with *Bacillus* spp. and coffee oil. **Crop Protection**. v.67, p. 59-65, 2015.

DUANGMAL, K.; APENTEN, R.K.O. A comparative study for polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. Romano). **Food Chemistry**, v. 64, p. 351 359, 1999.

EARL, A.M. et al. Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. **Trends in Microbiology** v. 16, n.6, p. 1-11, 2008.

EZIASHI, E.I.; et al, Evaluation of lyophilized and non lyophilized toxins from *Trichoderma* species for the control of *Ceratocystis paradoxa*, **African Journal of Agricultural Research**, v.5, n.13, p.1733-1738, 2010 a.

- EZIASHI, E.I. et al, Evaluation of crude leaf extractions and benlate solution treatments on oil palm sprouted seeds for the control of *Ceratocystis paradoxa* causing black seed rot. **African Journal of Agricultural Research**, v.4, n.13, p.1285-1288, 2010 b.
- FERREIRA, R.J. **Espécies de *Bacillus* no controle de *Meloidogyne incognita* e *Meloidogyne javanica* in vitro e na cana de açúcar**. Dissertação (mestrado), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal, SP, 2015, 60 p.
- FIRMINO, A.C., FURTADO, E.L. Extracellular enzyme production by *Ceratocystis* spp. **Summa Phytopathologica**, v.40, n.4, p.371-374, 2014.
- FISCHER, S., BAYERSDORFER, F., HARANT, E., RENG, R., ARNDT, S., BOSSERHOFF, A.K., SCHNEUWLY, S. et al, A Negative Regulator of BMP Signaling in *Drosophila melanogaster*. **PLoS ONE**, v. 7, n.8, p. 1-12, 2012.
- GAIEIRO, J.R.; et al. Inside the root microbiome: bacterial root endophytes and plant growth promotion. **American Journal of Botany**. v. 100, n.9, p. 1738–1750, 2013. doi:10.3732/ajb.1200572
- GEORGE, P. et al, Antagonistic activity of coconut rhizospheric and endophytic *Bacillus* spp. Against *Ganoderma applanatum* and *Thielaviopsis paradoxa* **Journal of Plantation Crops**, v. 39, n. 2, p. 278-284, 2011.
- GHELLER, A. C. A. **Técnica cultural para o controle da podridão-abacaxi em cana-de-açúcar e modelo para estimativas de perda**. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1995. 115 p
- GHINI, R. et al. Combined effects of soil biotic and abiotic factors, influenced by sewage sludge incorporation, on the incidence of corn stalk rot. **PLoS ONE**. v. 11, n. 5, p. 1-17, 2016. doi:10.1371/ journal.pone.0155536.
- GJHORBANPOUR, M. et al. Mechanisms underlying the protective effects of beneficial fungi against plant diseases. **Biological Control**. v. 117, p. 147–157, 2018. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.11.006>
- GOND, S.K. et al. Endophytic *Bacillus* spp. produce antifungal lipopeptides and induce host defence gene expression in maize. **Microbiological Research**, v. 172, p. 79-87, 2015. Doi:<https://doi.org/10.1016/j.micres.2014.11.004>
- GUPTA, G. et al, Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and Future Prospects for Development of Sustainable Agriculture. **Journal of Microbiol and Biochemical Technology**, v. 7, p. 96-102, 2015. doi:10.4172/1948-5948.1000188.
- HALFELD VIEIRA, B.A., et al. Induction of systemic resistance in tomato by the autochthonous phylloplane resident *Bacillus cereus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 2, p. 1247-1252, 2006.

HASSAN M.N. et al. Suppression of red rot caused by *Colletotrichum falcatum* on sugarcane plants using plant growth promoting rhizobacteria. **BioControl**, n. 55 p. 531–542, 2010.

JOHN, R.P. et al. Bio encapsulation of microbial cells for targeted agricultural delivery. **Critical Reviews in Biotechnology**, n. 31, v. 3, págs: 211–226, 2011.

JULIATTI, F.C. **Avanços no tratamento químico de sementes**. Informativo ABRATES, v. 20, n.3, p. 54- 55, 2010.

KUAN, K.B, et al. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Inoculation to Enhance Vegetative Growth, Nitrogen Fixation and Nitrogen Remobilisation of Maize under Greenhouse Conditions. **PLoS ONE**, v. 11, n. 3, 2011. doi:10.1371/journal.pone.0152478

KULIMUSHI, Z. et al. Stimulation of Fengycin Type Antifungal Lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* in the Presence of the Maize Fungal Pathogen *Rhizomucor variabilis*. **Frontiers in Microbiology**, v. 15, n. 8, 2017. doi: 10.3389/fmicb.2017.00850

KUNDAN, R. et al. Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Mechanism and Current Prospective. **Journal of Fertilizers & Pesticides**, v. 6, n. 2, 2016. Doi: <http://dx.doi.org/10.4172/jbfbp.1000155>

LALIBERTÉ, E. et al. Phosphorus limitation, soil-borne pathogens and the coexistence of plant species in hyperdiverse forests and shrublands. **New Phytologist**, v. 206, p. 507–521, 2018.

LANZA, F.E.; et al. Prevalence of fumonisin producing *Fusarium* species in Brazilian corn grains. **Crop Protection**. v. 65, p. 232 237, 2014.

LIMA, V.L.F. **Análise isotópica (Delta15N) e química do capim marandu adubado com ureia e cama de frango e diferido**. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós Graduação em Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” – Botucatu, 2014. 75p.

LIZÁRRAGA SÁNCHEZ, G.J. et al. *Bacillus cereus* sensu lato strain B25 controls maize stalk and ear rot in Sinaloa, Mexico. **Field Crops Research**, v. 176, p.11–21, 2015. doi:10.1016/j. fcr.2015.02.015

MACHADO, J.C. et al.; Inoculum potential of *Fusarium verticillioides* and performance of maize seeds. **Tropical Plant Pathology**, v. 38, n.3, p. 213 217, 2013. <https://dx.doi.org/10.1590/S1982 56762013000300005>

MARIANO, R.L.R. et al. Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, Recife, v. 1, p.89 111, 2004.

- MARTINS, S.J. et al. Common bean growth and health promoted by rhizobacteria and the contribution of magnesium to the observed responses. **Applied Soil Ecology**, v. 87, p. 49–55, 2015.
- MAUGHAN, H.; VAN der AUWERA, G. *Bacillus* taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 11, p. 789–797, 2011. doi:10.1016/j.meegid.2011.02.001
- MAZZUCHELLI, R. C. L.; ARAÚJO, F. F. Eficácia do controle de nematoides por *Bacillus subtilis* em duas variedades de cana de açúcar. **Colloquium Agrarie**, v. 7, n. esp., p. 51 58, 2011.
- MENDES, M.C. et al. Época de semeadura de híbridos de milho forrageiro colhidos em diferentes estádios de maturação. **Revista Agro@ambiente**, v.9, n.2, p.136 142, 2015.
- MICHEREFF, S.J. et al. **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**. Recife, Brasil. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Imprensa Universitária. p. 1 18. 2009.
- MIRANSI, M.; SMITH, D.L. Plant hormones and seed germination. **Environmental and Experimental Botany**, n. 99, p. 110- 121, 2014.
- NGUYEN, P. A. et al. Crop molds and mycotoxins: Alternative management using biocontrol. **Biological Control**, v. 104, p. 10–27, 2017.
- NODARI, R.O.; GUERRA, M.P. A agroecologia: estratégias de pesquisa e valores. **Estudos Avançados**, v. 83, n. 29, 2015.
- NORONHA, M. A. et al. Efeito do tratamento de sementes de caupi com *Bacillus subtilis* no controle de *Rhizoctonia solani*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 20, n. 2, p. 174 178, 1995.
- PASCHOLATI, S. F. et al. Phenylalanine ammonia 2 lyase activity and anthocyanin accumulation in wounded maize mesocotyls. **Plant Pathology**, v. 115, p. 165 -172, 1986.
- PEREIRA, E.S. et al. Avaliação da qualidade nutricional de silagens de milho (*Zea mays*, L.). **Revista Caatinga**, v.20, n.3, p.8 12, 2016.
- PIROMYOU, P, et al. Effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) inoculation on microbial community structure in rhizosphere of forage corn cultivated in Thailand. **European Journal of Soil and Biology**. v.47, n.44–54, 2011.
- POP, J.; et al. Pesticide productivity and food security. A review. **Agronomic Sustainable Development**, v. 33, p. 243–255, 2013. DOI 10.1007/s13593 012 0105
- RADHAKRISHAN, R. et al. *Bacillus*: a biological tool for crop improvement through bio-molecular changes in adverse environments. **Frontiers in Plant Physiology**, v. 8, n. 667, 2017. doi: 10.3389/fphys.2017.00667

RAIS, M.S. et al. Antagonistic *Bacillus* spp. reduce blast incidence on rice and increase grain yield under field conditions. **Microbiological Research**, v. 208, p. 54-62, 2018. doi.org/10.1016/j.micres.2018.01.009

RAID, R.N. **Pineapple disease of sugarcane**. Flórida: University of Florida, 2012. Acesso em: 07 mar. 2017. Online. Disponível em: <<http://edis.ifas.ufl.edu/pdf/files/SC/SC00500.pdf>>.

REIS, E.M. et al. **Manual de diagnose e controle de doenças do milho**. 2ed. Lages: Graphel, 2004. 144p.

SAKTHI, S. et al. Biocontrol potenciality of plant growth promoting bactéria (PGPR) – *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*: a review. **African Journal of Agricultural Research**, v. 9, n. 16, p. 1265-1277, 2014. DOI: 10.5897/AJAR2013.7914

SILVA, F. F. et al. Emergência e análise ultraestrutural de plântulas de soja inoculadas com *Sclerotinia sclerotiorum* sob efeito da aplicação de *Trichoderma harzianum*. **Summa Phytopathologica**. V.43, N.1, 2017. dx.doi.org/10.1590/0100-5405/2212

SANTOS, I.B. et al. Bactérias diazotróficas associadas a raízes de cana-de-açúcar: solubilização de fosfato inorgânico e tolerância à salinidade. **Bioscience Journal**. V. 28, p. 142-149, 2012.

SANTOS, M.S. et al. Resistance to water deficit during the formation of sugarcane seedlings mediated by interaction with *Bacillus* sp. **Científica**, v. 45, p. 414, 2017.

SHARMA, K.K. et al. Seed treatments for sustainable agriculture A review. **Journal of Applied and Natural Science**, v. 1, n.7, p. 521 – 539, 2015.

SILVA, J.J. et al. Genetic structure of *Fusarium verticillioides* populations and occurrence of fumonisins in maize grown in southern Brazil. **Crop protection**, v. 99: págs, 160- 167, 2017. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2017.05.020>.

SILVA, J.M. et al. Potential of the endophytic bacteria (*Herbaspirillum* spp. and *Bacillus* spp.) to promote sugarcane growth. **Australian Journal of Crop Science**. v. 9, n.8, p. 754-760, 2015.

SOYTONG, K. et al. Biological control of *Thielaviopsis* Bud Rot of *Hyophorbe lagenicaulis* in the field, **Journal of Agricultural Technology**, p.235-245, 2005.

SVOBODOVÁ, K. et al. Mutual interactions of *Pleurotus ostreatus* with bacteria of activated sludge in solidbed bioreactors. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 2, N. 6, 2016. doi: 10.1007/s11274-016-2050-3.

SZAFRANSKA, K. et al. Melatonin Improves the Photosynthetic Apparatus in Pea Leaves Stressed by Paraquat via Chlorophyll Breakdown Regulation and Its Accelerated de novo Synthesis. **Frontiers in Plant Science**, v. 8 n.878, 2017. doi: 10.3389/fpls.2017.00878

SZILAGYI-ZECCHIN, V.J. et al. Identification and characterization of endophytic bacteria from corn (*Zea mays* L.) roots with biotechnological potential in agriculture. **AMB Express**. v.4 n.26, 2014. doi:10.1186/s13568-014-0026-y.

TALUKDER, M.I. et al. Management of Pineapple Disease of Sugarcane through Biological Means. **Journal of Agriculture & Rural Development**, v.5, n.1&2, p.79 - 83, 2007.

TIMMERMANN, C.; FELIX, G.F. Agroecology as a vehicle for contributive justice. **Agricultural Humam Values**, n. 32, p. 523 538, 2015.

TOKESHI, H. **Doenças da cana de açúcar (híbridos de *Saccharum* spp.)** In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. (Eds.). **Manual de Fitopatologia**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 1997. v.2, p.207 225.

USDA. **World Agricultural Production** in: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production.pdf> acesso 11/10/2017.

WANG., H.H.et al. The transition modern agriculture: contract farming in developing economies. **American Journal Agricultural and Economy**. n. 96, v. 5, p. 1257 1271, 2014.

WILSON, C.; TISDELL, C. Why farmers continue to use pesticides despite environmental, health and sustainability. **Ecological Economics**, n. 39, p. 449 462, 2001.

WU, L. et al. Novel Routes for Improving Biocontrol Activity of *Bacillus* Based Bioinoculants. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 1395, p. 2-13, 2015. doi: 10.3389/fmicb.2015.01395

XU, S.J; et al. Biological control of gray mold and growth promotion of tomato using *Bacillus* spp. isolated from soil. **Tropical Plant Pathology**. V. 41, p. 169–176, 2016. Doi: 10.1007/s40858 016 0082 8

YADAV J, VERMA JP. Effect of seed inoculation with indigenous *Rhizobium* and plant growth promoting rhizobacteria on nutrients uptake and yields of chickpea (*Cicer arietinum* L.). **European Journal of Soil Biology**. N. 63: p. 70–77, 2014.

YURELA, I. Plant development regulation: overview and perspectives. **Journal of Plant Physiology**. N. 182, p. 62 78, 2015.

ANEXOS

Anexo 1. Resultados da seleção dos isolados com base nos testes de produção de metabólitos promotores de crescimento, assimilação e solubilização de nutrientes; referentes aos 162 isolados de *Bacillus* spp. testados na primeira fase da pesquisa. Os resultados estão descritos como positivos (+) ou negativos (-) para os testes de assimilação de nitrogênio (AN); solubilização de fosfatos (SP); produção de ácido indol-acético (AIA), de ácido cianídrico (HCN), sideróforos (SID) e catalase .

ISOLADO	HCN	AIA	SP	AN	CATALASE	SID	ISOLADO	HCN	AIA	SP	AN	CATALASE	SID
AP-01	-	-	-	+	+	-	AP-100	-	-	-	+	+	-
AP-02	-	-	+	+	+	-	AP-101	-	-	-	+	+	-
AP-03	-	-	-	+	+	+	AP-104	-	-	+	-	+	-
AP-07	-	-	+	+	+	-	AP-105	-	-	-	+	+	-
AP-08	-	-	-	+	+	-	AP-106	-	-	-	+	+	+
AP-11	-	-	+	+	+	-	AP-108	-	-	-	-	+	-
AP-12	+	-	+	+	-	+	AP-110	-	-	-	+	+	-
AP-14	-	-	-	+	-	-	AP-111	-	-	-	-	+	-
AP-20	-	-	+	-	-	-	AP-113	-	-	-	+	+	-
AP-21	-	-	+	-	-	-	AP-114	-	-	-	+	+	-
AP-22	-	-	+	-	+	-	AP-115	-	-	-	+	+	+
AP-23	-	-	+	+	+	-	AP-117	-	-	-	+	+	+
AP-25	-	-	-	+	+	-	AP-119	-	-	+	+	+	-
AP-26	-	-	-	+	-	-	AP-120	-	-	-	+	+	-
AP-27	-	-	-	+	+	-	AP-121	-	-	-	+	+	-
AP-31	-	-	-	+	-	-	AP-123	-	-	-	-	+	-
AP-38	-	-	+	-	-	-	AP-124	-	-	-	+	+	-
AP-39	-	-	+	-	+	-	AP-130	-	-	-	+	+	-
AP-40	-	-	-	-	+	-	AP-131	-	-	-	+	+	-
AP-41	-	-	-	+	+	-	AP-135	-	-	-	+	+	-
AP-42	+	-	-	-	+	-	AP-136	-	-	-	+	+	-
AP-43	-	-	-	+	+	-	AP-137	-	-	-	+	+	-
AP-44	-	-	-	+	+	-	AP-138	-	-	+	-	+	-
AP-48	-	-	-	+	+	-	AP-140	-	-	+	-	+	-
AP-49	-	-	-	+	+	-	AP-142	-	-	+	-	+	-
AP-51	-	-	-	+	+	-	AP-143	-	-	-	+	+	-
AP-55	-	-	+	+	+	-	AP-144	-	-	-	+	+	-
AP-56	-	-	-	+	+	-	AP-145	-	-	-	+	+	-
AP-59	-	-	-	-	+	-	AP-146	-	-	-	+	+	-
AP-60	-	-	-	+	+	+	AP-147	-	-	-	+	+	-
AP-61	-	+	-	-	+	+	AP-148	-	-	-	+	+	-
AP-63	-	-	-	+	+	-	AP-150	-	-	+	+	+	-
AP-68	-	-	-	+	+	-	AP-151	-	-	-	+	+	-
AP-70	-	-	-	+	+	-	AP-152	-	-	+	-	+	-
AP-73	-	-	-	+	+	-	AP-153	-	-	-	+	+	-
AP-76	-	-	-	+	+	-	AP-155	-	-	-	+	+	-
AP-79	-	-	-	+	+	-	AP-159	-	-	+	+	-	-
AP-80	-	-	-	-	+	-	AP-161	-	-	-	-	-	-
AP-81	-	-	+	-	+	-	AP-164	-	-	-	+	-	-
AP-82	-	-	-	+	+	-	AP-162	-	-	+	-	+	-
AP-84	-	-	-	+	+	-	AP-165	+	-	+	+	+	+
AP-85	-	-	+	+	+	-	AP-173	-	-	-	-	+	+
AP-87	-	-	+	+	+	-	AP-181	-	-	-	+	+	-
AP-88	-	-	+	+	+	+	AP-183	-	-	-	+	+	-
AP-89	-	-	-	-	+	-	AP-186	-	-	-	-	+	-
AP-90	-	-	-	-	+	-	AP-188	-	-	+	+	+	-
AP-91	-	-	-	-	+	-	AP-189	-	-	-	+	+	-
AP-93	-	-	-	+	+	-	AP-193	-	-	-	-	-	-
AP-94	-	-	-	+	+	-	AP-198	-	-	-	+	+	-
AP-97	-	-	+	-	+	-	AP-203	-	-	+	+	+	-

Anexo 1. (Cont.) Resultados da seleção dos isolados com base nos testes de produção de metabólitos promotores de crescimento, assimilação e solubilização de nutrientes; referentes aos 162 isolados de *Bacillus* spp. testados na primeira fase da pesquisa. Os resultados estão descritos como positivos (+) ou negativos (-) para os testes de assimilação de nitrogênio (AN); solubilização de fosfatos (SP); produção de ácido indol-acético (AIA), de ácido cianídrico (HCN), sideróforos (SID) e catalase.

Isolados	HCN	AIA	SP	NA	CATALASE	SID	ISOLADO	HCN	AIA	SP	NA	CATALASE	SID
204	-	-	-	-	+	-	502	-	-	-	+	+	-
209	-	-	-	+	+	-	503	-	-	-	-	+	-
210	-	+	-	+	-	+	504	-	-	-	+	+	-
212	-	-	-	+	+	-	505	-	-	-	-	+	+
213	-	-	-	+	+	-	506	-	-	-	+	+	-
214	-	-	-	+	+	-	507	-	-	-	+	+	-
216	-	-	-	+	+	-	508	-	-	-	+	+	-
219	-	-	-	+	+	-	509	-	-	-	+	+	-
227	-	-	-	+	+	-	510	-	-	-	+	+	-
229	-	-	-	-	-	-	511	-	-	-	-	+	-
238	-	-	-	+	+	-	512	-	-	+	+	+	+
239	-	-	-	+	-	-	517	-	-	-	+	+	-
240	-	+	-	+	+	-	519	-	-	-	+	+	-
251	-	-	-	+	+	-	502	-	-	-	+	+	-
254	-	-	-	+	+	-	503	-	-	-	-	+	-
262	-	-	-	-	-	-	504	-	-	-	+	+	-
268	-	-	-	+	+	-	505	-	-	-	-	+	+
275	-	-	-	+	-	-	506	-	-	-	+	+	-
279	-	-	-	-	-	-	507	-	-	-	+	+	-
276	-	-	-	+	-	-	508	-	-	-	+	+	-
281	-	-	+	+	-	-	509	-	-	-	+	+	-
284	-	-	-	-	+	-	510	-	-	-	+	+	-
287	-	-	-	+	+	-	511	-	-	-	-	+	-
297	-	-	-	-	+	-	512	-	-	+	+	+	+
302	-	-	-	+	+	-	517	-	-	-	+	+	-
312	-	-	-	+	+	-	519	-	-	-	+	+	-
322	-	-	-	+	+	-							
323	-	-	-	+	+	-							
324	-	-	-	+	+	-							
325	-	-	+	+	-	-							
326	-	-	-	+	+	-							
328	-	-	-	+	+	-							
329	-	-	-	+	+	-							
330	-	-	-	+	+	-							
331	-	-	-	+	+	-							
332	-	-	-	+	-	-							
333	-	-	-	+	-	-							
338	-	-	-	+	-	-							
339	-	-	-	+	+	-							
340	-	-	-	+	+	+							
341	-	-	-	+	+	-							
343	-	-	-	+	+	-							
345	-	-	-	+	+	-							
346	-	-	-	+	+	-							
349	-	-	-	+	+	-							
365	-	-	-	+	-	-							
404	-	-	+	+	+	+							
429	-	-	-	+	-	-							
443	-	-	-	+	+	-							

Anexo 2. Inibição de *Thielaviopsis paradoxa* por diferentes isolados de *Bacillus* spp. Legenda: : <25,0% de inibição (+); entre 25,1-75,0% de inibição (++) e mais que 75,1% de inibição (+++).

Isolado	Nível de inibição	Isolado	Nível de inibição	Isolado	Nível de inibição	Isolado	Nível de inibição
AP-01	+	AP-85	++	AP-151	+	AP-297	+
AP-02	+	AP-87	++	AP-152	+	AP-302	+
AP-03	++	AP-88	+++	AP-153	++	AP-312	+
AP-07	+	AP-89	+	AP-155	++	AP-322	++
AP-08	+	AP-90	+	AP-159	+++	AP-323	++
AP-11	++	AP-91	+	AP-161	+	AP-324	++
AP-12	++	AP-93	+	AP-164	+	AP-325	++
AP-14	++	AP-94	+	AP-162	+	AP-326	++
AP-20	+	AP-97	+	AP-165	++	AP-328	++
AP-21	+	AP-100	+	AP-173	++	AP-329	+
AP-22	+	AP-101	++	AP-181	++	AP-330	++
AP-23	+	AP-104	++	AP-183	+	AP-331	++
AP-25	+	AP-105	++	AP-186	+	AP-332	+
AP-26	++	AP-106	++	AP-188	+	AP-333	+
AP-27	+	AP-108	+	AP-189	+	AP-338	++
AP-31	++	AP-110	+	AP-193	++	AP-339	++
AP-38	++	AP-111	+	AP-198	++	AP-340	+
AP-39	+	AP-113	+	AP-203	+	AP-341	+
AP-40	+	AP-114	+	AP-204	+	AP-343	+
AP-41	++	AP-115	+++	AP-209	++	AP-345	+
AP-42	++	AP-117	+	AP-210	++	AP-346	+
AP-43	++	AP-119	+	AP-212	++	AP-349	+
AP-44	+	AP-120	+	AP-213	++	AP-365	++
AP-48	+	AP-121	+	AP-214	++	AP-404	++
AP-49	+	AP-123	+	AP-216	++	AP-429	+
AP-51	+	AP-124	+	AP-219	++	AP-443	++
AP-55	+	AP-130	+	AP-227	+	AP-502	+
AP-56	+	AP-131	+	AP-229	++	AP-503	+
AP-59	+	AP-135	++	AP-238	++	AP-504	+
AP-60	+	AP-136	++	AP-239	+	AP-505	+
AP-61	+	AP-137	++	AP-240	++	AP-506	+
AP-63	+	AP-138	+	AP-251	++	AP-507	+
AP-68	++	AP-140	+	AP-254	++	AP-508	+
AP-70	++	AP-142	+	AP-262	++	AP-509	+
AP-73	+	AP-143	+	AP-268	+	AP-510	++
AP-76	++	AP-144	+	AP-275	++	AP-511	+
AP-79	+	AP-145	+	AP-279	+	AP-512	+++
AP-80	+	AP-146	+	AP-276	+	AP-517	+
AP-81	++	AP-147	+	AP-281	++	AP-519	++
AP-82	++	AP-148	+	AP-284	++		
AP-84	++	AP-150	+	AP-287	++		