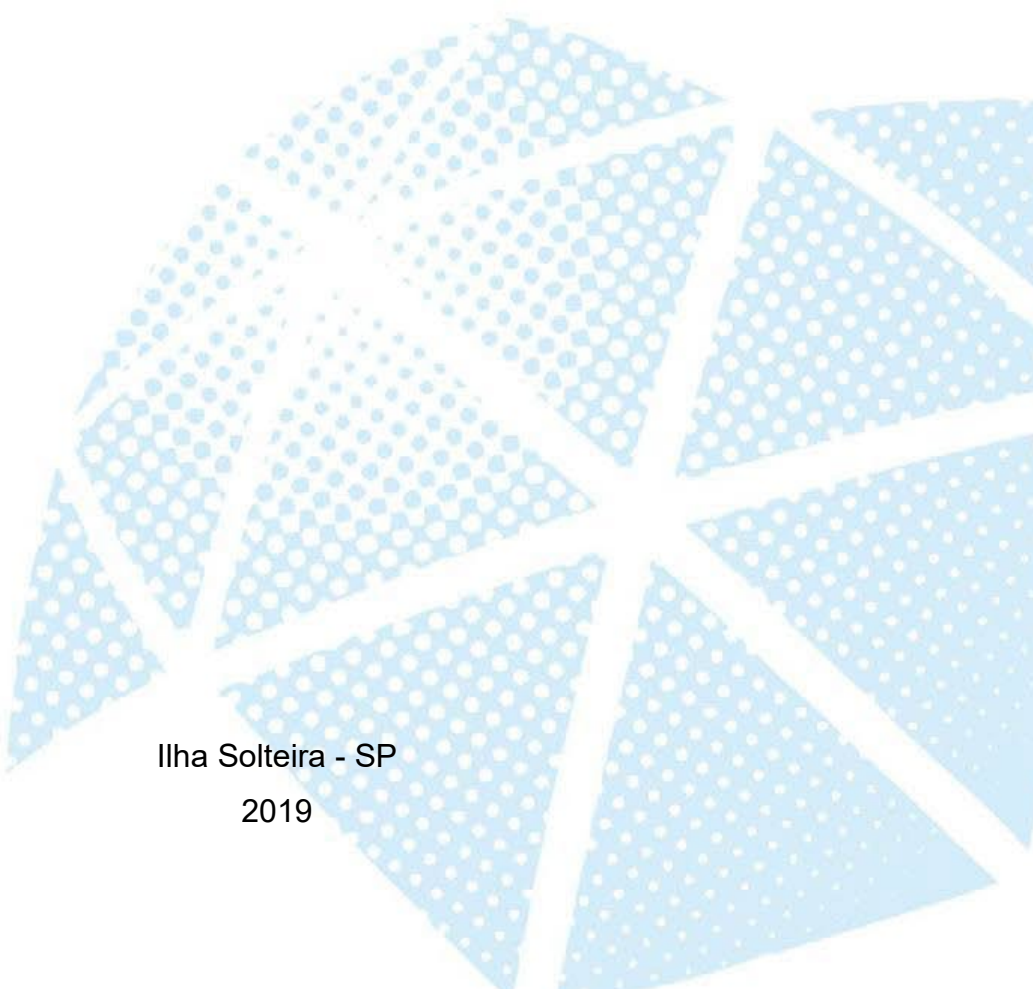


**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA**

TIAGO CALVES NUNES

**CONTROLE BIOLÓGICO DA QUEIMA-DA-FOLHA E MORTE DE PASTAGENS DE
BRAQUIÁRIA (*Urochloa brizantha*) CAUSADAS POR *Rhizoctonia solani* AG-1 IA**

Ilha Solteira - SP
2019



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
(SISTEMAS DE PRODUÇÃO)**

TIAGO CALVES NUNES

**CONTROLE BIOLÓGICO DA QUEIMA-DA-FOLHA E MORTE DE PASTAGENS DE
BRAQUIÁRIA (*Urochloa brizantha*) CAUSADAS POR *Rhizoctonia solani* AG-1 IA**

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Engenharia, Ilha Solteira, para obtenção do título de Doutor em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Cezar Ceresini

Coorientadora: Profa. Dra. Michelina Ruocco

Ilha Solteira - SP

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

Desenvolvido pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

N972c Nunes, Tiago Calves.
Controle biológico da queima-da-folha e morte de pastagens de braquiária (Urochloa brizantha) causadas por Rhizoctonia solani AG-1 IA / Tiago Calves Nunes. -- Ilha Solteira: [s.n.], 2019
87 f. : il.

Tese (Doutorado em Engenharia Agrônômica) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Engenharia, Ilha Solteira. Área de conhecimento: Agronomia (Sistema De Produção), 2019

Orientador: Paulo Cezar Ceresini
Coorientador: Michelina Ruocco
Inclui bibliografia

1. Pastagens tropicais. 2. Antagonismo microbiano. 3. Promoção de crescimento radicular. 4. Bioprospecção microbiana. 5. Manejo integrado de doenças. 6. Sustentabilidade dos agroecossistemas.

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

Esta pesquisa contribui para o desenvolvimento de estratégias sustentáveis para o manejo da queima-da-folha e morte súbita da braquiária (*Urochloa brizantha*) causadas por *Rhizoctonia solani* AG-1 IA, por meio da prospecção, caracterização molecular e avaliação de agentes de controle biológico oriundos dos biomas Amazônia e Cerrado. Os resultados ampliam o conhecimento científico sobre a biodiversidade microbiana brasileira e seu potencial de aplicação na agricultura, fornecendo subsídios para o desenvolvimento de bioinsumos destinados ao manejo integrado de doenças em pastagens tropicais. O trabalho apresenta potencial impacto científico, tecnológico, econômico e ambiental ao contribuir para a redução de perdas na produção pecuária, para a diminuição da dependência de insumos químicos e para a promoção de sistemas produtivos mais sustentáveis. Adicionalmente, fortalece a formação de recursos humanos qualificados, estimula a inovação baseada em recursos biológicos nacionais e contribui para o avanço da pesquisa em fitopatologia, microbiologia agrícola e agricultura sustentável, com relevância local, regional, nacional e internacional.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

This research contributes to the development of sustainable strategies for managing foliar blight and sudden death of signal grass (*Urochloa brizantha*) caused by *Rhizoctonia solani* AG-1 IA through the prospection, molecular characterization, and evaluation of biological control agents originating from the Amazon and Cerrado biomes. The results expand scientific knowledge of Brazilian microbial biodiversity and its potential applications in agriculture, providing a foundation for the development of biological products for integrated disease management in tropical pastures. The study presents scientific, technological, economic, and environmental impacts by contributing to the reduction of livestock production losses, decreasing dependence on chemical inputs, and promoting more sustainable production systems. Furthermore, it strengthens the training of qualified human resources, stimulates innovation based on national biological resources, and advances research in plant pathology, agricultural microbiology, and sustainable agriculture, with local, regional, national, and international relevance.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Controle biológico da queima-da-folha e morte de pastagens de braquiária (*Urochloa brizantha*) causadas por *Rhizoctonia solani* AG-1 IA

AUTOR: TIAGO CALVES NUNES

ORIENTADOR: PAULO CEZAR CERESINI

COORDINADORA: MICHELINA RUOCCO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em AGRONOMIA,
especialidade: SISTEMAS DE PRODUÇÃO pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. PAULO CEZAR CERESINI

Departamento de Fitossanidade, Engenharia Rural e Solos / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira



Prof. Dr. MARCELO CARVALHO MINHOTO TEIXEIRA FILHO

Departamento de Fitossanidade, Engenharia Rural e Solos / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira



Prof.ª Dr.ª ANA CAROLINA FIRMINO

Zootecnia / Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas - Unesp - Dracena



Prof.ª, Dra. GISELLE DE CARVALHO

Departamento Regional do Mato Grosso do Sul / Instituto SENAI de Inovação Biomassa



Dr. MARCO ANTONIO BASSETO

Escritório de Defesa Agropecuária de Araçatuba / Coordenadoria de Defesa Agropecuária do Estado de São Paulo

Ilha Solteira, 15 de abril de 2019

Dedico este trabalho aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, pelo dom da vida, por tudo o que fez, faz e ainda fará em minha caminhada;

À Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Ilha Solteira, pela oportunidade de realização do curso de Pós-Graduação em Agronomia;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) pela concessão de bolsa de estudos para realização do presente trabalho – Código de Financiamento 001.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo Cezar Ceresini, pelos ensinamentos, dedicação, conselhos, oportunidades oferecidas e paciência durante esses anos.

À minha co-orientadora, Dra. Michelina Ruocco, pelos ensinamentos tanto em laboratório como a campo, paciência e carinho durante meses de convívio;

Ao Engenheiro Agrônomo Marcos Cesar Costa, da Geoclean Nutrição e Proteção de Plantas, Araraquara, SP, pelo apoio e viabilização das coletas de amostras de solo no município de Paranaíta, MT, fundamentais para a prospecção dos microrganismos com potencial de biocontrole de doenças obtidos neste estudo;

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Rondônia (IFRO), Campus Colorado do Oeste, pelo apoio durante o Programa de Doutorado Institucional (Dinter/CAPES), viabilizando as coletas de amostras de solo no município de Colorado do Oeste, RO, contribuindo para a ampliação do escopo da prospecção de microrganismos usados neste estudo;

Às minhas amigas-irmãs Loane Krug, Samara Vicentini e Juliana Martins, pelo carinho, amor e companheirismo dentro e fora do laboratório, por compartilharem comigo momentos especiais de alegria, tristeza, preocupações, enfim amo vocês!

Aos colegas do laboratório de Fitopatologia, Giselle de Carvalho, Vanina Castroagudín, Diego Feitosa, Suellen Moreira, Lucas Figueira, Lucas Kawakubo, Aurélio Maeda, Gabriela Leardini, e Vitor Pegolo, por toda ajuda e disposição durante a implementação e condução dos experimentos;

Aos amigos da Unesp: Emanuele Amendola, Regiane Bispo, Aline Suzuki, Murilo Sgobbi, Poliana Rosa, Lucas Pigari e Matheus Fiorentino;

Aos meus amigos e pesquisadores do *Consiglio Nazionale delle Ricerche* (CNR), *Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante* – Portici, Napoli, Itália,

Liberata Gualtieri, Maurilia Monti, Anna Giulia, Francesco Nugnes, Massimo Giorgini, Annalissa Cozzolino, Paolo Afonso, Mauro Senatore;

Aos meus amigos pesquisadores da *Universidad de Salamanca* – Villamayor (Espanha), Prof. Dr. Enrique Monte Vázquez e Profa. Dra. María Rosa Hermosa Prieto, por me apresentar à Salamanca e compartilhar dos conhecimentos sobre controle biológico;

À família Ruotolo, Daniele, Francesca, Ciro, Rita e Roberta, obrigado por serem minha família fora do Brasil!

Aos colegas, amigos, professores, funcionários e todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para esta caminhada;

Aos meus irmãos Marcelo Calves Nunes e Sandra Mendes Nunes por sempre estarem ao meu lado me apoiando e incentivando;

À minha mãe Lenir Calves Nunes e ao meu pai Ademir Nunes (in memoriam) pelas orações, pelo amor e carinho incondicional e incentivo, por sonharem comigo e acreditarem que poderia alcançar meus objetivos.

“Para que todos vejam, e saibam, e considerem, e juntamente entendam que a mão do Senhor fez isso, e o Santo de Israel o criou.”

Isaías 41:20

RESUMO

As pastagens de braquiária (*Urochloa brizantha* cv. Marandu) constituem a principal base da pecuária bovina brasileira e desempenham papel central na sustentabilidade dos sistemas de produção animal nos trópicos. Entretanto, a ocorrência da queima-da-folha e morte súbita, causada por *Rhizoctonia solani* AG-1 IA, tem comprometido a produtividade e a persistência dessas pastagens, especialmente em regiões de clima quente e úmido. A elevada capacidade de sobrevivência do patógeno no solo e a limitada disponibilidade de medidas de controle eficazes reforçam a necessidade de alternativas sustentáveis para o manejo da doença. Nesse contexto, esta tese teve como objetivo prospectar, identificar e avaliar microrganismos com potencial para o controle biológico de *R. solani* AG-1 IA e para a promoção do crescimento de plantas de braquiária. Para alcançar esse objetivo, foram obtidos microrganismos antagonistas em áreas dos biomas Amazônia e Cerrado, os quais foram posteriormente caracterizados e avaliados quanto à sua capacidade de suprimir a doença e promover o crescimento das plantas. Os isolados mais promissores foram caracterizados molecularmente e identificados como pertencentes ao complexo *Bacillus cereus* sensu lato e às espécies *Trichoderma koningiopsis*, *T. lentiforme* e *T. virens*. Em condições de casa de vegetação, esses microrganismos reduziram significativamente a severidade da doença e, quando aplicados via tratamento de sementes, promoveram incremento no desenvolvimento radicular das plantas. Entre os antagonistas avaliados, os isolados de *Trichoderma* destacaram-se pela elevada capacidade de supressão da doença após aplicação foliar. Adicionalmente, avaliou-se a eficácia de *Laetisaria arvalis*, fungo naturalmente associado a pastagens com ocorrência da doença, cuja aplicação proporcionou reduções expressivas na severidade da queima-da-folha, especialmente em plantas inoculadas em estádios mais avançados de desenvolvimento. Diferentes grupos taxonômicos de microrganismos constituem alternativas promissoras para integrar estratégias de manejo biológico da queima-da-folha e morte súbita da braquiária, contribuindo para a redução de perdas em pastagens tropicais e para o desenvolvimento de sistemas pecuários mais sustentáveis e ambientalmente responsáveis.

Palavras-chave: pastagens tropicais; antagonismo microbiano; promoção de crescimento radicular; bioprospecção microbiana; manejo integrado de doenças; sustentabilidade dos agroecossistemas.

ABSTRACT

Signal grass (*Urochloa brizantha* cv. Marandu) pastures constitute the foundation of Brazilian cattle production and play a central role in the sustainability of tropical livestock systems. However, foliar blight and sudden death caused by *Rhizoctonia solani* AG-1 IA have compromised pasture productivity and persistence, particularly in regions characterized by hot and humid climates. The pathogen's ability to survive for extended periods in soil, combined with the limited availability of effective control measures, highlights the need for sustainable disease management alternatives. In this context, the objective of this thesis was to prospect, identify, and evaluate microorganisms with potential for the biological control of *R. solani* AG-1 IA and the promotion of signal grass growth. To achieve this objective, antagonistic microorganisms were obtained from areas within the Amazon and Cerrado biomes and subsequently characterized and evaluated for their ability to suppress disease development and promote plant growth. The most promising isolates were molecularly characterized and identified as belonging to the *Bacillus cereus* sensu lato complex and the species *Trichoderma koningiopsis*, *T. lentiforme*, and *T. virens*. Under greenhouse conditions, these microorganisms significantly reduced disease severity and, when applied as seed treatments, promoted root development. Among the antagonists evaluated, *Trichoderma* isolates exhibited the highest levels of disease suppression following foliar application. Additionally, the efficacy of *Laetisaria arvalis*, a fungus naturally associated with affected pastures, was evaluated. Its application resulted in substantial reductions in foliar blight severity, particularly in plants inoculated at more advanced developmental stages. Distinct taxonomic groups of microorganisms constitute promising alternatives for integration into biological management strategies for foliar blight and sudden death of signal grass, contributing to reduced losses in tropical pastures and supporting the development of more sustainable and environmentally responsible livestock production systems.

Keywords: tropical pastures; microbial antagonism; plant growth promotion; microbial bioprospecting; integrated disease management; agricultural sustainability.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Metodologias de avaliação de antagonismo in vitro contra *Rhizoctonia solani* AG-1 IA. 32
- Figura 2 – Inibição in vitro do crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA por isolados de *Bacillus* spp. 41
- Figura 3 – Árvore filogenética baseada em sequências da região 16S-rDNA demonstrando o posicionamento filogenético dos isolados de *Bacillus*. 43
- Figura 4 – Antagonismo in vitro de isolados de *Trichoderma* spp. contra o fitopatógeno *Rhizoctonia solani* AG-1 IA. 46
- Figura 5 – Árvore filogenética multigênica construída com sequências concatenadas da região ITS-5.8S do rDNA e de fragmentos dos genes α -actina e fator de alongação-1 alfa (*tef-1 α*) demonstrando o posicionamento filogenético dos isolados de *Trichoderma*. 48
- Figura 6 – Aspecto macroscópico das colônias de seis espécies do gênero *Trichoderma* identificadas filogeneticamente no estudo. 51
- Figura 7 – Efeito da aplicação de isolados de *Bacillus* spp. na severidade da queima-da-folha e no comprimento de raiz. 56
- Figura 8 – Aspecto visual de touceiras de *Urochloa brizantha* cv. Marandu evidenciando o efeito protetor dos isolados de *Bacillus cereus*. 57
- Figura 9 – Efeito da aplicação de isolados de *Trichoderma* spp. na severidade da queima-da-folha e no comprimento de raiz. 61
- Figura 10 – Aspecto visual de touceiras de *Urochloa brizantha* cv. Marandu demonstrando a eficácia dos isolados de *Trichoderma* spp. 62
- Figura 11 – Severidade da queima-da-folha em plantas de *Urochloa brizantha* cultivares "Marandu" e "Piatã" tratadas com *Laetisaria arvalis*. 78
- Figura 12 – Aspecto visual de touceiras de *Urochloa brizantha* cv. Marandu demonstrando o efeito do tratamento biológico com *Laetisaria*. 81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Primers utilizados para a identificação filogenética dos isolados de <i>Bacillus</i> e <i>Trichoderma</i> .	35
Tabela 2 – Quadro de análise de variância dos dados de antagonismo de isolados de <i>Bacillus</i> spp. sobre o crescimento micelial de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA.	40
Tabela 3 – Quadros de análise de variância dos dados de antagonismo de <i>Trichoderma</i> spp. sobre o crescimento micelial de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA, utilizando as escalas de Bell et al. (1982) e Rodrigues (2010).	45
Tabela 4 – Resumo consolidado das análises de variância de interação e conjunta para severidade (área foliar total necrosada, AFTN, %) e comprimento de raiz em plantas de <i>Urochloa brizantha</i> cv. Marandu tratadas com isolados pertencentes ao complexo <i>Bacillus cereus</i> sensu lato.	53
Tabela 5 – Resumo consolidado das análises de variância de interação e conjunta para severidade (área foliar total necrosada, AFTN, %) e comprimento de raiz em plantas de <i>Urochloa brizantha</i> cv. Marandu tratadas com isolados de <i>Trichoderma</i> spp.	58
Tabela 6 – Análise de variância para a severidade da queima-da-folha, expressa como porcentagem de área foliar total necrosada (AFTN%), em braquiária (<i>Urochloa brizantha</i>) sob efeito de tratamentos com <i>Laetisaria arvalis</i> , cultivares e épocas de aplicação.	77
Tabela 7 – Desdobramento das interações entre tratamentos, cultivares e épocas de aplicação na severidade da queima-da-folha, expressa como porcentagem de área foliar total necrosada (AFTN%), em plantas de braquiária (<i>Urochloa brizantha</i>) inoculadas com <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA e tratadas com o antagonista <i>Laetisaria arvalis</i> .	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFTN	Área foliar total necrosada
AG	Grupos de anastomose (Anastomosis Groups)
BDA	Batata-Dextrose-Agar
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CIAT	Centro Internacional de Agricultura Tropical
DAS	Dias após a semeadura
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade Óptica
FEIS	Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira
IES	Instituição de Ensino Superior
ITS	Internal Transcribed Spacer
LB	Luria-Bertani
MEC	Ministério da Educação
NPK	Nitrogênio, Fósforo e Potássio
PCR	Reação em cadeia da polimerase
rDNA	DNA ribossômico
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UNESP	Universidade Estadual Paulista

LISTA DE SÍMBOLOS

A	Alfa (designação gênica)
±	Mais ou menos (variação)
%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
F	Estatística F (análise de variância)
p	Valor-p (significância estatística)
×	Multiplicação (esquemas experimentais)
≤	Menor ou igual
≥	Maior ou igual
<	Menor que
=	Igual
μL	Microlitro
rpm	Rotações por minuto

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO GERAL	16
	REFERÊNCIAS	22
1	BIOPROSPECÇÃO, IDENTIFICAÇÃO FILOGENÉTICA E EFICÁCIA DE ISOLADOS DE <i>BACILLUS</i> SPP. E <i>TRICHODERMA</i> SPP. NO CONTROLE BIOLÓGICO DA QUEIMA-DA-FOLHA E MORTE SÚBITA DA BRAQUIÁRIA CAUSADA POR <i>RHIZOCTONIA SOLANI</i> AG-1 IA	26
1.1	INTRODUÇÃO	28
1.2	MATERIAL E MÉTODOS	30
1.2.1	Obtenção dos isolados antagonistas	30
1.2.2	Isolado do patógeno	31
1.2.3	Avaliação do antagonismo de isolados de <i>Bacillus</i> spp.	32
1.2.4	Avaliação do antagonismo de isolados de <i>Trichoderma</i> spp.	33
1.2.4.1	Escala de Bell et al. (1982)	33
1.2.4.2	Escala de Rodrigues (2010)	33
1.2.5	Extração de DNA genômico	34
1.2.6	Amplificação por PCR e sequenciamento	34
1.2.7	Caracterização molecular e identificação filogenética dos isolados de <i>Bacillus</i>	35
1.2.8	Caracterização molecular e identificação filogenética dos isolados de <i>Trichoderma</i>	35
1.2.9	Análises filogenéticas	36
1.2.10	Seleção dos isolados elite para ensaios em casa de vegetação	36
1.2.11	Ensaio em casa de vegetação	37
1.2.12	Ensaio com <i>Bacillus</i> spp.	37
1.2.13	Ensaio com <i>Trichoderma</i> spp.	38
1.2.14	Avaliação da severidade da doença e do crescimento radicular	38
1.2.15	Análise estatística	39
1.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
1.3.1	Seleção de isolados de <i>Bacillus</i> spp. com potencial antagonista a <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA	39
1.3.2	Identificação filogenética dos isolados de <i>Bacillus</i> spp.	42
1.3.3	Seleção de isolados de <i>Trichoderma</i> spp. com potencial antagonista a <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA	44
1.3.4	Identificação filogenética dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp.	47
1.3.5	Eficácia de <i>Bacillus</i> spp. no controle da queima-da-folha	52
1.3.5.1	Promoção do crescimento radicular por <i>Bacillus</i> .	55
1.3.6	Eficácia de <i>Trichoderma</i> spp. no controle da queima-da-folha	55
1.3.6.1	Promoção do crescimento radicular por <i>Trichoderma</i> .	57
1.3.7	Integração entre os resultados in vitro e in vivo	60
1.4	CONCLUSÃO	64

	REFERÊNCIAS	65
2	CONTROLE BIOLÓGICO DA QUEIMA-DA-FOLHA DA BRAQUIÁRIA (<i>UROCHLOA BRIZANTHA</i>) CAUSADA POR <i>RHIZOCTONIA SOLANI</i> AG-1 IA UTILIZANDO <i>LAETISARIA ARVALIS</i>	69
2.1	INTRODUÇÃO	71
2.2	MATERIAL E MÉTODOS	73
2.2.1	Condições experimentais	73
2.2.2	Isolados fúngicos	73
2.2.3	Preparo do inóculo	74
2.2.3.1	<i>Laetisaria arvalis</i>	74
2.2.3.2	<i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA	74
2.2.3.3	Tratamentos-controle	75
2.2.4	Condução das plantas	75
2.2.5	Delineamento experimental e análise estatística	75
2.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	76
2.4	CONCLUSÃO	82
	REFERÊNCIAS	83
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS	87

INTRODUÇÃO GERAL

As pastagens cultivadas constituem a principal base de sustentação da pecuária bovina brasileira, atividade de elevada importância econômica e social para o país. Entre as espécies forrageiras utilizadas, destaca-se *Urochloa brizantha* (syn. *Brachiaria brizantha*), especialmente a cultivar Marandu, amplamente adotada em razão de sua elevada produtividade de biomassa, adaptação às condições edafoclimáticas tropicais e boa aceitabilidade pelos animais. Estima-se que aproximadamente 60 milhões de hectares de pastagens brasileiras sejam ocupados por essa cultivar, responsável por parcela significativa da alimentação do rebanho nacional (EMBRAPA, 2018; Teixeira Neto et al., 2000).

Entretanto, a sustentabilidade desses sistemas produtivos vem sendo ameaçada pelo surgimento e expansão de doenças capazes de comprometer a produtividade e a longevidade das pastagens. Dentre essas enfermidades, destaca-se a queima-da-folha e morte súbita da braquiária, doença associada à degradação acelerada das áreas cultivadas, redução da produção de forragem e diminuição da capacidade de suporte animal.

Atualmente, o principal agente etiológico associado à doença é o fungo basidiomiceto *Rhizoctonia solani* Kühn, grupo de anastomose AG-1 IA (Ramos-Molina et al., 2016; Chavarro Mesa et al., 2014). Inicialmente reconhecido como importante patógeno do arroz, esse fungo expandiu seu espectro de hospedeiros e passou a infectar espécies forrageiras do gênero *Urochloa*. Relatos da doença em pastagens foram registrados na Colômbia durante a década de 1990 (CIAT, 1993) e posteriormente em áreas da Amazônia brasileira, onde condições elevadas de temperatura e umidade favorecem o desenvolvimento do patógeno (Kelemu et al., 1995). A ausência de produtos registrados para o controle da doença e o padrão agregado de ocorrência nas pastagens tornam seu manejo particularmente desafiador (AGROFIT, 2019).

A ampla adoção da cultivar Marandu dificulta a substituição imediata por outras espécies forrageiras como estratégia de manejo, tornando necessária a busca por alternativas sustentáveis para o controle da doença. Nesse contexto, estratégias integradas de manejo assumem papel fundamental na redução dos impactos econômicos e ambientais associados à queima-da-folha e morte súbita da braquiária.

Entre as estratégias de manejo integrado de doenças, o controle biológico

destaca-se por utilizar microrganismos antagonistas capazes de reduzir a população ou a atividade dos patógenos por diferentes mecanismos de ação. Tais mecanismos incluem competição por nutrientes e espaço, antibiose, micoparasitismo, modificação da rizosfera (como acidificação do solo) e indução de resistência nas plantas hospedeiras (Cook; Baker, 1983; Bettioli, 1991; Mello et al., 2007; Ruocco et al., 2009). Além de reduzir a dependência de fungicidas químicos, o controle biológico apresenta menor impacto ambiental e contribui para a sustentabilidade dos agroecossistemas (Benítez et al., 2004; Schuster; Schmoll, 2010). Adicionalmente, os agentes de biocontrole devem ser passíveis de propagação e formulação em escala comercial (Weeden; Shelton; Hoffman, 2008).

Diversas espécies de fungos e bactérias associadas ao solo têm sido investigadas como potenciais agentes de controle biológico de fitopatógenos. Dentre elas, destacam-se bactérias do gênero *Bacillus*, fungos do gênero *Trichoderma* e o basidiomiceto *Laetisaria arvalis*, organismos que apresentam diferentes mecanismos de antagonismo e potencial de utilização no manejo de doenças causadas por *Rhizoctonia solani*.

Bacillus

As bactérias do gênero *Bacillus* constituem um dos grupos de microrganismos mais estudados para aplicação em programas de controle biológico e promoção de crescimento de plantas. A ampla distribuição desses organismos em diferentes ambientes, associada à sua elevada plasticidade metabólica, permite a colonização eficiente de diversos nichos ecológicos.

A versatilidade metabólica das espécies de *Bacillus* está relacionada à capacidade de utilizar diferentes fontes de carbono e produzir uma ampla gama de enzimas extracelulares envolvidas na degradação de compostos orgânicos complexos, incluindo ácidos nucleicos, polissacarídeos e lipídios (Madigan et al., 2016). Além disso, diversas espécies produzem metabólitos antimicrobianos, como bacitracina, polimixina, tirocidina, gramicidina e circulina, que contribuem para sua capacidade antagonista contra diferentes microrganismos (Mello, 1998; Bettioli et al., 2012; Madigan et al., 2016). A formação de esporos resistentes e a possibilidade de microencapsulação ampliam seu potencial de aplicação em formulações comerciais

(Tamez-Guerra et al., 2000).

Microrganismos desse gênero também têm sido associados ao aumento da tolerância das plantas a estresses bióticos e abióticos, incluindo déficit hídrico, deficiência nutricional e presença de metais pesados, além de atuarem como agentes de controle biológico de doenças e pragas agrícolas (Clemente et al., 2016).

A utilização de espécies de *Bacillus* como promotoras de crescimento e agentes de controle biológico representa uma alternativa eficiente e ambientalmente segura em comparação ao uso intensivo de defensivos químicos, contribuindo para sistemas agrícolas mais sustentáveis (Shafi et al., 2017). Espécies desse gênero figuram atualmente entre os agentes de controle biológico mais utilizados na agricultura devido à sua capacidade de formar esporos resistentes, colonizar diferentes nichos ecológicos e produzir ampla diversidade de metabólitos antimicrobianos.

Trichoderma

Fungos do gênero *Trichoderma* encontram-se amplamente distribuídos em ecossistemas naturais e agrícolas, desempenhando importante papel na decomposição da matéria orgânica e na dinâmica microbiana dos solos. Esses organismos apresentam crescimento rápido, elevada capacidade de esporulação e adaptação a diferentes substratos, características que favorecem sua utilização como agentes de controle biológico (Harman et al., 2004). Estudos demonstram que *Trichoderma* também é capaz de interagir diretamente com as plantas, promovendo crescimento e estimulando respostas de defesa (Vinale et al., 2008).

O controle biológico promovido por espécies de *Trichoderma* resulta da interação de múltiplos mecanismos que atuam de forma complementar ou sinérgica (Chet et al., 1997). Diversos mecanismos de ação têm sido associados ao antagonismo exercido por esses fungos, incluindo competição por nutrientes e espaço, produção de metabólitos antimicrobianos, micoparasitismo e indução de respostas de defesa nas plantas hospedeiras. A importância relativa de cada mecanismo varia de acordo com o isolado, o patógeno alvo e as condições ambientais.

O micoparasitismo é considerado um dos principais mecanismos envolvidos na

interação entre *Trichoderma* e fungos fitopatogênicos, envolvendo reconhecimento, enrolamento e degradação das hifas do hospedeiro. Paralelamente, a produção de compostos voláteis e não voláteis com atividade antifúngica contribui para a supressão do crescimento de diversos patógenos (Weindling; Emerson, 1936; Dennis; Webster, 1971; Howell, 2003; Reino et al., 2008). A produção de metabólitos como o 6-pentil- α -pirona tem sido associada à supressão de toxinas fúngicas produzidas por patógenos (El-Hasan; Walker; Buchenauer, 2008).

A ampla ocorrência de *Trichoderma* em solos agrícolas demonstra sua elevada capacidade competitiva por espaço e nutrientes (Hermosa et al., 2004). Adicionalmente, sua aptidão para colonizar a rizosfera das plantas constitui característica essencial para o sucesso do controle biológico (Howell, 2003). A capacidade de mobilização de ferro por algumas espécies de *Trichoderma* também tem sido associada ao aumento da eficiência de controle de doenças causadas por *Fusarium* em tomateiro (Segarra et al., 2009).

Estudos recentes demonstraram que a colonização radicular por espécies de *Trichoderma* pode estimular mecanismos de defesa vegetal, resultando em resistência sistêmica contra diferentes patógenos e até mesmo nematoides (Monte, 2001; Harman et al., 2004). Além disso, algumas linhagens apresentam capacidade de promover crescimento vegetal e aumentar a tolerância das plantas a estresses bióticos e abióticos, características que ampliam seu potencial de aplicação como biofertilizantes (Altomare et al., 1999; Harman, 2006; Lorito et al., 2010; Hermosa et al., 2012; Hermosa et al., 2013).

Diversos estudos relatam a eficiência de espécies de *Trichoderma* no controle de importantes patógenos habitantes do solo, incluindo *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Pythium aphanidermatum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Cylindrocladium scoparium* e *Colletotrichum truncatum* (Cúndom; Mazza; Gutiérrez, 2003; Ethur et al., 2001; Ethur, 2006; Louzada et al., 2009; Reis Almeida et al., 2007). A eficácia desses fungos tem sido demonstrada tanto em condições controladas quanto em estudos de campo, incluindo a supressão de *Pythium ultimum* e o impacto positivo sobre comunidades microbianas do solo (Naseby; Pascual; Lynch, 2000).

Laetisaria arvalis

Laetisaria arvalis Burdsall foi originalmente descrita como *Corticium* sp. e proposta como agente de controle biológico de doenças de plantas em estudos conduzidos nas Universidades Cornell e Nebraska, nos Estados Unidos, durante as décadas de 1970 e 1980 (Hoch; Abawi, 1979; Burdsall et al., 1980).

Os primeiros trabalhos demonstraram sua capacidade de atuar como hiperparasita de *Rhizoctonia solani*, estabelecendo interações diretas entre as hifas do antagonista e do patógeno (Odvody et al., 1980). Posteriormente, verificou-se também a produção de compostos com atividade antibiótica, incluindo o ácido laetisárico, capaz de inibir o desenvolvimento de outros fitopatógenos, como *Pythium ultimum* (Bowers et al., 1986).

Diversas formulações e métodos de aplicação foram avaliados visando sua utilização em campo, incluindo biomassa fúngica, substratos sólidos à base de cereais e materiais orgânicos, grãos colonizados e formulações em gel para tratamento de sementes e mudas (Odvody et al., 1980; Martin et al., 1984; Herr, 1988; Conway, 1986).

Estudos realizados em diferentes sistemas patológicos demonstraram a eficiência de *Laetisaria arvalis* no controle biológico de doenças causadas por fungos habitantes do solo (Lewis; Papavizas, 1992; Odvody et al., 1980; Conway, 1986; Martin et al., 1983; Martin et al., 1986; Allen et al., 1985). Apesar dos resultados promissores obtidos nas décadas de 1980 e 1990, poucos estudos posteriores exploraram o potencial desse microrganismo em programas de controle biológico. Dessa forma, sua avaliação contra *Rhizoctonia solani* AG-1 IA associado à queima-da-folha e morte súbita da braquiária representa uma oportunidade de validar um antagonista ainda pouco explorado para condições tropicais.

Diante da importância da queima-da-folha e morte súbita da braquiária e da necessidade de alternativas sustentáveis para o manejo da doença, esta tese teve como objetivo geral prospectar, selecionar, identificar e avaliar microrganismos antagonistas com potencial para o controle biológico de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA associado a essas enfermidades. Especificamente, buscou-se selecionar isolados de *Bacillus* spp. e *Trichoderma* spp. com atividade antagonista contra o patógeno, caracterizar taxonomicamente os isolados selecionados por meio de reconstruções

filogenéticas, avaliar seu potencial de controle biológico em condições controladas e quantificar seus efeitos sobre a severidade da doença e o desenvolvimento das plantas. Adicionalmente, foi avaliado o potencial de *Laetisaria arvalis* como agente de controle biológico da queima-da-folha da braquiária. Por fim, buscou-se identificar os antagonistas mais promissores para subsidiar futuros estudos de validação em condições de campo e sua eventual incorporação em programas de manejo integrado de doenças em pastagens tropicais.

REFERÊNCIAS

- AGROFIT. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 8 abr. 2019.
- ALLEN, M. F. et al. Population dynamics of sugar beets, *Rhizoctonia solani*, and *Laetisaria arvalis*: responses of a host, plant pathogen, and hyperparasite to perturbation in the field. **Applied and Environmental Microbiology**, Lincoln, v. 50, n. 5, p. 1123-1127, 1985.
- ALTOMARE, C. et al. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, p. 2926-2933, 1999.
- BENÍTEZ, T. et al. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, Barcelona, v. 7, p. 249-260, 2004.
- BETTIOL, W. Componentes do controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W. (Org.). **Controle Biológico de Doenças de Plantas**. Jaguariúna: Embrapa - CNPMA, 1991.
- BETTIOL, W. et al. **Produtos comerciais à base de agentes de biocontrole de doenças de plantas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2012. 155 p.
- BOWERS, W. S. Thallophytic allelopathy: isolation and identification of laetisarinic acid. **Science**, New York, v. 232, n. 4746, p. 105-107, 1986.
- BURDSALL, J. R. et al. *Laetisaria arvalis* (Aphylllophorales, Corticiaceae); a possible biological control agent for *Rhizoctonia solani* and *Pythium* species. **Mycologia**, Madison, v. 72, n. 4, p. 728-736, 1980.
- CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL (CIAT). **Annual Report, Tropical Forages Program**. Cali, 1993. (Document 166).
- CHAVARRO-MESA, E. et al. A etiologia complexa de doenças causadas por fungos do gênero *Rhizoctonia* em *Brachiaria* e em culturas simpátricas de arroz, feijão-caupi ou soja na Amazônia, nos Cerrados Brasileiros e no Vale do Paraíba. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 47., 2014, Londrina. **Anais...** Londrina: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2014.
- CHET, I.; INBAR, J.; HADAR, I. Fungal antagonists and mycoparasites. In: WICKLOW, D. T.; SÖDERSTRÖM, B. (Ed.). **The Mycota IV**. Berlin: Springer-Verlag, 1997. p. 165-184.
- CLEMENTE, J. M. et al. Use of *Bacillus* spp. as growth promoter in carrot crop. **African Journal of Agricultural Research**, Nairobi, v. 11, n. 35, p. 3355-3359, set. 2016.
- CONWAY, K. E. Use of fluid-drilling gels to deliver biological control agents to soil. **Plant Disease**, St. Paul, v. 70, n. 9, p. 835-839, 1986.

COOK, R. J.; BAKER, K. F. **The nature and practice of biological control of plant pathogens**. Minnesota: The American Phytopathological Society, 1983.

CÚNDOM, M. A.; MAZZA, S. M.; GUTIÉRREZ, S. A. Short communication - selection of *Trichoderma* spp. isolates against *Rhizoctonia solani*. **Spanish Journal of Agricultural Research**, Madrid, v. 1, p. 79-81, 2003.

DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*: III. Hyphal interactions. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 57, p. 363-369, 1971.

EL-HASAN, A.; WALKER, F.; BUCHENAUER, H. *Trichoderma harzianum* and its metabolite 6-pentyl-alpha-pyrone suppress fusaric acid produced by *Fusarium moniliforme*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, n. 156, p. 79-87, 2008.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). *Brachiaria brizantha* cv. Marandu. Brasília, DF. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-solucoes-tecnologicas/-/produto-servico/863/brachiaria-brizantha-cv-marandu>. Acesso em: 8 abr. 2019.

ETHUR, L. Z. **Dinâmica populacional e ação de *Trichoderma* no controle de fusariose em mudas de tomate e pepineiro**. 2006. 135 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

ETHUR, L. Z.; CEMBRANEL, C. Z.; SILVA, A. C. F. da. Seleção de *Trichoderma* spp. visando ao controle de *Sclerotinia sclerotiorum*, in vitro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 5, p. 885-887, 2001.

HARMAN, G. E. Overview of mechanism and uses of *Trichoderma* spp. **Phytopathology**, St. Paul, v. 96, p. 190-194, 2006.

HARMAN, G. E. et al. *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 2, p. 43-56, 2004.

HERMOSA, M. R. et al. Genetic diversity shown in *Trichoderma* biocontrol isolates. **Mycological Research**, Cambridge, v. 108, p. 897-906, 2004.

HERMOSA, R. et al. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. **Microbiology**, London, v. 158, p. 17-25, 2012.

HERMOSA, R. et al. The contribution of *Trichoderma* to balancing the costs of plant growth and defense. **International Microbiology**, Barcelona, v. 16, p. 69-80, 2013.

HERR, L. J. Biocontrol of *Rhizoctonia* crown and root rot of sugar beet by binucleate *Rhizoctonia* spp. and *Laetisaria arvalis*. **Annals of Applied Biology**, Cambridge, v. 113, n. 1, p. 107-118, 1988.

HOCH, H. C.; ABAWI, G. S. Biological control of *Pythium* root rot of table beet with *Corticium* sp. **Phytopathology**, St. Paul, v. 69, n. 2, p. 417-419, 1979.

HOWELL, C. R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. **Plant Disease**, St. Paul, v. 87, n. 1, p. 3-10, 2003.

KELEMU, S. et al. Sources of resistance in species of *Brachiaria* to foliar blight disease caused by *Rhizoctonia solani*. **Tropical Grasslands**, St. Lucia, v. 29, p. 257-262, 1995.

LEWIS, J. A.; PAPAIVIZAS, G. C. Potential of *Laetisaria arvalis* for the biocontrol of *Rhizoctonia solani*. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 24, n. 11, p. 1075-1079, 1992.

LORITO, M. et al. Translational research on *Trichoderma*: from 'Omics to the field. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 48, p. 395-417, 2010.

LOUZADA, G. A. S. et al. Antagonist potential of *Trichoderma* spp. from distinct agricultural ecosystems against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Fusarium solani*. **Biota Neotropica**, Campinas, v. 9, n. 3, p. 145-149, 2009.

MADIGAN, M. et al. **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016. 960 p.

MARTIN, S. B.; HOCH, H. C.; ABAWI, G. S. Population dynamics of *Laetisaria arvalis* and low temperature *Pythium* spp. in untreated and pasteurized beet field soils. **Phytopathology**, St. Paul, v. 73, n. 10, p. 1445-1449, 1983.

MARTIN, S. B.; ABAWI, G. S.; HOCH, H. C. Influence of the antagonist *Laetisaria arvalis* on infection of table beets by *Phoma betae*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 14, p. 1092-1096, 1984.

MARTIN, S. B.; ABAWI, G. S.; HOCH, H. C. The relation of population densities of the antagonist *Laetisaria arvalis* to seedling diseases of table beet incited by *Pythium ultimum*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 32, p. 156-159, 1986.

MELO, I. S. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: MELLO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa, 1998. v. 1, 264 p.

MELLO, S. C. M. et al. Cepas de *Trichoderma* spp. para el control biológico de *Sclerotium rolfsii* SACC. **Fitosanidade**, La Habana, v. 11, p. 3-9, 2007.

MONTE, E. Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. **International Microbiology**, Barcelona, v. 4, p. 1-4, 2001.

NASEBY, D. C.; PASCUAL, J. A.; LYNCH, J. M. Effect of biocontrol strains of *Trichoderma* on plant growth, *Pythium ultimum* populations, soil microbial communities and soil enzyme activities. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 88, p. 161-189, 2000.

ODVODY, G. N.; BOOSALIS, M. G.; KERR, E. D. Biological control of *Rhizoctonia solani* with a soil-inhabiting basidiomycete. **Phytopathology**, St. Paul, v. 70, p. 655-658, 1980.

RAMOS-MOLINA, L. M. et al. *Rhizoctonia solani* AG-1 IA infects both rice and signalgrass in the Colombian Llanos. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 46, p. 65-71, 2016.

REINO, J. L. et al. Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. **Phytochemistry Reviews**, Dordrecht, v. 7, p. 89-123, 2008.

REIS ALMEIDA, F. B. et al. Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* strains against *Rhizoctonia solani*: evaluation of coiling and hydrolytic enzyme production. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 29, p. 1189-1193, 2007.

RUOCCO, M. et al. Identification of a new biocontrol gene in *Trichoderma atroviride*: the role of an ABC transporter membrane pump in the interaction with different plant-pathogenic fungi. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 22, p. 291-301, 2009.

SCHUSTER, A.; SCHMOLL, M. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 87, n. 3, p. 787-799, jul. 2010.

SEGARRA, G. et al. MYB72, a node of convergence in induced systemic resistance triggered by a fungal and a bacterial beneficial microbe. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 11, p. 90-96, 2009.

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

TAMEZ-GUERRA, P. et al. Assessment of microencapsulated formulations for improved residual activity of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 93, n. 2, p. 219-225, 2000.

TEIXEIRA NETO, J. F. et al. **Prováveis causas da morte do capim braquiário (*Brachiaria brizantha* cv. Marandu) na Amazônia Oriental**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2000. (Documentos, 36).

VINALE, F. et al. *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 40, n. 1, p. 1-10, jan. 2008.

WEEDEN, C. R.; SHELTON, A. M.; HOFFMAN, M. P. **Biological Control: a guide to natural enemies in North America**. Geneva: Cornell University, 2008.

WEINDLING, R.; EMERSON, O. H. The isolation of a toxic substance from the culture filtrate of *Trichoderma*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 26, p. 1068-1070, 1936.

1 BIOPROSPECÇÃO, IDENTIFICAÇÃO FILOGENÉTICA E EFICÁCIA DE ISOLADOS DE *BACILLUS* SPP. E *TRICHODERMA* SPP. NO CONTROLE BIOLÓGICO DA QUEIMA-DA-FOLHA E MORTE SÚBITA DA BRAQUIÁRIA CAUSADA POR *RHIZOCTONIA SOLANI* AG-1 IA

RESUMO

A queima-da-folha e morte súbita da braquiária, causada por *Rhizoctonia solani* AG-1 IA, constitui uma das principais doenças associadas à degradação de pastagens de *Urochloa brizantha* cv. Marandu na Amazônia brasileira. O controle da doença é dificultado pela ampla adaptação ecológica do patógeno, sua elevada capacidade de sobrevivência no solo e pela ausência de medidas de manejo suficientemente eficazes. Nesse contexto, o controle biológico representa uma alternativa promissora para o manejo sustentável da doença. O objetivo deste estudo foi prospectar, selecionar e identificar filogeneticamente isolados de *Bacillus* spp. e *Trichoderma* spp. provenientes dos biomas Amazônia e Cerrado com potencial para o biocontrole de *R. solani* AG-1 IA. Um total de 49 isolados de *Bacillus* spp. e 23 isolados de *Trichoderma* spp. foram recuperados e avaliados *in vitro*. O antagonismo dos isolados bacterianos foi quantificado por meio da porcentagem de inibição do crescimento micelial do patógeno, enquanto os isolados de *Trichoderma* foram avaliados utilizando as escalas de Bell et al. (1982) e Rodrigues (2010). Os isolados Curimatá, Piauí e Pacu apresentaram os maiores níveis de inibição do crescimento micelial de *R. solani* AG-1 IA, enquanto os isolados Cachara, Jurupoca e Jaú apresentaram os maiores níveis de antagonismo entre os isolados de *Trichoderma*. A identificação filogenética baseada na região 16S-rDNA posicionou os isolados bacterianos selecionados no complexo *Bacillus cereus* sensu lato. A análise filogenética multilocus baseada nas regiões ITS-5.8S do rDNA, α -actina (*act*) e fator de elongação da tradução 1-alfa (*tef-1 α*) identificou os isolados Cachara, Jurupoca e Jaú como *Trichoderma koningiopsis*, *T. lentiforme* e *T. virens*, respectivamente. Os isolados de elite foram submetidos a ensaios em casa de vegetação para validar sua eficácia via tratamento de sementes e aplicação foliar. Todos os isolados reduziram significativamente a severidade da doença com destaque para a aplicação foliar de *Trichoderma* spp. Adicionalmente, o tratamento de sementes com *Bacillus* spp. ou *Trichoderma* spp. promoveu incremento significativo no comprimento radicular das plantas. A elevada concordância entre os resultados *in vitro* e *in vivo* demonstra que os critérios de seleção adotados foram eficientes para identificar agentes com potencial agrônomo real.

Palavras-chave: *Urochloa brizantha*; controle biológico; antagonismo; *Bacillus cereus* sensu lato; *Trichoderma virens*; *Trichoderma lentiforme*; *Trichoderma koningiopsis*.

BIOPROSPECTION, PHYLOGENETIC IDENTIFICATION, AND EFFICACY OF *BACILLUS* SPP. AND *TRICHODERMA* SPP. ISOLATES FOR THE BIOLOGICAL CONTROL OF FOLIAR BLIGHT AND SUDDEN DEATH OF SIGNAL GRASS CAUSED BY *RHIZOCTONIA SOLANI* AG-1 IA

ABSTRACT

Signal grass foliar blight and collar rot, caused by *Rhizoctonia solani* AG-1 IA, is one of the most important diseases associated with the degradation of *Urochloa brizantha* cv. Marandu pastures in the Brazilian Amazon. Disease management is challenging due to the pathogen's ecological adaptability, long-term survival in soil, and the lack of highly effective control measures. In this context, biological control represents a promising alternative for sustainable disease management. The objective of this study was to prospect, select, and phylogenetically identify *Bacillus* spp. and *Trichoderma* spp. isolates from the Amazon and Cerrado biomes with potential for the biological control of *R. solani* AG-1 IA. A total of 49 *Bacillus* isolates and 23 *Trichoderma* isolates were recovered and evaluated *in vitro*. Bacterial antagonism was quantified through inhibition of mycelial growth, whereas *Trichoderma* isolates were assessed using the scales proposed by Bell et al. (1982) and Rodrigues (2010). The isolates Curimatá, Piau, and Pacu showed the highest levels of inhibition of *R. solani* AG-1 IA mycelial growth, while Cachara, Jurupoca, and Jaú exhibited the highest antagonistic activity among the *Trichoderma* isolates. Phylogenetic identification based on the 16S-rDNA region placed the selected bacterial isolates within the *Bacillus cereus* sensu lato complex. Multilocus phylogenetic analysis based on ITS-5.8S rDNA, α -actin (*act*), and translation elongation factor 1- α (*tef-1 α*) identified isolates Cachara, Jurupoca, and Jaú as *Trichoderma koningiopsis*, *T. lentiforme*, and *T. virens*, respectively. Elite isolates were evaluated in greenhouse assays to validate their efficacy via seed treatment and foliar application. All isolates significantly reduced disease severity, with emphasis on the foliar application of *Trichoderma* spp. Additionally, seed treatment with *Bacillus* spp. or *Trichoderma* spp. promoted a significant increase in root length. The high agreement between *in vitro* and *in vivo* results demonstrates that the selection criteria were efficient in identifying agents with real agronomic potential.

Keywords: *Urochloa brizantha*; biological control; antagonism; *Bacillus cereus* sensu lato; *Trichoderma virens*; *Trichoderma lentiforme*; *Trichoderma koningiopsis*.

1.1 INTRODUÇÃO

Rhizoctonia solani Kühn é um dos fungos fitopatogênicos habitantes do solo mais importantes, responsável por doenças em diversas culturas de relevância agrícola mundial. Esse complexo de espécies apresenta ampla variabilidade genética, fisiológica e patogênica, sendo subdividido em grupos de anastomose (AGs) geneticamente distintos, os quais diferem quanto à gama de hospedeiros, agressividade e distribuição geográfica (Ogoshi, 1987; Sneh et al., 1996).

Entre esses grupos, *R. solani* AG-1 IA destaca-se pela capacidade de causar doenças severas em culturas pertencentes tanto às Poaceae quanto às Fabaceae. Na América do Sul, esse patógeno é responsável pela queima da bainha do arroz, pela mela da soja, pela queima foliar do feijoeiro-caupi e por diversas outras doenças associadas a gramíneas e leguminosas cultivadas (David et al., 2008; Chavarro-Mesa et al., 2015). Populações desse patógeno apresentam elevada diversidade genética e significativo potencial evolutivo, características que favorecem sua adaptação a novos hospedeiros e ambientes agrícolas.

A partir da década de 1990, *R. solani* AG-1 IA emergiu como importante patógeno de pastagens tropicais do gênero *Urochloa* (sin. *Brachiaria*) na América do Sul. No Brasil, os primeiros relatos da síndrome da morte do capim-marandu foram registrados em extensas áreas de pastagens da Amazônia Oriental, onde a mortalidade de plantas passou a comprometer significativamente a produtividade pecuária regional. Inicialmente, fatores edáficos e ambientais foram considerados como possíveis causas do problema; entretanto, estudos posteriores demonstraram a estreita associação da doença com *Rhizoctonia solani* AG-1 IA (Teixeira Neto et al., 2000; Verzignassil e Fernandes, 2001).

Estudos conduzidos na Colômbia e, posteriormente, no Brasil demonstraram que essa emergência esteve associada à expansão de áreas de pastagens sobre regiões anteriormente ocupadas por culturas suscetíveis, especialmente arroz irrigado (Chavarro-Mesa et al., 2015). Evidências filogeográficas indicam que as populações atualmente adaptadas a *Urochloa* provavelmente se originaram de populações ancestrais associadas ao arroz, caracterizando um processo de mudança de hospedeiro (*host shift*) relativamente recente. Evidências adicionais provenientes dos Llanos colombianos demonstraram que populações de *R. solani* AG-1 IA são capazes de infectar simultaneamente arroz (*Oryza sativa*) e braquiária (*Urochloa* spp.), reforçando a hipótese de que a emergência da doença em pastagens ocorreu a partir

de populações originalmente associadas ao arroz e, posteriormente, adaptadas ao novo hospedeiro (Ramos-Molina et al., 2016).

No Brasil, a doença tornou-se particularmente importante em áreas da Amazônia Legal, onde extensas monoculturas de *Urochloa brizantha* cv. Marandu favorecem o desenvolvimento de epidemias severas. Levantamentos realizados em diferentes estados amazônicos demonstraram que *R. solani* AG-1 IA constitui o principal agente etiológico da queima foliar e da podridão do colo em pastagens de *Urochloa*, apresentando ampla distribuição geográfica e elevada frequência de ocorrência (Chavarro-Mesa et al., 2020).

O manejo de doenças causadas por *R. solani* apresenta elevada complexidade. O patógeno possui ampla capacidade saprofítica, produz estruturas de sobrevivência persistentes no solo e apresenta grande variabilidade genética intraespecífica. Além disso, cultivares comerciais com elevados níveis de resistência são escassas e, frequentemente, insuficientes para proporcionar controle satisfatório em condições favoráveis ao desenvolvimento da doença. A importância econômica da doença motivou diversos esforços para identificação de fontes de resistência em espécies de *Brachiaria*. Entretanto, avaliações conduzidas em diferentes genótipos demonstraram que níveis elevados e duráveis de resistência são raros, o que limita a utilização exclusiva do melhoramento genético como estratégia de manejo (Kelemu et al., 1995). Nesse contexto, estratégias sustentáveis de manejo, incluindo o uso de agentes de controle biológico, têm recebido crescente atenção.

Entre os microrganismos mais promissores para o controle biológico de fitopatógenos destacam-se bactérias do gênero *Bacillus* e fungos do gênero *Trichoderma*. Espécies de *Bacillus* apresentam elevada capacidade de colonização da rizosfera e são reconhecidas pela produção de metabólitos antimicrobianos, lipopeptídeos, sideróforos e enzimas hidrolíticas capazes de inibir diversos fungos fitopatogênicos. Da mesma forma, espécies de *Trichoderma* apresentam elevada capacidade de colonização da rizosfera e de interação com fitopatógenos por meio de competição, antibiose e micoparasitismo. Estudos utilizando sistemas repórteres fluorescentes demonstraram a capacidade desses fungos de colonizar tecidos vegetais e interagir diretamente com patógenos em condições naturais (Lu et al., 2004). Além disso, diversas espécies são capazes de induzir resistência sistêmica nas plantas hospedeiras e produzir metabólitos secundários com atividade antifúngica (Harman et al., 2004; Brunner et al., 2005; Vinale et al., 2008; Stoppacher et al., 2010).

Os biomas Amazônia e Cerrado constituem importantes reservatórios de biodiversidade microbiana ainda pouco explorada. A prospecção de microrganismos nesses ambientes representa uma estratégia promissora para a identificação de novos agentes de biocontrole adaptados às condições edafoclimáticas tropicais. Trabalhos desenvolvidos pelo Laboratório de Genética de Populações e Evolução de Fitopatógenos da UNESP têm demonstrado o potencial desses ambientes como fontes de bactérias e fungos antagonistas com atividade contra importantes fitopatógenos associados a sistemas agrícolas tropicais (Vicentini et al., 2022; Pereira et al., 2022).

Além da seleção de isolados biologicamente eficientes, a correta identificação taxonômica dos agentes de biocontrole constitui etapa fundamental para sua futura utilização. Técnicas de caracterização molecular associadas à identificação filogenética baseada em múltiplos marcadores permitem determinar com maior precisão a identidade das espécies selecionadas, contribuindo para estudos posteriores envolvendo mecanismos de antagonismo, registro de produtos biológicos e aplicações comerciais (Chaverri et al., 2015; Samuels, 2006).

Diante desse contexto, o presente estudo teve como objetivo prospectar, identificar filogeneticamente e avaliar a eficácia de isolados de *Bacillus* spp. e *Trichoderma* spp. provenientes dos biomas Amazônia e Cerrado para o controle biológico de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA em braquiária. Especificamente objetivou-se selecionar isolados com alta atividade antagônica *in vitro*; identificar os isolados de elite por meio de análises filogenéticas multilocus; avaliar a redução da severidade da queima-da-folha sob condições de casa de vegetação; e mensurar o potencial de promoção de crescimento radicular via diferentes modalidades de aplicação.

1.2 MATERIAL E MÉTODOS

1.2.1 Obtenção dos isolados antagonistas

Foram utilizados isolados bacterianos e fúngicos pertencentes à coleção de microrganismos do Laboratório de Fitopatologia da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira (FEIS/UNESP). Os isolados foram obtidos de amostras de solo coletadas em áreas dos biomas Amazônia e Cerrado, especificamente nos municípios de Paranaíta (MT), Dourados (MS) e Colorado do Oeste (RO), durante o ano de 2016. Recuperaram-se 49 isolados bacterianos com características morfológicas

compatíveis com o gênero *Bacillus*. A preservação a longo prazo dos isolados de *Bacillus* spp. foi realizada em tubos criogênicos de 2 mL onde culturas das bactérias foram liofilizadas por 24 horas e mantidos a -20°C , além da manutenção em solução salina (NaCl 0,85%) a 4°C (Vicentini et al., 2022).

Para os ensaios envolvendo fungos antagonistas, foram utilizados 23 isolados de *Trichoderma* spp. obtidos das mesmas regiões de coleta e mantidos na coleção de culturas do laboratório. A preservação a longo prazo dos isolados de *Trichoderma* foi realizada em tubos criogênicos de 2 mL contendo sílica gel, para onde discos de papel de filtro esterilizados colonizados pelo fungo foram transferidos. Esses discos de papel haviam sido previamente depositados sobre culturas fúngicas em crescimento (25°C) em meio de Batata-Dextrose-Agar (BDA, Kasvi, São José dos Pinhais), acrescido de cloranfenicol e estreptomicina, por 5 dias. Em seguida os discos foram transferidos para os criotubos e armazenado a -20°C (Pereira et al., 2022).

1.2.2 Isolado do patógeno

Foi utilizado o isolado MTUB04E de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA, proveniente de plantas de braquiária (*Urochloa brizantha* cv. Marandu) que apresentavam sintomas típicos de queima-da-folha e morte súbita, coletadas no município de Paranaíta/Alta Floresta, MT. Este isolado foi selecionado para o estudo por ter apresentado, em ensaios prévios, os maiores níveis de agressividade entre diversas populações de *R. solani* associadas à cultura (Vicentini et al., 2022). A identidade do isolado e sua associação ao grupo de anastomose AG-1 IA haviam sido previamente confirmadas por análises moleculares baseadas na região ITS-rDNA e comparação com sequências de referência descritas para populações do patógeno associadas à braquiária (Chavarro-Mesa et al., 2020).

Para a preservação a longo prazo, utilizou-se o armazenamento a -20°C em criotubos contendo sílica gel e grãos de arroz parboilizado esterilizados e colonizados. O inóculo para preservação foi produzido em grãos de arroz previamente autoclavados e distribuídos sobre colônias do patógeno com sete dias de crescimento em BDA acrescido de cloranfenicol e estreptomicina. Os grãos foram incubados a 28°C por cinco dias, até a completa colonização pelo micélio fúngico e produção de escleródios, e então transferidos para os criotubos e armazenados (Chavarro-Mesa et al., 2015, 2020). A partir deste estoque, o patógeno era periodicamente repicado para

meio BDA para utilização nos experimentos, preservando assim sua viabilidade e vigor.

1.2.3 Avaliação do antagonismo de isolados de *Bacillus* spp.

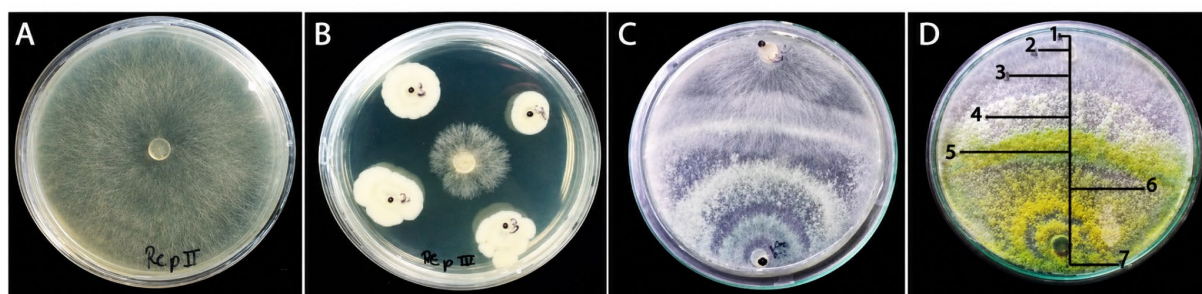
O potencial antagonista dos 49 isolados bacterianos foi avaliado por meio da técnica de confrontação direta em placas de Petri contendo meio BDA, adaptada da metodologia empregada em estudos anteriores de bioprospecção de agentes de biocontrole conduzidos pelo grupo de pesquisa (Vicentini et al., 2022).

Um disco de micélio de *R. solani* AG-1 IA, com aproximadamente 5 mm de diâmetro, foi transferido para o centro de cada placa. Em seguida, os isolados bacterianos foram inoculados em quatro pontos equidistantes ao redor do disco fúngico. As placas foram incubadas em câmara de crescimento a 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas.

Foram conduzidos dois experimentos independentes em delineamento de blocos casualizados, com cinco repetições por tratamento em cada experimento, totalizando dez observações por isolado.

A avaliação foi realizada quando a testemunha atingiu crescimento próximo à borda da placa. A porcentagem de inibição do crescimento micelial foi calculada comparando-se o crescimento radial do patógeno na presença dos antagonistas com o crescimento observado na testemunha sem antagonista (Figura 1A e B).

Figura 1 – Metodologias de avaliação de antagonismo in vitro contra *Rhizoctonia solani* AG-1 IA.



Fonte: elaborado pelo próprio autor

Nota: (A) Colônia testemunha (controle) de *R. solani* AG-1 IA, apresentando crescimento micelial pleno após 72 horas de incubação; (B) Teste de pareamento (método do halo) evidenciando a inibição do crescimento micelial do patógeno por isolados de *Bacillus* spp.; (C) Teste de confronto direto entre isolados de *Trichoderma* spp. e o fitopatógeno; (D) Escala de Rodrigues (2010), demonstrando a aplicação prática do gabarito padrão (notas de 1 a 7) sob a placa de confronto para quantificação da dominância de nicho.

1.2.4 Avaliação do antagonismo de isolados de *Trichoderma* spp.

O antagonismo dos 23 isolados de *Trichoderma* spp. foi avaliado por meio da técnica de confronto direto em placas de Petri contendo meio BDA, utilizando metodologia semelhante à empregada por Pereira et al. (2022).

Discos de micélio do patógeno e dos antagonistas, com aproximadamente 5 mm de diâmetro, foram transferidos para extremidades opostas da placa. As placas foram incubadas em câmara incubadora a 28 °C, sob fotoperíodo de 12 horas. Foram realizados dois experimentos independentes em delineamento de blocos casualizados com cinco repetições por tratamento.

A avaliação do antagonismo foi realizada utilizando duas metodologias independentes (Figura 1C e B).

1.2.4.1 Escala de Bell et al. (1982)

O antagonismo foi classificado segundo Bell et al. (1982), utilizando escala de notas variando de 1 a 5, em que:

- Nota 1: o antagonista ocupa totalmente a placa e recobre o patógeno;
- Nota 2: o antagonista ocupa aproximadamente 75% da superfície da placa;
- Nota 3: antagonista e patógeno ocupam aproximadamente 50% da placa;
- Nota 4: o patógeno ocupa aproximadamente 75% da placa;
- Nota 5: o patógeno ocupa totalmente a placa.

1.2.4.2 Escala de Rodrigues (2010)

Também foi utilizada a escala proposta por Rodrigues (2010), baseada em gabarito padrão posicionado sob a placa de Petri, permitindo maior precisão na estimativa da área ocupada pelas colônias. Nessa escala, as notas variam de 1 a 7, sendo:

- Nota 1: antagonista ocupa totalmente a placa;
- Nota 7: patógeno ocupa totalmente a placa.

Em ambas as metodologias, menores notas indicam maior potencial antagonista. Os resultados dos ensaios *in vitro* foram utilizados para selecionar os isolados mais promissores para estudos posteriores de biocontrole em casa de vegetação.

1.2.5 Extração de DNA genômico

O DNA genômico dos isolados de *Trichoderma* foi extraído a partir de micélio previamente liofilizado utilizando o kit comercial GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. Para os isolados bacterianos, a extração de DNA foi realizada a partir de colônias previamente liofilizadas utilizando o kit GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), conforme instruções do fabricante e metodologia semelhante à empregada por Vicentini et al. (2022). A concentração e a qualidade do DNA extraído foram avaliadas por espectrofotometria e eletroforese em gel de agarose.

1.2.6 Amplificação por PCR e sequenciamento

A identificação molecular dos isolados foi realizada por meio da amplificação das regiões gênicas descritas na Tabela 1.

As reações de PCR foram conduzidas em volume final de 30 µL contendo aproximadamente 25 ng de DNA genômico, 0,1 µM de cada iniciador, 0,2 mM de cada dNTP, 2,0 mM de MgCl₂, tampão de reação 1× e 1 U de *Taq* DNA polimerase (Sigma-Aldrich, EUA), conforme protocolo previamente empregado pelo grupo de pesquisa (Vicentini et al., 2022).

As amplificações foram realizadas em termociclador ProFlex (Applied Biosystems, EUA), utilizando desnaturação inicial a 95 °C por 5 min, seguida por 35 ciclos de 95 °C por 30 s, temperatura de anelamento específica para cada par de iniciadores (Tabela 1) durante 1 min e extensão a 72 °C por 1 min, finalizando com extensão final a 72 °C por 5 min.

Os produtos amplificados foram purificados e submetidos ao sequenciamento Sanger no Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO), UNESP, Campus de Jaboticabal, SP, Brasil.

As sequências obtidas foram editadas utilizando o software Geneious R 9.0.5 (Biomatters Ltd., Auckland, Nova Zelândia). Posteriormente, as sequências consenso foram comparadas com sequências depositadas no banco GenBank utilizando o algoritmo BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

Tabela 1 – Primers utilizados para a identificação filogenética dos isolados de *Bacillus* e *Trichoderma*.

Gênero / Região gênica	Tamanho (pb)	Primers	Sequência (5' – 3')	Temp. (°C)	Referências
<i>Bacillus</i>	1000	16s-F	CCG AAT TCG TCG ACA ACA GAG TTT GAT CCT GGC TCA G	61	WEISBURG et al. (1991)
		D1-R	AAG GAG GTG ATC CAG CC		
	1000	B27-F	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	64	WEISBURG et al. (1991)
		U1492 R	GGT TAC CTT GTTACG ACT T		
<i>Trichoderma</i> (ITS-rDNA)	600	ITS5	GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G	60	WHITE et al. (1990)
		ITS4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC		
<i>Trichoderma</i> (α -actina)	700	TRI-ACT1	TGG CAC CAC ACC TTC TAC AAT GA	64	SAMUELS & ISMAIEL (2009)
		TRI-ACT2	TCT CCT TCT GCA TAC GGT CGG A		
<i>Trichoderma</i> (tef-1 α)	545	Ef1-728	CAT CGA GAA GTT CGA GAA GG	64	CARBONE & KOHN (1999)
		TEF1R	CCAGTTTCCAATGACCCTCCCC		
					SAMUELS et al. (2002)

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

1.2.7 Caracterização molecular e identificação filogenética dos isolados de *Bacillus*

A identificação dos isolados bacterianos foi realizada por meio da amplificação da região 16S-rDNA utilizando os iniciadores 16s-F/D1-R e B27-F/U1492R (WEISBURG et al., 1991), conforme descrito na Tabela 1. A região 16S-rDNA foi escolhida por constituir um dos marcadores mais amplamente utilizados para estudos filogenéticos bacterianos, permitindo comparações robustas com sequências depositadas em bancos de dados públicos (WEISBURG et al., 1991; CASE et al., 2007).

1.2.8 Caracterização molecular e identificação filogenética dos isolados de *Trichoderma*

A identificação dos isolados de *Trichoderma* foi realizada por meio da amplificação das regiões ITS-5.8S do rDNA utilizando os iniciadores ITS5 e ITS4 (WHITE et al., 1990), do gene α -actina utilizando os iniciadores TRI-ACT1 e TRI-ACT2

(Samuels & Ismaiel, 2009) e do gene fator de alongação da tradução 1-alfa (*tef-1 α*) utilizando os iniciadores Ef1-728 (CARBONE & KOHN, 1999) e TEF1R (Samuels et al., 2002).

A escolha dos marcadores ITS, α -actina e *tef-1 α* baseou-se em estudos prévios que demonstraram a resolução limitada da região ITS para discriminar espécies do complexo *Trichoderma harzianum*, sendo o gene *tef-1 α* recomendado como código de barras secundário para identificação em nível específico (CHAVERRI et al., 2015).

1.2.9 Análises filogenéticas

As sequências obtidas da região 16S-rDNA para os isolados bacterianos (totalizando 1359 pares de bases) foram alinhadas juntamente com sequências de referência disponíveis no GenBank. Foram incluídas sequências representativas de espécies dos grupos *Bacillus cereus*, *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens*. Como grupo externo (*outgroup*) foi utilizada uma sequência de *Escherichia coli*.

Para os isolados de *Trichoderma* foi construída uma matriz concatenada composta pelas regiões ITS-5.8S do rDNA, α -actina (*act*) e fator de alongação da tradução 1-alfa (*tef-1 α*), totalizando 1845 pares de bases. As sequências foram comparadas com espécies de referência de *T. lentiforme*, *T. asperellum*, *T. koningiopsis*, *T. atroviride*, *T. inhamatum* e *T. virens*. Como grupo externo foram utilizadas sequências de *Fusarium oxysporum*.

As análises filogenéticas foram conduzidas no programa Geneious® v. 9.0.5 utilizando o método UPGMA e modelo de distância genética HKY. O suporte dos agrupamentos foi estimado por meio de 1000 reamostragens *bootstrap*.

1.2.10 Seleção dos isolados elite para ensaios em casa de vegetação

Com base nos resultados dos ensaios de antagonismo *in vitro* e na representatividade filogenética dos isolados, foram selecionados três isolados de *Bacillus* spp. e três isolados de *Trichoderma* spp. para avaliação em condições de casa de vegetação. Para *Bacillus*, foram selecionados os isolados Pacu, Piau e Curimatá, filogeneticamente posicionados no complexo *Bacillus cereus* sensu lato. Para *Trichoderma*, foram selecionados os isolados Jaú (*T. virens*), Jurupoca (*T. lentiforme*) e Cachara (*T. koningiopsis*).

1.2.11 Ensaios em casa de vegetação

Os ensaios de validação dos isolados selecionados foram conduzidos em casa de vegetação utilizando plantas de *Urochloa brizantha* cv. Marandu. Como patógeno, foi utilizado o isolado MTUB04E de *R. solani* AG-1 IA, previamente descrito (Vicentini et al. 2022).

O inóculo de *R. solani* AG-1 IA foi produzido em grãos de arroz parboilizado previamente autoclavados a 120 °C por 30 minutos. Após a autoclavagem, os grãos foram distribuídos sobre colônias do patógeno cultivadas em meio batata-dextrose-ágar (BDA), com sete dias de crescimento. Os grãos foram mantidos a 28 °C por cinco dias, até completa colonização por micélio fúngico e produção de escleródios (CHAVARRO-MESA et al., 2015, 2020).

1.2.12 Ensaios com *Bacillus* spp.

Foram conduzidos dois ensaios para avaliar a eficácia dos isolados de *Bacillus* spp. como agentes de controle biológico da queima-da-folha da braquiária: aplicação por tratamento de sementes e aplicação foliar.

Para o preparo do inóculo bacteriano, os isolados Pacu, Piau e Curimbatá foram cultivados em Erlenmeyers contendo 20 mL de meio Luria-Bertani (LB, Kasvi, São José dos Pinhais) líquido e incubados a 28 °C sob agitação de 190 rpm por 14 horas. As suspensões bacterianas foram centrifugadas a 5.000 rpm por 10 minutos, ressuspensas em meio LB e submetidas a três ciclos de lavagem. Ao final, as células foram ressuspensas em água esterilizada, ajustando-se a concentração para $8,1 \times 10^8$ UFC mL⁻¹, correspondente a DO₆₂₀ = 0,8.

No ensaio de tratamento de sementes, sementes de *U. brizantha* cv. Marandu foram imersas por 15 minutos nas suspensões bacterianas, uma hora antes da semeadura. No ensaio de aplicação foliar, plantas de *U. brizantha* cv. Marandu foram pulverizadas com 10 mL da suspensão bacteriana por parcela, na concentração de $8,1 \times 10^8$ UFC mL⁻¹. Setenta e duas horas após a aplicação dos antagonistas, procedeu-se à inoculação de *R. solani* AG-1 IA utilizando grãos de arroz colonizados pelo patógeno. Como controle, foram utilizados grãos de arroz autoclavados não colonizados. Após a inoculação do patógeno, as plantas foram mantidas em casa de vegetação nas mesmas condições citadas acima.

1.2.13 Ensaio com *Trichoderma* spp.

Foram conduzidos dois ensaios para avaliar a eficácia dos isolados de *Trichoderma* spp. como agentes de controle biológico da queima-da-folha da braquiária: aplicação por tratamento de sementes e aplicação foliar.

Cada isolado de *Trichoderma* foi cultivado em placas de Petri contendo meio BDA por sete dias. Em seguida, adicionou-se água destilada esterilizada às placas, realizando-se a raspagem da superfície das colônias com lâmina estéril. A suspensão obtida foi filtrada em dupla camada de gaze, e a concentração de inóculo foi ajustada para 10^8 conídios mL^{-1} com auxílio de câmara de Neubauer.

No ensaio de tratamento de sementes, sementes de *U. brizantha* cv. Marandu foram imersas por 15 minutos nas suspensões dos isolados de *Trichoderma*, uma hora antes da semeadura. Em seguida, as sementes foram semeadas em vasos com capacidade para 0,8 kg, preenchidos com mistura de substrato comercial e vermiculita na proporção 3:1 (v:v), e mantidas em casa de vegetação.

No ensaio de aplicação foliar, sementes não tratadas de *U. brizantha* cv. Marandu foram semeadas em vasos contendo a mesma mistura de substrato e vermiculita. Trinta dias após a germinação, as plantas foram pulverizadas com suspensão dos isolados de *Trichoderma* na concentração de 10^8 conídios mL^{-1} . Setenta e duas horas após a aplicação dos antagonistas, procedeu-se à inoculação de *R. solani* AG-1 IA na região da bainha foliar das plantas. Como controle, foram utilizados grãos de arroz autoclavados não colonizados. Após a inoculação do patógeno, as plantas foram mantidas em casa de vegetação com temperatura diurna de 30 ± 3 °C e noturna de 25 ± 3 °C.

1.2.14 Avaliação da severidade da doença e do crescimento radicular

A severidade da doença foi avaliada sete dias após a inoculação do patógeno. Para isso, cada touceira foi fotografada digitalmente, e a porcentagem de área foliar total necrosada (AFTN%) foi determinada por análise digital de imagens utilizando o software Assess 2.0 (Lamari, 2008).

Ao final dos ensaios, as raízes das plantas foram removidas do substrato e lavadas em água corrente. O comprimento de raízes foi mensurado com auxílio de régua milimétrica, considerando-se a média por planta em cada parcela experimental.

1.2.15 Análise estatística

Todos os ensaios (antagonismo *in vitro* e eficácia em casa de vegetação) foram conduzidos em delineamento de blocos casualizados (DBC), com cinco repetições, e cada experimento foi replicado de forma independente em duas ocasiões distintas. Para cada grupo de antagonistas (*Bacillus* spp. e *Trichoderma* spp.), foram realizadas análises para as diferentes modalidades de estudo. Nos ensaios *in vitro*, quantificou-se a porcentagem de inibição do crescimento micelial para as bactérias e o antagonismo por meio das escalas de Bell et al. (1982) e Rodrigues (2010) para os fungos. Nos ensaios de eficácia em planta, as variáveis analisadas foram a severidade da doença, expressa como porcentagem de área foliar total necrosada (AFTN %), e o comprimento de raiz (cm).

As pressuposições de normalidade dos resíduos e homogeneidade de variâncias foram verificadas previamente à análise de variância (ANAVA) pelos testes de Shapiro-Wilk (Shapiro & Wilk, 1965) e Bartlett (Bartlett, 1937), respectivamente. Os dados foram submetidos à ANAVA para avaliar os efeitos de tratamentos, experimentos e a interação experimento × tratamento. Constatada a ausência de interação significativa ($p > 0,05$), o que indica elevada reprodutibilidade entre os ensaios, procedeu-se à análise conjunta dos experimentos. Quando o efeito dos tratamentos foi significativo pelo teste *F*, as médias foram agrupadas por meio do teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, utilizando o software SISVAR (Ferreira, 2019).

1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.3.1 Seleção de isolados de *Bacillus* spp. com potencial antagonista a *Rhizoctonia solani* AG-1 IA

Um total de 49 isolados bacterianos foram recuperados de amostras de solo dos biomas Amazônia e Cerrado e foram selecionados para avaliação do potencial antagonista contra *Rhizoctonia solani* AG-1 IA.

A análise de variância revelou ausência de efeito significativo de experimento ($p = 0,7044$), de blocos ($p = 0,3586$) e da interação experimento × tratamento ($p = 0,9957$), indicando elevada reprodutibilidade entre os experimentos conduzidos em diferentes ocasiões e permitindo a análise conjunta dos dados (Tabela 2). Em contraste, foi observado efeito altamente significativo dos tratamentos ($p < 0,0001$), evidenciando ampla variabilidade quanto à capacidade dos isolados em restringir o

crescimento do patógeno.

Tabela 2 – Quadro de análise de variância dos dados de antagonismo de isolados de *Bacillus* spp. sobre o crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA.

Fontes de variação	GL	QM	F calculado	p
Análise de interação				
Experimento (1 e 2)	1	0,0007	0,144	0,7044 ns
Tratamentos	49	0,6924	135,8	0,0000 **
Blocos	4	0,0041	1,095	0,3586 ns
Experimento*Tratamentos	48	0,0026	0,536	0,9957 ns
Erro	396	0,0049		
Análise conjunta				
Tratamentos	49	0,6088	182,194	0,0000 **
Blocos	9	0,0031	0,489	0,8820 ns
Erro	441	0,0047		

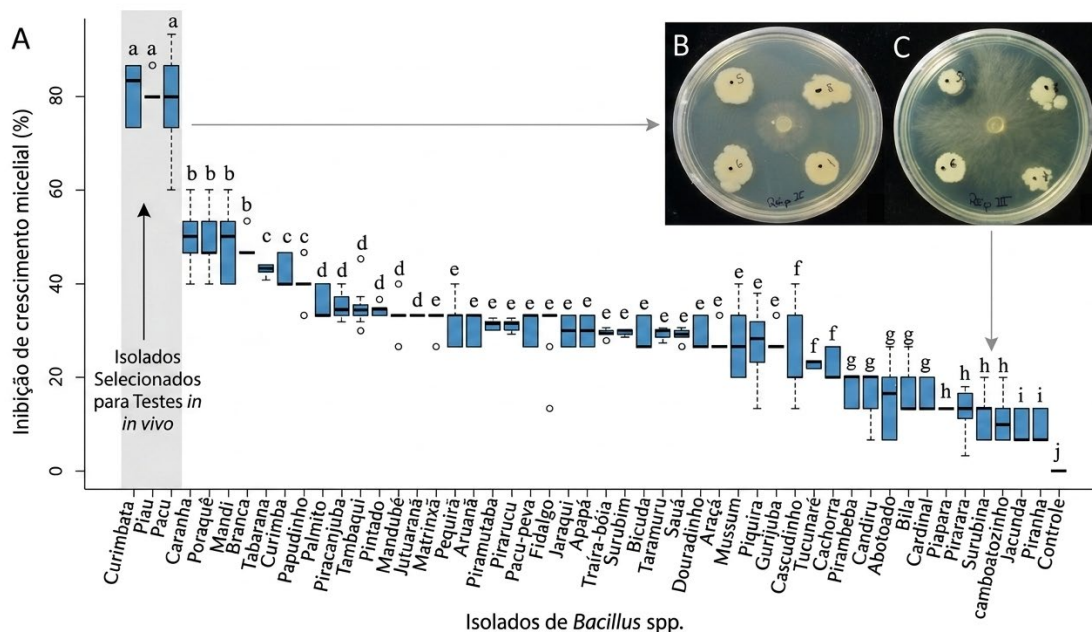
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Nota: GL = Graus de liberdade; QM = Quadrados Médios; ** Significativo a 1% de probabilidade; (ns) não significativo pelo teste F

A porcentagem de inibição do crescimento micelial de *R. solani* AG-1 IA variou amplamente entre os isolados avaliados, demonstrando que apenas uma fração reduzida da população bacteriana prospectada apresentou elevado potencial antagonista (Figura 2). Os isolados Curimatá, Piau e Pacu constituíram o grupo de maior eficiência, apresentando inibição superior a 70% do crescimento micelial do patógeno e diferindo estatisticamente dos demais tratamentos.

Os isolados Caranha, Poraquê, Mandi, Branca, Tabarana e Curimba também apresentaram atividade antagonista expressiva, porém significativamente inferior à observada para Curimatá, Piau e Pacu. Por outro lado, isolados como Camboatozinho, Jacundá, Piranha e outros pertencentes aos grupos de menor desempenho apresentaram reduzida capacidade de inibição, aproximando-se dos valores observados para a testemunha (Figura 2).

Figura 2 – Inibição *in vitro* do crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA por isolados de *Bacillus* spp.



Fonte: elaborado pelo próprio autor

Nota: **(A)** Representação em *boxplot* da porcentagem de inibição do crescimento micelial exercida pelos 49 isolados bacterianos (identificados por nomes de peixes no eixo X) e o controle (testemunha). As letras minúsculas acima de cada barra indicam a formação de grupos estatísticos significativos pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). Os isolados destacados no quadro cinza à esquerda (Curimatã, Piau e Pacu) apresentaram halos de inibição superiores a 70% e foram selecionados para os ensaios subsequentes *in vivo*. A linha interna de cada barra indica a mediana, enquanto as hastes verticais representam os valores máximos e mínimos de dez repetições. **(B)** Aspecto visual do teste de pareamento (método do halo) demonstrando a alta eficácia dos isolados de elite na inibição do desenvolvimento do patógeno. **(C)** Demonstração visual do teste de pareamento em isolados que apresentaram baixa ação inibitória sobre o crescimento de *R. solani* AG-1 IA.

As observações visuais obtidas nos ensaios de confrontação direta corroboraram os resultados quantitativos. Os isolados classificados como altamente antagonistas produziram zonas evidentes de inibição e restringiram significativamente o avanço do micélio de *R. solani* AG-1 IA, enquanto os isolados de baixa eficiência permitiram crescimento praticamente irrestrito do patógeno (Figura 2B e 2C).

Considerando-se os 49 isolados avaliados, apenas três (6,1%) apresentaram níveis de inibição superiores a 70%, evidenciando que isolados com elevado potencial de biocontrole representam uma pequena fração da população bacteriana inicialmente recuperada. Esse resultado reforça a importância de programas de bioprospecção envolvendo grande número de isolados para identificação de agentes de controle biológico efetivamente promissores.

A capacidade antagonista observada para os isolados selecionados pode estar relacionada à produção de metabólitos antimicrobianos e compostos bioativos

frequentemente associados ao gênero *Bacillus*, incluindo lipopeptídeos, sideróforos, antibióticos e enzimas hidrolíticas capazes de interferir no crescimento de fungos fitopatogênicos (Madigan et al., 2016; Clemente et al., 2016). Diversos estudos têm demonstrado que espécies desse gênero apresentam elevada eficiência no controle biológico de patógenos habitantes do solo, especialmente aqueles pertencentes aos gêneros *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Sclerotinia* e *Pythium*.

Resultados semelhantes foram obtidos por Vicentini et al. (2022), que verificaram elevado potencial antagonista de bactérias fluorescentes isoladas da Amazônia brasileira contra *R. solani* AG-1 IA, demonstrando que ecossistemas naturais constituem importantes reservatórios de microrganismos com potencial para uso em programas de manejo biológico de doenças.

Com base nos resultados obtidos, os isolados Curimatá, Piau e Pacu foram selecionados para as análises moleculares e para os ensaios subsequentes de validação biológica em condições de casa de vegetação.

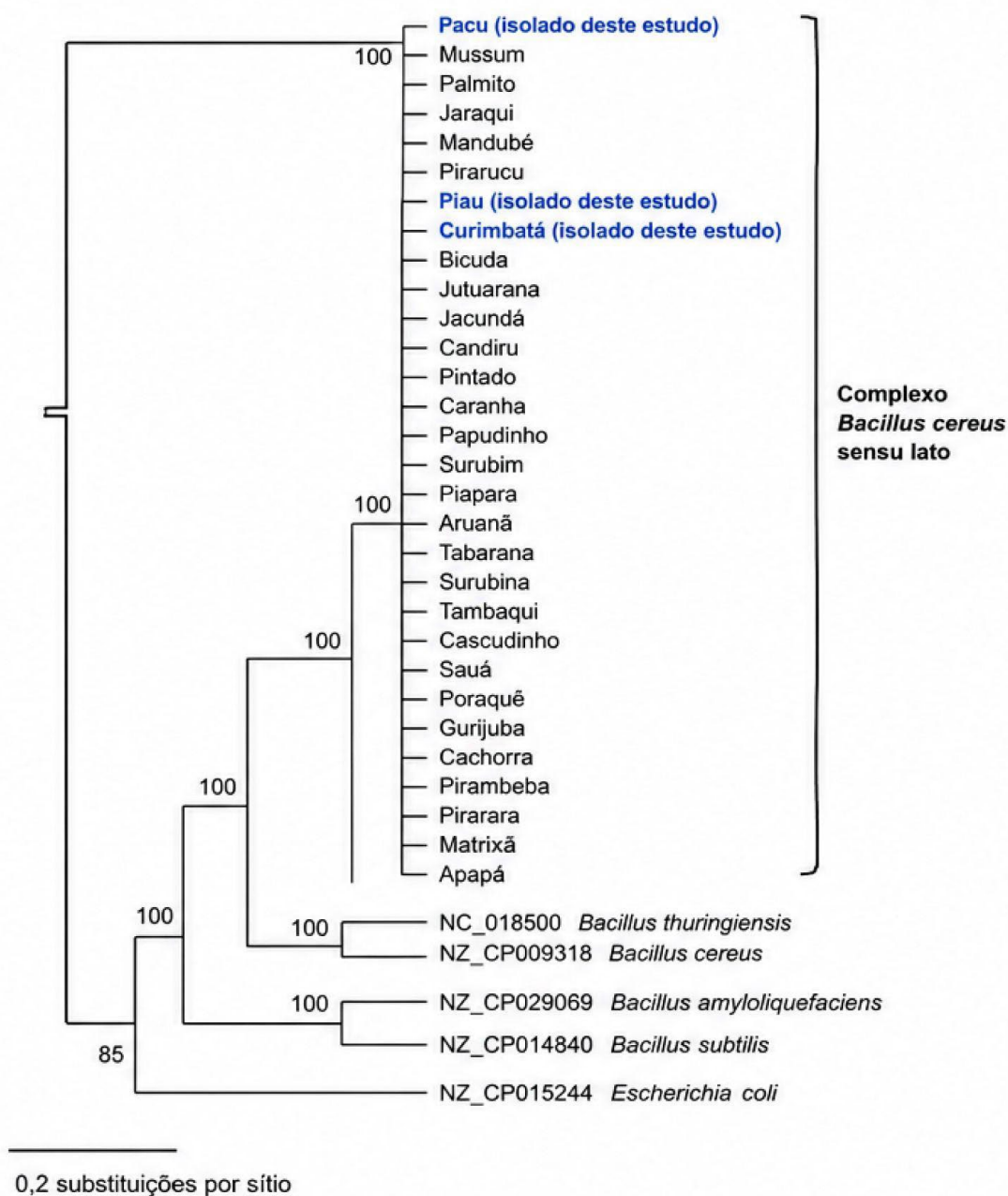
1.3.2 Identificação filogenética dos isolados de *Bacillus* spp.

As sequências obtidas da região 16S-rDNA permitiram posicionar filogeneticamente os isolados Curimatá, Piau e Pacu juntamente com sequências de referência pertencentes ao complexo *Bacillus cereus* sensu lato (Figura 3).

A árvore filogenética revelou elevado grau de similaridade entre os isolados selecionados e representantes desse complexo, incluindo linhagens classificadas como *B. cereus*, *B. thuringiensis* e espécies relacionadas. Esse resultado confirma que os três isolados mais eficientes pertencem a um grupo taxonômico amplamente distribuído em solos agrícolas e frequentemente associado à promoção de crescimento vegetal e ao controle biológico de doenças.

Entretanto, a utilização exclusiva da região 16S-rDNA apresenta resolução taxonômica limitada para discriminar espécies pertencentes ao complexo *Bacillus cereus*. Essa limitação tem sido amplamente reconhecida para diversos grupos bacterianos.

Figura 3 – Árvore filogenética baseada em sequências da região 16S-rDNA demonstrando o posicionamento filogenético dos isolados de *Bacillus* prospectados neste estudo quanto ao antagonismo a *Rhizoctonia solani* AG-1 IA.



Isolados deste estudo utilizados nos ensaios em casa de vegetação destacados em azul.
 Valores de *bootstrap* (>70%) indicados nos nós.
 A barra horizontal representa a distância genética (substituições por sítio).
Escherichia coli utilizado como grupo externo (*outgroup*).

Fonte: elaborado pelo próprio autor

Nota: O total de 1359 pares bases de DNA foram utilizadas para a construção da árvore, utilizando o método UPGMA com modelo de distância HKY e 1000 repetições de bootstrap, implementado no software Geneious® v. 9.0.5. Os isolados destacados em azul (Pacu, Piau e Curimbatá) pertencem ao complexo *Bacillus cereus* sensu lato e foram selecionados para os ensaios de biocontrole em casa de vegetação por sua eficácia *in vitro*. Sequências de referência de *B. thuringiensis*, *B. cereus*, *B. amyloliquefaciens* e *B. subtilis* foram incluídas para comparação taxonômica.

Em particular, espécies pertencentes ao complexo *Bacillus cereus* apresentam

elevada similaridade na região 16S-rDNA, dificultando sua discriminação taxonômica por meio desse único marcador molecular (Case et al., 2007). Dessa forma, embora os resultados obtidos permitam alocar os isolados Curimbatá, Piau e Pacu ao complexo *Bacillus cereus* sensu lato, a identificação específica definitiva demandaria análises multilocus ou sequenciamento genômico completo.

Do ponto de vista aplicado, entretanto, a identidade taxonômica exata apresenta importância secundária em relação ao desempenho biológico observado. Os resultados de antagonismo demonstram que esses isolados possuem elevado potencial para utilização em estratégias de manejo biológico de *R. solani* AG-1 IA, justificando sua seleção para os ensaios subsequentes conduzidos neste estudo.

1.3.3 Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. com potencial antagonista a *Rhizoctonia solani* AG-1 IA

Foram avaliados 23 isolados de *Trichoderma* spp. quanto à capacidade de antagonizar *Rhizoctonia solani* AG-1 IA por meio de confrontação direta em placas de Petri. A análise de variância indicou ausência de efeito significativo de experimento para ambas as metodologias de avaliação empregadas, bem como ausência de interação significativa entre experimento e tratamento (Tabela 3). Para a escala de Bell et al. (1982), a interação experimento $\times$ tratamento apresentou valor de $p = 0,9997$, enquanto para a escala de Rodrigues (2010) o valor foi $p = 1,0000$. Esses resultados demonstram elevada consistência experimental e excelente reprodutibilidade dos ensaios, permitindo a análise conjunta dos dados.

Em ambas as metodologias foi observado efeito altamente significativo dos tratamentos ($p < 0,0001$), evidenciando ampla variabilidade quanto à capacidade antagonista dos isolados avaliados (Tabela 3).

Os resultados obtidos pela escala de Bell et al. (1982) permitiram a separação dos isolados em quatro grupos distintos de antagonismo (Figura 4).

Tabela 3 – Quadros de análise de variância dos dados de antagonismo de *Trichoderma* spp. sobre o crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA, utilizando as escalas de Bell et al. (1982) e Rodrigues (2010).

Fontes de variação	GL	QM (Bell)	F (Bell)	p (Bell)	QM (Rodrigues)	F (Rodrigues)	p (Rodrigues)
Análise de interação							
Experimento (1 e 2)	1	0,13	0,54	0,4626 (ns)	0,32	0,45	0,5044 (ns)
Tratamentos	22	9,5	39,17	0,0000**	32,9	45,79	0,0000**
Blocos	4	0,63	2,58	0,5390 (ns)	0,48	0,67	0,6105 (ns)
Experimento x Tratamentos	22	0,06	0,26	0,9997 (ns)	0,08	0,11	1,0000 (ns)
Erro	180	0,24			0,72		
Análise conjunta							
Tratamentos	22	10,77	37,68	0,0000**	29,52	44,43	0,0000**
Blocos	9	0,44	1,54	0,1362 (ns)	0,24	0,36	0,9520 (ns)
Erro	198	0,28			0,66		

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Nota: GL = Graus de liberdade; QM = Quadrados Médios; ** Significativo a 1% de probabilidade; (ns) não significativo pelo teste *F*

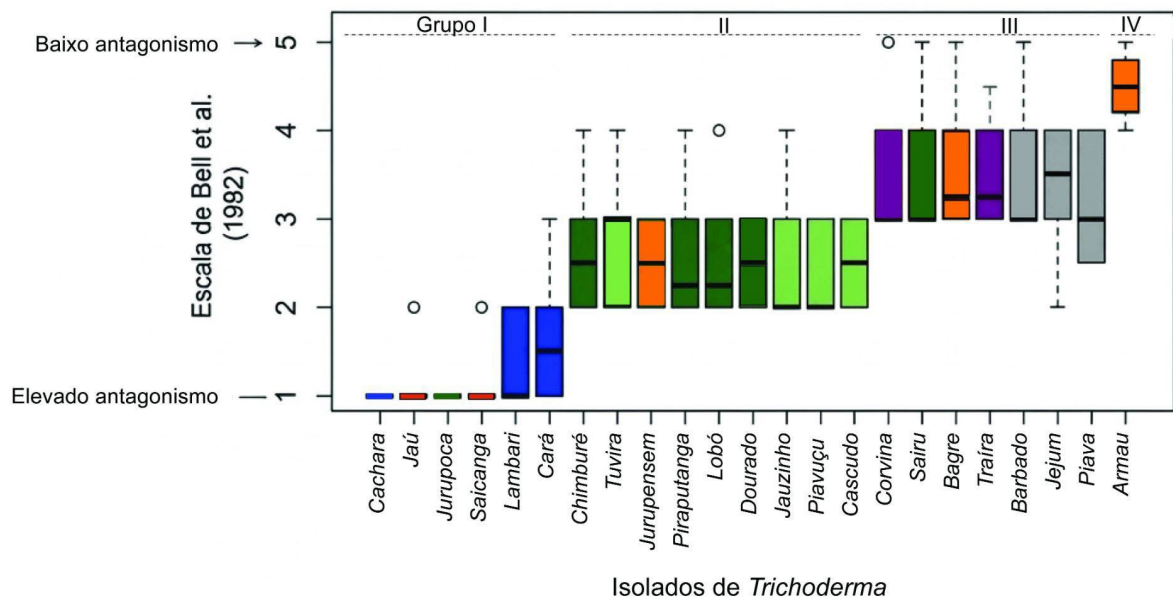
Os menores valores médios, correspondentes aos maiores níveis de antagonismo, foram observados para os isolados Cachara, Jaú e Jurupoca, que apresentaram notas próximas ao valor mínimo da escala e diferiram estatisticamente dos demais tratamentos.

Os isolados Saicanga, Lambari, Cará, Chimbure, Tuvira e Jurupensem também apresentaram desempenho expressivo, porém inferior ao observado para os três isolados mais eficientes. Em contraste, Armau, Piava, Jejum e Barbado apresentaram os maiores valores médios da escala, indicando reduzida capacidade de restrição ao crescimento do patógeno.

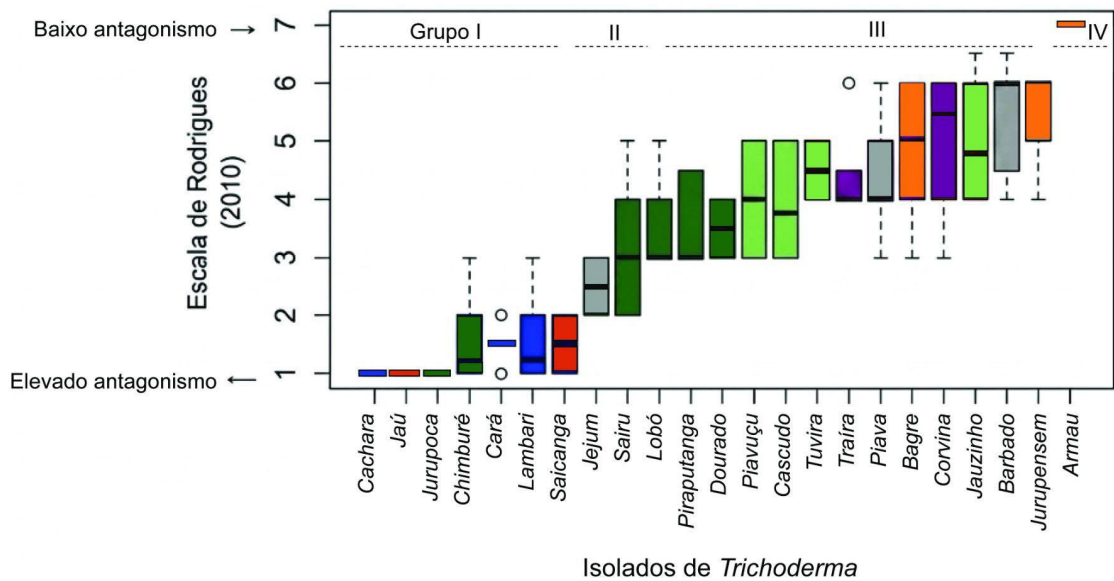
Resultados semelhantes foram obtidos utilizando a escala de Rodrigues (2010) (Figura 4). Os isolados Cachara, Jurupoca e Jaú permaneceram entre os tratamentos mais eficientes, confirmando a robustez da seleção realizada. A elevada concordância observada entre as duas metodologias demonstra que ambos os sistemas de avaliação foram capazes de discriminar adequadamente os níveis de antagonismo apresentados pelos isolados.

Figura 4 – Antagonismo *in vitro* de isolados de *Trichoderma* spp. contra o fitopatôgeno *Rhizoctonia solani* AG-1 IA.

A



B



Fonte: elaborado pelo próprio autor

Nota: **(A)** Classificação baseada na Escala de Bell *et al.* (1982), com notas de 1 a 5; **(B)** Classificação baseada na Escala de Rodrigues (2010), com notas de 1 a 7. Em ambas as escalas, o valor 1 indica o máximo antagonismo e os valores 5 ou 7 indicam o mínimo. A coloração dos boxplots reflete a identificação filogenética multigênica dos isolados (conforme Figura 5): Vermelho (*T. virens*), azul (*T. koningiopsis*), verde escuro (*T. lentiforme*), verde Claro (*T. asperellum*), laranja (*T. atroviride*), roxo (*T. inhamatum*) e cinza (isolados não identificados filogeneticamente). Os rótulos Grupo I, II, III e IV no topo dos gráficos indicam os agrupamentos estatísticos definidos pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). As linhas horizontais no interior dos boxplots representam a mediana e os círculos indicam a presença de valores discrepantes (*outliers*).

A utilização simultânea das duas escalas permitiu maior confiabilidade na seleção dos antagonistas, reduzindo a possibilidade de vieses associados à

interpretação visual das interações entre as colônias. A consistência dos resultados obtidos reforça a superioridade dos isolados Cachara, Jurupoca e Jaú em relação aos demais isolados avaliados.

As interações observadas durante os ensaios de confrontação direta revelaram diferentes mecanismos de antagonismo. Alguns isolados promoveram rápida ocupação da superfície da placa, limitando o crescimento do patógeno por competição por espaço e nutrientes, enquanto outros apresentaram evidências de sobreposição parcial das colônias, sugerindo potencial ocorrência de micoparasitismo.

Espécies de *Trichoderma* são amplamente reconhecidas pela capacidade de produzir enzimas hidrolíticas, metabólitos antifúngicos e compostos voláteis que atuam diretamente sobre fungos fitopatogênicos. Além disso, diversos estudos demonstram que esses microrganismos podem induzir respostas de defesa em plantas hospedeiras e promover crescimento vegetal, ampliando seu potencial de utilização em programas de manejo integrado de doenças (Harman et al., 2004; Vinale et al., 2008).

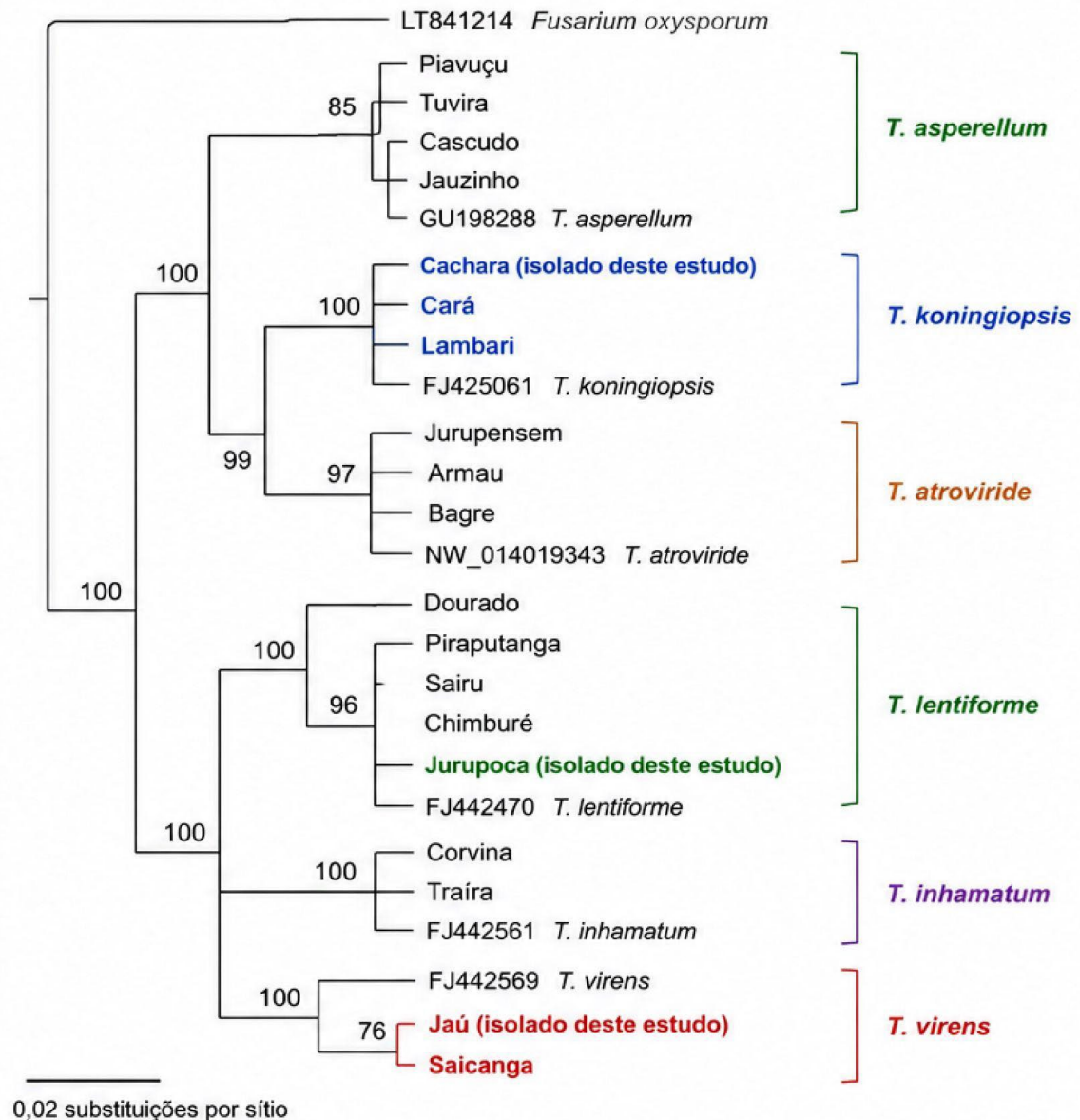
Os resultados obtidos neste estudo são consistentes com observações relatadas para outros patossistemas, nos quais isolados de *Trichoderma* apresentam elevada capacidade de antagonizar espécies de *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Sclerotinia* e *Pyricularia*. Pereira et al. (2022), avaliando isolados amazônicos de *Trichoderma* contra *Pyricularia oryzae* linhagem Triticum, observaram comportamento semelhante, com forte variabilidade entre isolados e seleção de um grupo restrito de antagonistas altamente eficientes.

Com base nos resultados obtidos nas escalas de Bell e Rodrigues, os isolados Cachara, Jurupoca e Jaú foram selecionados para caracterização molecular e para os ensaios subsequentes de validação biológica.

1.3.4 Identificação filogenética dos isolados de *Trichoderma* spp.

A sistemática do gênero *Trichoderma* passou por profundas revisões nas últimas décadas, com a incorporação de caracteres moleculares à taxonomia tradicional baseada em morfologia e características fisiológicas (Samuels, 1996, 2006). Estudos filogenéticos multilocus permitiram a reclassificação de diversas espécies e a identificação de linhagens crípticas anteriormente não reconhecidas.

Figura 5 – Árvore filogenética multigênica construída com sequências concatenadas da região ITS-5.8S do rDNA e de fragmentos dos genes α -actina e fator de alongação-1 alfa (*tef-1 α*) demonstrando o posicionamento filogenético dos isolados de *Trichoderma* prospectados neste estudo quanto ao antagonismo a *Rhizoctonia solani* AG-1 IA.



Isolados selecionados para os experimentos em casa de vegetação destacados em cores.

Valores de *bootstrap* (>70%) indicados nos nós.

A barra horizontal representa a distância genética (substituições por sítio).

Fusarium oxysporum utilizado como grupo externo (*outgroup*).

Fonte: elaborado pelo próprio autor

Nota: O total de bases concatenadas utilizadas foi de 1845 pares de bases de DNA. A árvore foi construída no software Geneious® v. 9.0.5 utilizando o método UPGMA, modelo de distância HKY e 1000 repetições de bootstrap. Os isolados selecionados para os experimentos *in vivo* estão destacados em cores de acordo com sua identificação específica: *T. koningiopsis* (Cachara, em azul), *T. lentiforme* (Jurupoca, em verde) e *T. virens* (Jaú, em vermelho). A árvore inclui as espécies do complexo *T. harzianum* (*T. lentiforme* e *T. inhamatum*), além de *T. asperellum*, *T. atroviride* e *T. virens*.

A identificação molecular dos isolados selecionados foi realizada por meio de análise filogenética baseada em uma matriz concatenada composta pelas regiões ITS-5.8S do rDNA, α -actina (*act*) e fator de alongação da tradução 1-alfa (*tef-1 α*), totalizando aproximadamente 1845 pares de bases.

A árvore filogenética obtida permitiu a separação dos isolados em agrupamentos correspondentes a diferentes espécies reconhecidas do gênero *Trichoderma* (Figura 5). Os valores de *bootstrap* obtidos forneceram suporte consistente para os principais clados recuperados, permitindo a identificação dos isolados selecionados para os ensaios subsequentes.

O isolado Cachara agrupou-se com sequências de referência de *Trichoderma koningiopsis*, apresentando elevado suporte estatístico e confirmando sua identidade taxonômica. Esse isolado integrou o grupo de maior antagonismo observado nos ensaios de confrontação direta, destacando-se como um dos candidatos mais promissores para o controle biológico de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA.

O isolado Jurupoca agrupou-se com sequências de *Trichoderma lentiforme*, espécie pertencente ao complexo *T. harzianum* e reconhecida por sua ampla distribuição em solos agrícolas e ambientes naturais.

A identificação do isolado Jurupoca como *Trichoderma lentiforme* é particularmente relevante, uma vez que esta espécie integra o complexo *T. harzianum*, um dos grupos taxonomicamente mais desafiadores dentro do gênero.

Chaverri et al. (2015) revisaram a taxonomia desse complexo e demonstraram, por meio de análises multilocus (ITS, ACT, CAL, TEF1), que ele compreende pelo menos 14 espécies filogeneticamente distintas, incluindo *T. lentiforme*, anteriormente confundidas sob uma única designação taxonômica. Os autores evidenciaram que a região ITS apresenta resolução limitada para discriminar essas espécies crípticas, sendo necessário o uso de TEF1 como código de barras secundário, uma vez que algumas espécies do complexo apresentam sequências de ITS idênticas, enquanto TEF1 permite discriminação robusta (distância interespecífica média de 5,7%). Esse fato reforça a importância da abordagem filogenética multilocus adotada no presente estudo.

Ainda segundo Chaverri et al. (2015), *T. lentiforme* (originalmente descrita como *Hypocrea lentiformis* por Rehm, 1898, a partir de material coletado no Brasil) é uma das espécies mais comuns do complexo na região Neotropical, sendo frequentemente isolada como endófito de árvores tropicais e também encontrada em

solo, com estado sexual raro registrado apenas no Brasil e na Guiana Francesa.

Essas informações corroboram os dados do presente estudo, no qual o isolado Jurupoca foi obtido de solo da região Amazônica, reforçando sua adequação ecológica para aplicação como agente de biocontrole em pastagens tropicais. Além de Jurupoca, os isolados Dourado, Piraputanga, Sairu, Chimbure e Lobó também foram posicionados nesse mesmo agrupamento filogenético.

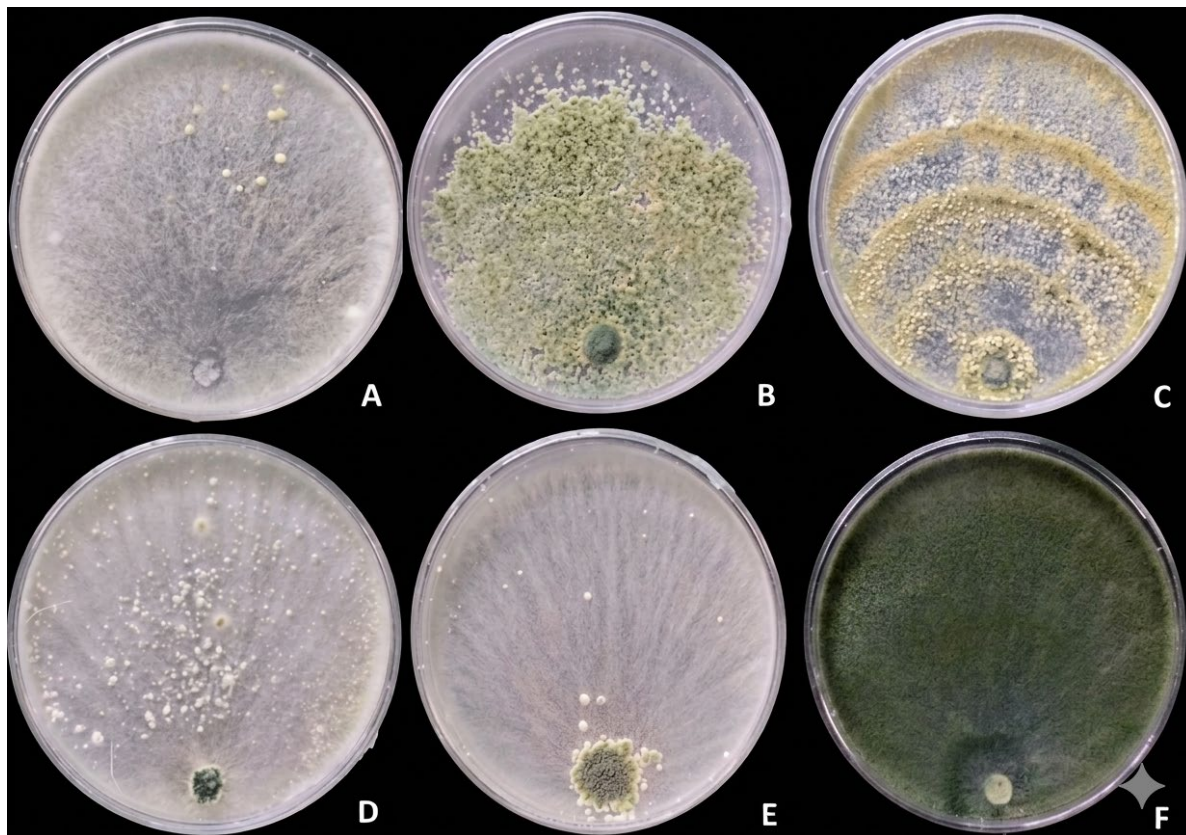
O isolado Jaú foi identificado como *Trichoderma virens*, formando um clado bem sustentado juntamente com o isolado Saicanga e sequências de referência dessa espécie. *T. virens* é amplamente reconhecida como uma das espécies mais importantes do gênero para aplicações em controle biológico, em razão da produção de metabólitos antifúngicos, compostos voláteis e enzimas hidrolíticas com elevada atividade contra fitopatógenos habitantes do solo.

A caracterização macroscópica das colônias das seis espécies identificadas, evidenciando as variações nos padrões de crescimento micelial e nas tonalidades de esporulação em meio BDA após sete dias de incubação a 25 °C, pode ser observada na Figura 6. Nota-se que os isolados de elite selecionados (Jaú, Cachara e Jurupoca) apresentam morfologias distintas, condizentes com suas respectivas posições filogenéticas dentro do gênero.

Além dos isolados selecionados, a análise filogenética revelou a presença de outros grupos taxonômicos relevantes. Os isolados Cará e Lambari foram identificados como *T. koningiopsis*, enquanto Piavuçu, Tuvira, Cascudo e Jauzinho agruparam-se com sequências de *T. asperellum*. Os isolados Jurupensem, Armau e Bagre foram posicionados no clado correspondente a *T. atroviride*, enquanto Corvina e Traíra foram identificados como *T. inhamatum*.

A diversidade taxonômica observada demonstra que os solos amostrados constituem importantes reservatórios de espécies de *Trichoderma* com potencial para aplicações em controle biológico. A ocorrência simultânea de espécies amplamente reconhecidas por sua atividade antagonista, como *T. virens*, *T. asperellum*, *T. atroviride* e *T. koningiopsis*, evidencia que os ecossistemas amazônicos e de Cerrado podem atuar como importantes reservatórios de diversidade funcional para programas de prospecção de agentes de biocontrole, ampliando as possibilidades de seleção de linhagens com mecanismos distintos de antagonismo. Esta diversidade representa um recurso estratégico para o desenvolvimento de tecnologias biológicas adaptadas às condições tropicais.

Figura 6 – Aspecto macroscópico das colônias de seis espécies do gênero *Trichoderma* identificadas filogeneticamente no estudo.



Fonte: elaborado pelo próprio autor

Nota: As amostras foram cultivadas em meio de cultura BDA (Batata-Dextrose-Ágar) sob temperatura controlada de 25 °C e fotografadas após sete dias de incubação. A composição detalha as seguintes espécies: **(A)** *Trichoderma lentiforme*: espécie pertencente ao complexo *T. harzianum*, representada no estudo pelo isolado de elite Jurupoca; **(B)** *Trichoderma asperellum*; **(C)** *Trichoderma koningiopsis*: espécie que inclui o isolado de elite Cachara; **(D)** *Trichoderma atroviride*; **(E)** *Trichoderma inhamatum*: também integrante do complexo *T. harzianum*; **(F)** *Trichoderma virens*: espécie à qual pertence o isolado de elite Jaú, reconhecido por sua elevada agressividade e eficácia no biocontrole.

Um aspecto particularmente interessante observado neste estudo foi o fato de os três isolados selecionados para os ensaios subsequentes pertencerem a espécies distintas. Cachara (*T. koningiopsis*), Jurupoca (*T. lentiforme*) e Jaú (*T. virens*) ocuparam posições filogenéticas diferentes dentro do gênero, indicando que o elevado potencial antagonista observado não está restrito a um único clado evolutivo. Esse resultado sugere que diferentes estratégias ecológicas e mecanismos de antagonismo podem estar envolvidos na supressão de *R. solani* AG-1 IA.

A utilização de múltiplos marcadores moleculares mostrou-se fundamental para a adequada delimitação taxonômica dos isolados. Chaverri et al. (2015) demonstraram que a região ITS, embora amplamente utilizada para identificação fúngica, apresenta resolução limitada para distinguir espécies estreitamente relacionadas dentro do complexo *T. harzianum*, com algumas espécies compartilhando sequências de ITS idênticas. Os autores propuseram o gene TEF1 como código de barras secundário para identificação de espécies nesse complexo, uma vez que apresenta maior variabilidade interespecífica (média de 5,7%) em comparação com ITS (média de 0,29%). A inclusão dos genes α -actina e *tef-1 α* no presente estudo aumentou significativamente o poder discriminatório da análise, permitindo a identificação mais robusta dos isolados avaliados.

Do ponto de vista aplicado, os resultados obtidos fornecem suporte taxonômico consistente para a seleção dos isolados Cachara (*T. koningiopsis*), Jurupoca (*T. lentiforme*) e Jaú (*T. virens*) como candidatos prioritários para os ensaios de biocontrole conduzidos nos capítulos subsequentes desta tese.

1.3.5 Eficácia de *Bacillus* spp. no controle da queima-da-folha

Os isolados de *Bacillus cereus* sensu lato selecionados com base nos ensaios de antagonismo *in vitro* apresentaram elevada eficácia na redução da severidade [mensurada pela área foliar total necrosada (AFTN%)] da queima-da-folha causada por *R. solani* AG-1 IA em *Urochloa brizantha* cv. Marandu. A ausência de interação significativa entre réplicas e tratamentos permitiu a análise conjunta dos experimentos, evidenciando efeito altamente significativo dos tratamentos tanto para o tratamento de sementes ($F = 121,325$; $p < 0,0001$) quanto para a aplicação foliar ($F = 190,685$; $p < 0,0001$) (Tabela 4).

Os três isolados avaliados ("Pacu", "Piau" e "Curimbatá") reduziram substancialmente a área foliar total necrosada (AFTN%) quando comparados ao controle positivo inoculado apenas com o patógeno. Nos experimentos de tratamento de sementes, os valores médios de severidade variaram aproximadamente entre 20 e 29%, enquanto o tratamento contendo apenas *R. solani* AG-1 IA apresentou os maiores níveis de necrose foliar (Figuras 7 e 8A). O isolado "Piau" apresentou o melhor desempenho, seguido por "Pacu" e "Curimbatá", correspondendo a reduções de severidade superiores a 45% em relação ao controle positivo (Figuras 7 e 8).

Tabela 4 – Resumo consolidado das análises de variância de interação e conjunta para severidade (área foliar total necrosada, AFTN, %) e comprimento de raiz em plantas de *Urochloa brizantha* cv. Marandu tratadas com isolados pertencentes ao complexo *Bacillus cereus* sensu lato.

Modalidade e variável	Fontes de variação	GL	QM	F calculado	p
Tratamento de sementes	Análise de interação				
Severidade (AFTN, %)	Réplica (1 e 2)	1	0,2347	0,009	0,9246 (ns)
	Tratamentos	7	3.851,44	109,114	0,0000**
	Blocos	4	29,5957	0,838	0,5062 (ns)
	Réplica x Tratamentos	7	0,2347	0,007	1,0000 (ns)
	Erro	60	35,2974		
	Análise conjunta				
	Tratamentos	7	3.851,44	121,325	0,0000**
	Blocos	9	26,4737	0,834	0,5877 (ns)
	Erro	63	31,7448		
Comprimento de raiz (cm)	Análise de interação				
	Réplica (1 e 2)	1	0,0281	0,057	0,8115 (ns)
	Tratamentos	7	8,0102	16,344	0,0000**
	Blocos	4	0,5984	1,221	0,3114 (ns)
	Réplica x Tratamentos	7	0,2424	0,495	0,8348 (ns)
	Erro	60	0,4901		
	Análise conjunta				
	Tratamentos	7	8,0102	17,314	0,0000**
	Blocos	9	0,4864	1,051	0,4106 (ns)
	Erro	63	0,4626		
Aplicação foliar	Análise de interação				
Severidade (AFTN, %)	Réplica (1 e 2)	1	0,774	0,039	0,8447 (ns)
	Tratamentos	7	3.564,81	177,974	0,0000**
	Blocos	5	37,4203	1,868	0,1100 (ns)
	Réplica x Tratamentos	7	1,0282	0,051	0,9998 (ns)
	Erro	75	20,03		
	Análise conjunta				

Modalidade e variável	Fontes de variação	GL	QM	F calculado	p
	Tratamentos	7	3.564,81	190,685	0,0000**
	Blocos	11	23,4389	1,254	0,2675 (ns)
	Erro	77	18,6947		

(continua)

Comprimento de raiz (cm)	Análise de interação				
	Réplica (1 e 2)	1	0,0001	0	0,9904 (ns)
	Tratamentos	7	1,2381	1,742	0,1120 (ns)
	Blocos	5	0,5038	0,709	0,6186 (ns)
	Réplica x Tratamentos	7	1,1131	1,566	0,1587 (ns)
	Erro	75	0,7107		
	Análise conjunta				
	Tratamentos	7	1,2381	1,682	0,1246 (ns)
	Blocos	11	0,5038	0,684	0,6365 (ns)
	Erro	77	0,7361		

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Nota: GL = Graus de liberdade; QM = Quadrados Médios; ** Significativo a 1% de probabilidade; (ns) não significativo pelo teste F

Resultados semelhantes foram observados para a aplicação foliar (Figuras 7 e 8B), demonstrando que os isolados mantiveram elevada capacidade de proteção da parte aérea independentemente da modalidade de aplicação. A elevada magnitude dos valores de F observados (Tabela 4) sugere que o efeito dos antagonistas sobre a redução da doença foi biologicamente consistente e repetível entre experimentos .

A eficácia observada pode estar associada à produção de compostos antimicrobianos amplamente descritos para espécies de *Bacillus*, incluindo lipopeptídeos como surfactinas, iturinas e fengicinas, capazes de promover desorganização de membranas celulares e inibição do crescimento de fungos fitopatogênicos (Ongena & Jacques, 2008). Adicionalmente, mecanismos de resistência sistêmica induzida podem ter contribuído para a redução da severidade observada, particularmente nos tratamentos foliares realizados 72 horas antes da inoculação do patógeno (Kloepper et al., 2004; Compant et al., 2005).

1.3.5.1 Promoção do crescimento radicular por *Bacillus*.

Além do controle da doença, observou-se efeito significativo dos tratamentos sobre o desenvolvimento radicular quando os antagonistas foram aplicados via sementes ($F = 17,314$; $p < 0,0001$) (Tabela 4; Figura 7). Em contraste, a aplicação foliar não produziu diferenças significativas no comprimento das raízes ($p = 0,1246$; Tabela 4; Figura 7).

Esses resultados sugerem que a colonização precoce da rizosfera constitui componente importante do efeito promotor de crescimento exercido pelos isolados de *Bacillus*. A associação inicial entre microrganismo e sistema radicular provavelmente favoreceu a produção de fitormônios, a solubilização de nutrientes e alterações fisiológicas capazes de estimular o crescimento das raízes (Vessey, 2003; Compant et al., 2005; Lugtenberg & Kamilova, 2009). A ausência de resposta após a aplicação foliar reforça a importância da interação direta entre bactéria e rizosfera para a expressão desses mecanismos.

1.3.6 Eficácia de *Trichoderma* spp. no controle da queima-da-folha

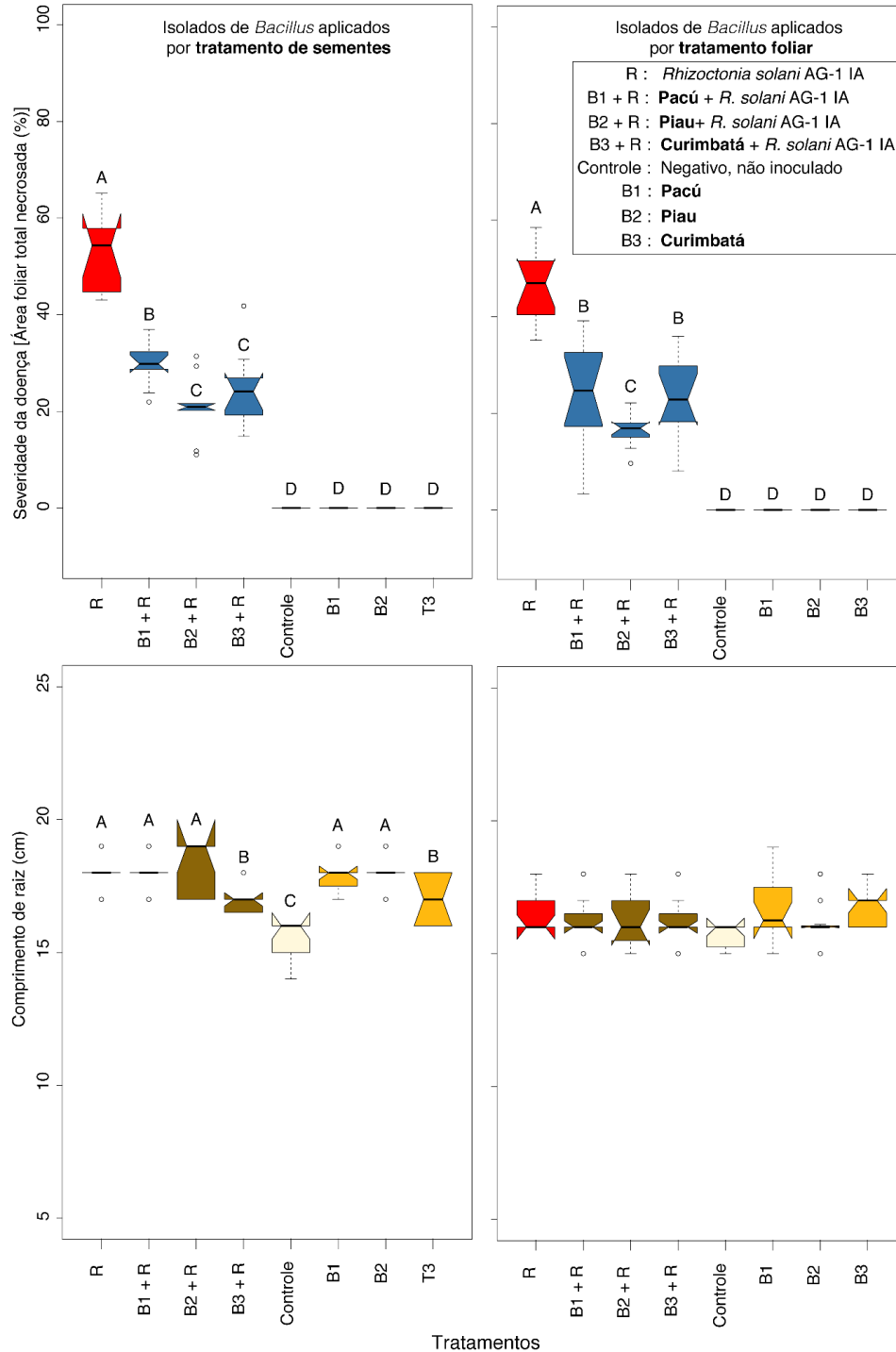
Os isolados "Jaú" (*T. virens*), "Jurupoca" (*T. lentiforme*) e "Cachara" (*T. koningiopsis*) apresentaram elevada eficácia no controle da doença avaliada pela área foliar total necrosada (AFTN%) em ambas as modalidades de aplicação. Os efeitos dos tratamentos foram altamente significativos para o tratamento de sementes ($F = 58,034$; $p < 0,0001$) e especialmente para a aplicação foliar ($F = 644,315$; $p < 0,0001$), correspondendo ao maior valor de F observado em todo o estudo (Tabela 5).

Nos ensaios de tratamento de sementes, os níveis de AFTN variaram aproximadamente entre 10,7 e 24,6%, com destaque para o isolado "Jaú", que apresentou a menor severidade e reduziu a doença em aproximadamente 75% em relação ao controle positivo (Figuras 9 e 10A). O isolado "Cachara" também apresentou elevado potencial de controle, enquanto "Jurupoca" mostrou desempenho inferior, embora ainda significativamente melhor que a inoculação apenas com o patógeno.

Os resultados mais expressivos foram obtidos na aplicação foliar (Figura 9). O isolado "Jaú" reduziu a severidade para aproximadamente 6,8%, correspondendo a cerca de 85% de redução da doença em comparação ao controle positivo. Os isolados "Cachara" e "Jurupoca" também apresentaram elevados níveis de controle, reduzindo

a severidade em aproximadamente 80% e 74%, respectivamente (Figuras 9 e 10B).

Figura 7 – Efeito da aplicação de isolados de *Bacillus* spp. na severidade da queima-da-folha (Área foliar total necrosada %) e no comprimento de raiz (cm) de *Urochloa brizantha* cv. "Marandu" sob condições de casa de vegetação.

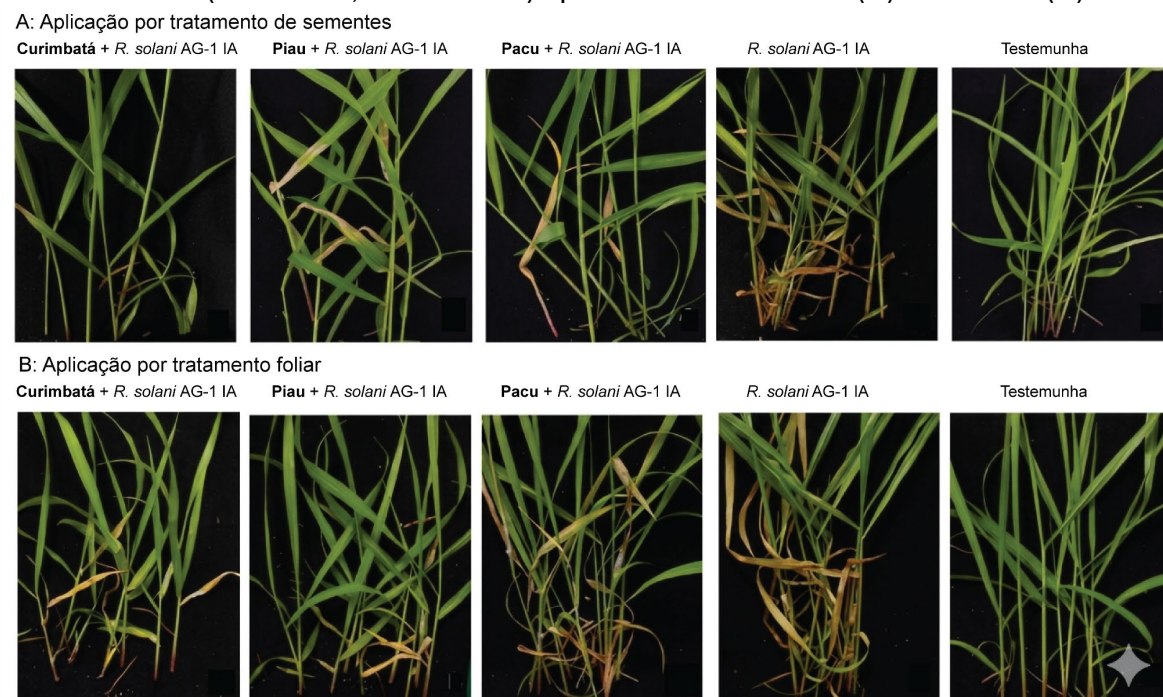


Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Nota: Os painéis superiores apresentam a severidade e os inferiores o desenvolvimento radicular, comparando as modalidades de tratamento de sementes (esquerda) e tratamento foliar (direita)¹. Os tratamentos compreendem: R (*Rhizoctonia solani* AG-1 IA); B1+R ("Pacú" + *R. solani* AG-1 IA); B2+R ("Piau" + *R. solani* AG-1 IA); B3+R ("Curimbatá" + *R. solani* AG-1 IA); Controle (testemunha negativa); e os isolados de elite aplicados individualmente (B1: "Pacú", B2: "Piau" e B3: "Curimbatá"). Médias

seguidas por letras iguais acima dos boxplots não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). As linhas horizontais no interior dos boxplots representam a mediana e os círculos indicam a presença de valores discrepantes (*outliers*).

Figura 8 – Aspecto visual de touceiras de *Urochloa brizantha* cv. Marandu aos 30 dias após a inoculação com *Rhizoctonia solani* AG-1 IA, evidenciando o efeito protetor dos isolados de *Bacillus cereus* (Curimatá, Piau e Pacu) aplicados via sementes (A) e via foliar (B).



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Nota: *R. solani* AG-1 IA: controle positivo com sintomas severos de queima;
Testemunha: plantas saudáveis sem inoculação.

A superioridade observada para *Trichoderma* spp., particularmente na aplicação foliar, sugere elevada capacidade de colonização da superfície vegetal e expressão eficiente de mecanismos múltiplos de antagonismo. Além da antibiose, espécies de *Trichoderma* são reconhecidas pela produção de enzimas hidrolíticas, competição por nutrientes, micoparasitismo e indução de resistência sistêmica em plantas hospedeiras (Howell, 2003; Harman et al., 2004; Woo et al., 2014). Esses mecanismos podem atuar simultaneamente, explicando os elevados níveis de controle observados.

1.3.6.1 Promoção do crescimento radicular por *Trichoderma*.

Os tratamentos de sementes com *Trichoderma* promoveram aumento significativo do comprimento radicular ($F = 22,899$; $p < 0,0001$), representando o efeito mais expressivo sobre crescimento vegetal observado neste estudo (Tabela 5; Fig. 9)

Tabela 5 – Resumo consolidado das análises de varância de interação e conjunta para severidade (área foliar total necrosada, AFTN, %) e comprimento de raiz em plantas de *Urochloa brizantha* cv. Marandu tratadas com isolados de *Trichoderma* spp.

Modalidade e variável	Fontes de variação	GL	QM	F calculado	p
Tratamento de sementes	Análise de interação				
Severidade (AFTN, %)	Réplica (1 e 2)	1	2,2882	0,052	0,8190 (ns)
	Tratamentos	7	2.239,18	51,33	0,0000**
	Blocos	4	72,7272	1,667	0,1690 (ns)
	Réplica x Tratamentos	7	1,4708	0,034	1,0000 (ns)
	Erro	60	43,62		
	Análise conjunta				
	Tratamentos	7	2.239,18	58,034	0,0000**
	Blocos	9	54,4382	1,411	0,2020 (ns)
	Erro	63	38,5843		
Comprimento de raiz (cm)	Análise de interação				
	Réplica (1 e 2)	1	0,2101	0,094	0,7597 (ns)
	Tratamentos	7	53,5871	24,081	0,0000**
	Blocos	4	2,7057	1,216	0,3136 (ns)
	Réplica x Tratamentos	7	2,4006	1,079	0,3882 (ns)
	Erro	60	2,2252		
	Análise conjunta				
	Tratamentos	7	53,5871	22,899	0,0000**
	Blocos	9	1,5473	0,661	0,7400 (ns)
	Erro	63	2,3401		
Aplicação foliar	Análise de interação				
Severidade (AFTN, %)	Réplica (1 e 2)	1	0,0044	0,001	0,9773 (ns)
	Tratamentos	7	2.634,57	486,32	0,0000**
	Blocos	5	4,8344	0,892	0,4907 (ns)
	Réplica x Tratamentos	7	0,0183	0,003	1,0000 (ns)
	Erro	75	5,42		

Modalidade e variável	Fontes de variação	GL	QM	F calculado	p
Análise conjunta					
	Tratamentos	7	2.755,84	644,315	0,0000**
	Blocos	11	4,51	1,056	0,4076 (ns)
	Erro	77	5,1241		

(continua)

Comprimento de raiz (cm)	Análise de interação				
	Réplica (1 e 2)	1	6,0501	1,064	0,3056 (ns)
	Tratamentos	7	12,259	2,156	0,0560 (ns)
	Blocos	5	9,5007	1,671	0,1521 (ns)
	Réplica x Tratamentos	7	7,0953	1,248	0,2880 (ns)
	Erro	75	5,6866		
Análise conjunta					
	Tratamentos	7	12,259	2,078	0,0550 (ns)
	Blocos	11	10,61	1,164	0,3250 (ns)
	Erro	77	5,8994		

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Nota: GL = Graus de liberdade; QM = Quadrados Médios; ** Significativo a 1% de probabilidade; (ns) não significativo pelo teste F

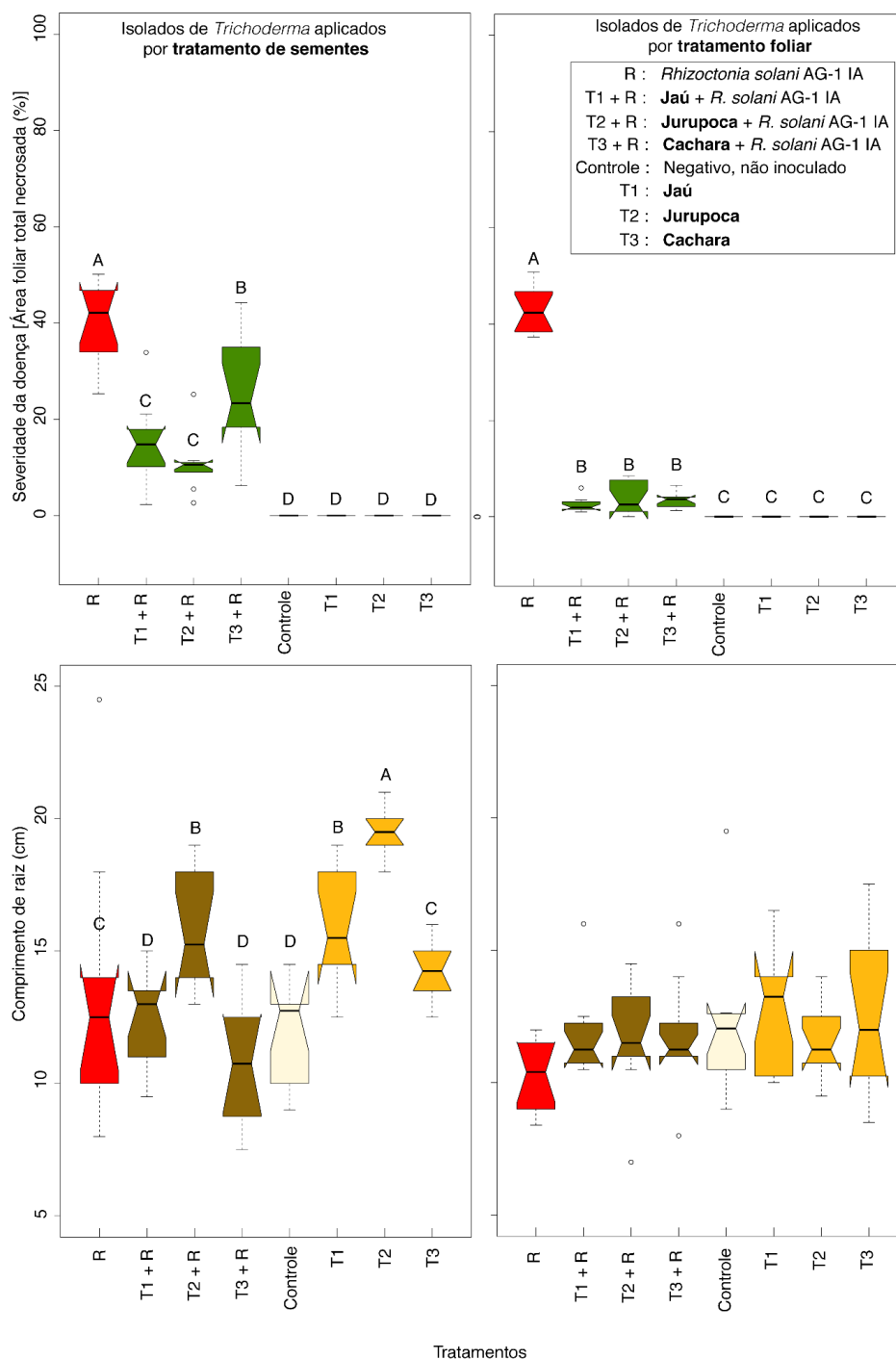
Esse resultado é consistente com a reconhecida capacidade de espécies de *Trichoderma* atuarem como simbiossiontes radiculares, alterando processos fisiológicos relacionados à absorção de nutrientes, metabolismo hormonal e arquitetura do sistema radicular. A colonização precoce das raízes permite que esses efeitos sejam expressos ao longo de todo o desenvolvimento da planta.

Por outro lado, a aplicação foliar não resultou em diferenças estatisticamente significativas para comprimento radicular ($p = 0,055$) (Tabela 5; Figura 9). Embora tecnicamente não significativo ao nível de 5%, esse valor sugere uma tendência biológica que merece investigação adicional em experimentos de maior duração.

1.3.7 Integração entre os resultados *in vitro* e *in vivo*

Um dos aspectos mais relevantes deste estudo foi a elevada concordância entre os resultados obtidos nos ensaios de antagonismo *in vitro* e aqueles observados nos experimentos conduzidos em casa de vegetação. Os isolados selecionados para validação biológica foram justamente aqueles que apresentaram maior capacidade de inibição do crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA nos ensaios laboratoriais, demonstrando que os critérios utilizados para seleção dos antagonistas foram eficientes para identificar microrganismos com potencial agrônômico real.

Figura 9 – Efeito da aplicação de isolados de *Trichoderma* spp. na severidade da queima-da-folha (Área foliar total necrosada %) e no comprimento de raiz (cm) de *Urochloa brizantha* cv. "Marandu" sob condições de casa de vegetação.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Nota: Os gráficos superiores demonstram a severidade e os inferiores o crescimento radicular, diferenciados por tratamento de sementes (esquerda) e tratamento foliar (direita). Os tratamentos incluem: R (*Rhizoctonia solani* AG-1 IA); T1+R ("Jaú" – *T. virens* + *R. solani* AG-1 IA); T2+R ("Jurupoca" – *T. lentiforme* + *R. solani* AG-1 IA); T3+R ("Cachara" – *T. koningiopsis* + *R. solani* AG-1 IA); Controle (testemunha negativa); e os respectivos isolados individuais (T1: "Jaú", T2: "Jurupoca" e T3: "Cachara"). Médias seguidas por letras iguais acima das barras de erro não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). As linhas horizontais no interior dos boxplots representam a mediana e os círculos indicam a presença de valores discrepantes (*outliers*).

Figura 10. Aspecto visual de touceiras de *Urochloa brizantha* cv. Marandu aos 30 dias após

a inoculação com *Rhizoctonia solani* AG-1 IA, demonstrando a eficácia dos isolados de *Trichoderma* spp.: Cachara (*T. koningiopsis*), Jaú (*T. virens*) e Jurupoca (*T. lentiforme*), aplicados via sementes (A) e via foliar (B).

Figura 10 – Aspecto visual de touceiras de *Urochloa brizantha* cv. Marandu demonstrando a eficácia dos isolados de *Trichoderma* spp.

A: Aplicação por tratamento de sementes



B: Aplicação por tratamento foliar



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Nota: *R. solani* AG-1 IA: controle positivo com sintomas severos de queima; Testemunha: plantas saudáveis sem inoculação. Observa-se a redução da área necrosada e a manutenção da biomassa verde, com destaque para o desempenho do isolado Jaú.

Entre os isolados bacterianos, Pacu, Piau e Curimatá, filogeneticamente posicionados no complexo *Bacillus cereus* sensu lato, destacaram-se tanto nos ensaios de antagonismo *in vitro* quanto na redução da severidade da doença em plantas de *Urochloa brizantha*. Os elevados valores de F observados para severidade da doença, tanto no tratamento de sementes ($F = 121,32$; $p < 0,0001$) quanto na aplicação foliar ($F = 190,68$; $p < 0,0001$), demonstram que os isolados mantiveram sua capacidade antagonista independentemente da modalidade de aplicação (Tabela 4). Além do controle da doença, esses isolados promoveram aumento significativo do comprimento radicular quando aplicados via sementes ($F = 17,31$; $p < 0,0001$; Tabela 4), sugerindo que a colonização precoce da rizosfera desempenhou papel importante na promoção do crescimento vegetal.

A eficácia observada para os isolados de *Bacillus* provavelmente está associada à combinação de diferentes mecanismos de ação já descritos para membros do complexo *B. cereus*, incluindo produção de compostos antimicrobianos,

competição por nutrientes e nichos ecológicos e indução de resistência sistêmica na planta hospedeira. A manutenção da eficiência tanto em aplicações via sementes quanto em aplicações foliares sugere que esses mecanismos atuaram de forma consistente ao longo do ciclo experimental.

Resultados igualmente expressivos foram obtidos para os isolados de *Trichoderma*. Os isolados Jaú (*Trichoderma virens*), Jurupoca (*Trichoderma lentiforme*) e Cachara (*Trichoderma koningiopsis*) apresentaram elevada capacidade de controle da queima-da-folha em ambas as modalidades de aplicação, com destaque para os tratamentos foliares, que apresentaram o maior efeito observado em todo o estudo ($F = 644,31$; $p < 0,0001$; Tabela 5). Os resultados demonstram que os isolados selecionados mantiveram em condições de planta o desempenho previamente observado nos ensaios de antagonismo *in vitro*, reduzindo substancialmente a área foliar total necrosada causada por *R. solani* AG-1 IA.

A identificação molecular dos isolados permite interpretar esses resultados à luz das características biológicas descritas para cada espécie. O isolado Jaú foi identificado como *T. virens*, espécie amplamente reconhecida pela produção de metabólitos antifúngicos e pela elevada capacidade de supressão de fitopatógenos por meio de antibiose e indução de resistência vegetal (Howell, 2003; Harman et al., 2004). O isolado Cachara pertence à espécie *T. koningiopsis*, integrante de um grupo frequentemente associado à colonização eficiente da rizosfera e à promoção do crescimento vegetal (Woo et al., 2014; Samuels & Hebbbar, 2015).

Já o isolado Jurupoca foi identificado como *T. lentiforme*, espécie relativamente pouco estudada e recentemente delimitada dentro do complexo *T. harzianum* (Chaverri et al., 2015). Dessa forma, os resultados obtidos ampliam o conhecimento sobre o potencial de *T. lentiforme* como agente de controle biológico de *R. solani* AG-1 IA. Até onde sabemos, este é um dos primeiros relatos do potencial de *T. lentiforme* para supressão de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA associada à braquiária.

Além do controle da doença, os isolados de *Trichoderma* promoveram incremento significativo do comprimento radicular quando aplicados via sementes ($F = 22,89$; $p < 0,0001$; Tabela 5), representando o efeito mais expressivo sobre crescimento vegetal observado neste estudo. Esse resultado é consistente com a reconhecida capacidade de espécies de *Trichoderma* atuarem como simbioses radiculares, modificando processos fisiológicos relacionados à absorção de nutrientes, metabolismo hormonal e arquitetura do sistema radicular. Embora a

aplicação foliar não tenha produzido diferenças estatisticamente significativas para comprimento de raízes ($p = 0,055$), o valor observado sugere uma tendência biológica que merece investigação em estudos futuros.

De forma geral, a elevada consistência entre os resultados obtidos nos ensaios de antagonismo *in vitro* e aqueles observados em casa de vegetação demonstra que os procedimentos de prospecção, identificação molecular e seleção empregados neste trabalho foram eficientes para identificar agentes de controle biológico promissores. Os resultados indicam que os isolados Pacu, Piau e Curimbatá (*Bacillus cereus* sensu lato), bem como Jaú (*T. virens*), Jurupoca (*T. lentiforme*) e Cachara (*T. koningiopsis*), apresentam elevado potencial para integração em programas de manejo biológico da queima-da-folha da braquiária e constituem candidatos prioritários para futuras avaliações em condições de campo.

1.4 CONCLUSÃO

Os isolados bacterianos de *Bacillus cereus* sensu lato (Pacu, Piau e Curimbatá) e fúngicos Jaú (*Trichoderma virens*), Jurupoca (*T. lentiforme*) e Cachara (*T. koningiopsis*) foram identificados filogeneticamente, confirmando sua diversidade taxonômica e potencial para controle biológico.

A elevada capacidade de inibição *in vitro* permitiu a seleção assertiva de agentes para validação em planta. Os experimentos em casa de vegetação confirmaram que os isolados mantiveram sua atividade antagonista em condições biológicas complexas, reduzindo significativamente a severidade da queima-da-folha independentemente da via de aplicação. Os isolados de *B. cereus* sensu lato apresentaram eficácia na redução da doença e atuaram como promotores de crescimento radicular quando aplicados via sementes.

Os isolados de *Trichoderma* spp. proporcionaram os maiores níveis de supressão da doença na aplicação foliar e o incremento mais expressivo no desenvolvimento radicular via sementes. A consistência entre os resultados laboratoriais e de casa de vegetação valida os procedimentos de prospecção e seleção como ferramentas eficientes para identificar bioprotetores promissores para futuras avaliações em campo.

REFERÊNCIAS

- AGROFIT. **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários**. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2019. Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 8 abr. 2019.
- BARTLETT, M. S. Properties of sufficiency and statistical tests. **Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences**, London, v. 160, p. 268–282, 1937.
- BELL, D. K.; WELLS, H. D.; MARKHAM, C. R. In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 72, n. 4, p. 379-382, 1982.
- BRUNNER, K.; ZEILINGER, S.; CILIENTO, R.; WOO, S. L.; LORITO, M.; KUBICEK, C. P.; MACH, R. L. Improvement of the fungal biocontrol agent *Trichoderma atroviride* to enhance both antagonism and induction of plant systemic disease resistance. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 3959-3965, 2005.
- CARBONE, I.; KOHN, L. M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. **Mycologia**, New York, v. 91, n. 3, p. 553-556, 1999.
- CASE, R. J.; BOUCHER, Y.; DAHLLÖF, I.; HOLMSTRÖM, C.; DOOLITTLE, W. F.; KJELLEBERG, S. Use of 16S rRNA and *rpoB* genes as molecular markers for microbial ecology studies. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, n. 1, p. 278-288, 2007.
- CHAVARRO-MESA, E.; CERESINI, P. C.; RAMOS-MOLINA, L. M.; PEREIRA, D. A. S.; SCHURT, D. A.; VIEIRA, J. R.; POLONI, N. M.; McDONALD, B. A. The *Urochloa* foliar blight and collar rot pathogen *Rhizoctonia solani* AG-1 IA emerged in South America via a host shift from rice. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 105, n. 11, p. 1475-1486, 2015.
- CHAVARRO-MESA, E.; CERESINI, P. C.; GOMES, A. C.; et al. A broad diversity survey of *Rhizoctonia* species from the Brazilian Amazon reveals the prevalence of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA associated with foliar blight of *Urochloa brizantha*. **Plant Pathology**, v. 69, p. 620-632, 2020.
- CHAVERRI, P.; BRANCO-ROCHA, F.; JAKLITSCH, W.; GAZIS, R.; DEGENKOLB, T.; SAMUELS, G. J. Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the re-identification of commercial biocontrol strains. **Mycologia**, New York, v. 107, n. 3, p. 558-590, 2015. doi:10.3852/14-147.
- DAVID, G. Q.; CHAVARRO-MESA, E.; SCHURT, D. A.; CERESINI, P. C. *Rhizoctonia* como fitopatógeno no agroecossistema brasileiro. In: LOPES, U. P.; MICHEREFF, S. J. (Ed.). **Desafios do manejo de doenças radiculares causadas por fungos**. Recife: EDUFRPE, 2018. p. 46-67.
- CLEMENTE, J. M.; CARDOSO, C. R.; VIEIRA, B. S. E.; DA MATA FLOR, I.; COSTA, R. L. Use of *Bacillus* spp. as growth promoter in carrot crop. **African Journal of Agricultural Research**, Nairobi, v. 11, n. 35, p. 3355-3359, 2016.

COMPANT, S.; DUFFY, B.; NOWAK, J.; CLÉMENT, C.; BARKA, E. A. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 9, p. 4951–4959, 2005.

FERREIRA, D. F. SISVAR: a computer analysis system to fixed effects split plot type designs. **Revista Brasileira de Biometria**, v. 37, n. 4, p. 529-535, 2019.

HARMAN, G. E.; HOWELL, C. R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* species: opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 2, p. 43-56, 2004.

HOWELL, C. R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 87, n. 1, p. 4–10, 2003.

KELEMU, S.; MILES, J. W.; BONILLA, X. P.; BADEL, J. L. Sources of resistance in species of *Brachiaria* to foliar blight disease caused by *Rhizoctonia solani*. **Tropical Grasslands**, St. Lucia, v. 29, p. 257-262, 1995.

KO, W.; HORA, F. K. A selective medium for the quantitative determination of *Rhizoctonia solani* in soil. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 61, p. 707-710, 1971.

KLOEPPER, J. W.; RYU, C. M.; ZHANG, S. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 94, n. 11, p. 1259–1266, 2004.

LAMARI, L. **Assess 2.0: Image Analysis Software for Plant Disease Quantification**. St. Paul: American Phytopathological Society, 2008. Software.

LU, Z.; TOMBOLINI, R.; WOO, S.; ZEILINGER, S.; LORITO, M.; JANSSON, J. K. In vivo study of *Trichoderma*-pathogen-plant interactions using constitutive and inducible green fluorescent protein reporter systems. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 3073-3081, 2004.

LUGTENBERG, B.; KAMILOVA, F. Plant-growth-promoting rhizobacteria. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 63, p. 541–556, 2009.

MADIGAN, M. T.; BENDER, K. S.; BUCKLEY, D. H.; STAHL, D. A. **Brock Biology of Microorganisms**. 15. ed. Boston: Pearson, 2016.

OGOSHI, A. Ecology and pathogenicity of anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* Kühn. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 25, p. 125-143, 1987.

ONGENA, M.; JACQUES, P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. **Trends in Microbiology**, Oxford, v. 16, n. 3, p. 115–125, 2008.

PEREIRA, M. R. A.; VICENTINI, S. N. C.; FIRMINO, A. C.; et al. Potential of *Pseudomonas* and *Trichoderma* from the Brazilian Amazon as biocontrol agents against wheat blast disease. **Agronomy**, Basel, v. 12, 2003, 2022.

RAMOS-MOLINA, L. M.; CHAVARRO-MESA, E.; PEREIRA, D. A. S.; SILVA-HERRERA, M. D. R.; CERESINI, P. C. *Rhizoctonia solani* AG-1 IA infects both rice and signalgrass in the Colombian Llanos. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia,

v. 46, p. 65-71, 2016.

RODRIGUES, J. ***Trichoderma* spp. associados a níveis de adubação NPK no patossistema *Sclerotinia sclerotiorum*-feijoeiro**. 2010. 85 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Fitopatologia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

SAMUELS, G. J. *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. **Mycological Research**, Cambridge, v. 100, n. 8, p. 923-935, 1996.

SAMUELS, G. J. *Trichoderma*: systematics, the sexual state and ecology. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 96, n. 2, p. 195-206, 2006.

SAMUELS, G. J.; DODD, S. L.; GAMS, W.; CASTLEBURY, L. A.; PETRINI, O. *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. **Mycologia**, New York, v. 94, p. 146-168, 2002.

SAMUELS, G. J.; HEBBAR, P. K. ***Trichoderma*: Identification and agricultural applications**. St. Paul: APS Press, 2015. 204 p.

SAMUELS, G. J.; ISMAIEL, A. *Trichoderma evansii* and *T. lieckfeldtia*: two new *T. hamatum*-like species. **Mycologia**, New York, v. 101, p. 142-156, 2009. doi:10.3852/08-161.

SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B. An analysis of variance test for normality (complete samples). **Biometrika**, Oxford, v. 52, n. 3-4, p. 591-611, 1965.

SNEH, B.; JABAJI-HARE, S.; NEATE, S.; DIJST, G. (ed.). ***Rhizoctonia* species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1996.

STOPPACHER, N.; KLUGER, B.; ZEILINGER, S.; KRSKA, R.; SCHUHMACHER, R. Identification and profiling of volatile metabolites of the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride* by HS-SPME-GC-MS. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 81, n. 2, p. 187-193, 2010.

TEIXEIRA NETO, J. F.; SIMÃO NETO, M.; COUTO, W. S.; DIAS-FILHO, M. B.; SILVA, A. B.; DUARTE, M. L. R.; ALBUQUERQUE, F. C. **Prováveis causas da morte do capim braquiário (*Brachiaria brizantha* cv. Marandu) na Amazônia Oriental**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2000. (Documentos, 36).

VERZIGNASSI, J. R.; FERNANDES, C. D. **Doenças em forrageiras**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2001. (Boletim de Divulgação Técnica Online, 50).

VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 255, n. 2, p. 571-586, 2003.

VICENTINI, S. N. C.; CARVALHO, G.; KRUG, L. D.; et al. Bioprospecting fluorescent *Pseudomonas* from the Brazilian Amazon for the biocontrol of signal grass foliar blight caused by *Rhizoctonia solani* AG-1 IA. **Agronomy**, Basel, v. 12, 1395, 2022.

VINALE, F.; SIVASITHAMPARAM, K.; GHISALBERTI, E. L.; et al. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 40, p. 1-10, 2008.

WEISBURG, W. G.; BARNS, S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE, D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 173, p. 697-703, 1991.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (ed.). **PCR Protocols: a guide to methods and applications**. San Diego: Academic Press, 1990. p. 315-322.

WOO, S. L.; RUOCCO, M.; VINALE, F.; et al. *Trichoderma*-based products and their widespread use in agriculture. **The Open Mycology Journal**, Sharjah, v. 8, p. 71–126, 2014.

2 CONTROLE BIOLÓGICO DA QUEIMA-DA-FOLHA DA BRAQUIÁRIA (*UROCHLOA BRIZANTHA*) CAUSADA POR *RHIZOCTONIA SOLANI* AG-1 IA UTILIZANDO *LAETISARIA ARVALIS*

RESUMO

A queima-da-folha causada por *Rhizoctonia solani* AG-1 IA em braquiária (*Urochloa brizantha*) é uma importante doença com ampla distribuição em pastagens da região Norte do Brasil. O manejo da doença é dificultado pela sobrevivência prolongada do patógeno no solo e pela limitada eficiência das práticas de controle atualmente disponíveis. Nesse contexto, o controle biológico representa uma alternativa promissora. Em levantamento realizado em 2014 em áreas de pastagem no estado do Pará, foi isolado o fungo basidiomiceto *Laetisaria arvalis*, previamente relatado como agente de biocontrole contra espécies de *Rhizoctonia*. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial de *L. arvalis* no manejo da queima-da-folha da braquiária. Foram conduzidos dois experimentos independentes em casa de vegetação, utilizando plantas com 30 e 90 dias após a semeadura (DAS), em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições. Utilizou-se esquema fatorial 5×2 , constituído por cinco tratamentos (testemunha, milheto, milheto + *R. solani*, milheto + *L. arvalis* e milheto + *L. arvalis* + *R. solani*) e duas cultivares de *U. brizantha* (Marandu e Piatã). A severidade da doença foi estimada por análise digital de imagens, utilizando a porcentagem de área foliar total necrosada (AFTN%). Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). Houve diferenças significativas entre cultivares e idades das plantas. A cultivar Marandu apresentou menor severidade média (8,92%) em comparação com Piatã (10,48%). Plantas tratadas aos 90 DAS apresentaram menor severidade (7,05%) do que aquelas tratadas aos 30 DAS (12,36%). *Laetisaria arvalis* reduziu significativamente a severidade da doença em ambas as cultivares. Na cultivar Marandu tratada aos 90 DAS, a severidade observada (5,41%) não diferiu estatisticamente daquela registrada na testemunha não inoculada (1,86%). Conclui-se que *L. arvalis* apresenta potencial como agente de controle biológico da queima-da-folha causada por *R. solani* AG-1 IA em *U. brizantha*.

Palavras-chave: controle biológico; *Urochloa brizantha*; *Rhizoctonia solani*; pastagens tropicais; manejo integrado de doenças.

BIOLOGICAL CONTROL OF SIGNAL GRASS (*UROCHLOA BRIZANTHA*) FOLIAR BLIGHT CAUSED BY *RHIZOCTONIA SOLANI* AG-1 IA USING *LAETISARIA ARVALIS*

ABSTRACT

Foliar blight caused by *Rhizoctonia solani* AG-1 IA is an important disease of signal grass (*Urochloa brizantha*) widely distributed in pastures of northern Brazil. Disease management is hindered by the long-term survival of the pathogen in soil and the limited effectiveness of currently available control measures. Biological control therefore represents a promising alternative. During a survey conducted in 2014 in pasture areas in Pará State, Brazil, the basidiomycete fungus *Laetisaria arvalis*, previously reported as a biocontrol agent against *Rhizoctonia* spp., was isolated. The objective of this study was to evaluate the potential of *L. arvalis* for the management of signal grass foliar blight. Two independent greenhouse experiments were conducted using plants at 30 and 90 days after sowing (DAS) in a completely randomized design with five replications. A 5 × 2 factorial arrangement was adopted, consisting of five treatments (control, millet, millet + *R. solani*, millet + *L. arvalis*, and millet + *L. arvalis* + *R. solani*) and two *U. brizantha* cultivars (Marandu and Piatã). Disease severity was estimated by digital image analysis using total necrotic leaf area (TNLA%). Data were subjected to analysis of variance and means were grouped using the Scott-Knott test ($p < 0.05$). Significant differences were observed among cultivars and plant ages. Cultivar Marandu showed lower disease severity (8.92%) than Piatã (10.48%). Plants treated at 90 DAS showed lower severity (7.05%) than those treated at 30 DAS (12.36%). *Laetisaria arvalis* significantly reduced disease severity in both cultivars. In Marandu plants treated at 90 DAS, disease severity (5.41%) did not differ statistically from that observed in the non-inoculated control (1.86%). These results indicate that *L. arvalis* has potential as a biological control agent against foliar blight caused by *R. solani* AG-1 IA in *U. brizantha*.

Keywords: biological control; *Urochloa brizantha*; *Rhizoctonia solani*; tropical pastures; integrated disease management.

2.1 INTRODUÇÃO

As pastagens cultivadas constituem a principal base alimentar da pecuária brasileira e sustentam um dos maiores rebanhos bovinos do mundo (Ferraz; Felício, 2010; Dias-Filho, 2017). Entre as espécies forrageiras utilizadas no país, *Urochloa brizantha* (syn. *Brachiaria brizantha*) destaca-se pela ampla adaptação às condições edafoclimáticas tropicais, elevada produção de biomassa e boa qualidade nutricional (Valle et al., 2004; Valle; Resende, 2014; Macedo et al., 2013). Dentre suas cultivares, Marandu e Piatã figuram entre as mais utilizadas em sistemas de produção pecuária, especialmente nas regiões Centro-Oeste e Norte do Brasil (Verzignassi; Fernandes, 2001; De Sá Medica et al., 2017).

A expansão do cultivo dessas gramíneas foi acompanhada pelo surgimento de importantes problemas fitossanitários (Duarte et al., 2007; Marchi et al., 2011). Dentre eles, a queima-da-folha causada por *Rhizoctonia solani* Kühn AG-1 IA destaca-se por sua ampla distribuição geográfica e pelo potencial de provocar severas perdas na produtividade das pastagens (Kelemu et al., 1995; Valério et al., 2000). Os sintomas caracterizam-se pelo surgimento de lesões necróticas foliares que evoluem rapidamente sob condições de elevada temperatura e umidade, resultando na redução da área fotossintética, diminuição do vigor das plantas e comprometimento da capacidade de suporte animal (Kelemu et al., 1995; Teixeira Neto et al., 2000; Verzignassi; Fernandes, 2001).

Estudos conduzidos em diferentes regiões produtoras demonstraram que *R. solani* AG-1 IA constitui o principal agente etiológico associado à queima-da-folha e à síndrome da morte do capim-marandu em áreas de pastagem tropicais (DUARTE et al., 2007; Ramos-Molina et al., 2016; David et al., 2018). Análises populacionais indicaram elevada diversidade genética do patógeno e ampla adaptação às condições ambientais dos agroecossistemas brasileiros (Chavarro-Mesa et al., 2015; Chavarro-Mesa et al., 2020). Levantamentos conduzidos em áreas de pastagem da Amazônia brasileira demonstraram que *R. solani* AG-1 IA constitui o grupo de anastomose predominante associado à queima-da-folha de *Urochloa brizantha*, reforçando sua importância epidemiológica para os sistemas pecuários tropicais (Chavarro-Mesa et al., 2020).

Evidências filogenéticas sugerem ainda que populações atualmente associadas à braquiária tenham se originado de populações previamente adaptadas

ao arroz (*Oryza sativa*), por meio de um processo relativamente recente de mudança de hospedeiro (*host shift*), seguido de adaptação ao novo ambiente hospedeiro (Chavarro-Mesa et al., 2015; Ramos-Molina et al., 2016). Esse processo evolutivo contribui para explicar a ampla distribuição geográfica do patógeno e sua elevada capacidade de adaptação aos sistemas de produção baseados em gramíneas tropicais.

O manejo da doença apresenta dificuldades consideráveis (Lucon, 2008). A sobrevivência prolongada do patógeno em restos culturais e no solo, associada à elevada capacidade de colonização saprofítica de *R. solani*, limita a eficiência de estratégias convencionais de controle (Ogoshi, 1987; Sneh et al., 1991). Além disso, a aplicação de fungicidas em sistemas extensivos de pastagens apresenta limitações operacionais e econômicas que restringem sua adoção em larga escala, tornando necessária a busca por alternativas sustentáveis de manejo da doença (Bettiol; Morandi, 2009).

Nesse contexto, o controle biológico tem sido considerado uma das estratégias mais promissoras para o manejo de patógenos habitantes do solo e da rizosfera (Cook; Baker, 1983; Lucon, 2008; Bettiol et al., 2012). Diversos microrganismos antagonistas apresentam capacidade de reduzir a sobrevivência, o crescimento ou a atividade patogênica de *R. solani* por meio de mecanismos como competição por recursos, antibiose, hiperparasitismo e indução de resistência na planta hospedeira (Whipps, 2001; Harman et al., 2004). Embora os gêneros *Trichoderma* e *Bacillus* sejam os agentes de controle biológico mais estudados para esse patossistema (Howell, 2003; Lucon, 2008; Bettiol et al., 2012), outros fungos antagonistas apresentam potencial ainda pouco explorado.

Entre esses organismos destaca-se *Laetisaria arvalis* Burdsall, um fungo basidiomiceto amplamente distribuído em ambientes agrícolas e associado à supressão natural de doenças causadas por espécies de *Rhizoctonia* (Burdsall et al., 1980; Odvody et al., 1980). Trabalhos anteriores demonstraram que *L. arvalis* é capaz de reduzir a sobrevivência e a atividade patogênica de *R. solani* em diferentes culturas, incluindo beterraba, algodão, feijoeiro e milho, bem como na supressão de diferentes espécies de *Rhizoctonia* associadas a doenças radiculares e foliares. Esse efeito tem sido atribuído à colonização do substrato, à competição por recursos e à produção de metabólitos antifúngicos, incluindo o ácido laetisárico (Odvody et al.,

1980; Conway, 1986; Bowers et al., 1986; Martin et al., 1986; Sumner; Bell, 1988; Lartey et al., 1991).

Entretanto, informações sobre a atuação de *L. arvalis* no patossistema envolvendo *Urochloa brizantha* e *R. solani* AG-1 IA ainda são escassas. A ocorrência natural desse antagonista em áreas de pastagem afetadas pela queima-da-folha (Chavarro-Mesa et al., 2015) sugere que ele possa integrar comunidades microbianas naturalmente associadas ao agroecossistema da braquiária, apresentando potencial para utilização em programas de manejo integrado da doença. Contudo, sua eficiência em diferentes cultivares de *Urochloa* e em distintos estádios de desenvolvimento da planta hospedeira permanece pouco conhecida.

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de *Laetisaria arvalis* no controle biológico da queima-da-folha causada por *Rhizoctonia solani* AG-1 IA em plantas de *Urochloa brizantha* cvs. Marandu e Piatã, inoculadas em duas idades, aos 30 e 90 dias após a semeadura.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Condições experimentais

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação do Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Ilha Solteira, SP (20°25' S, 51°20' O). Durante o período experimental, a temperatura média foi mantida em $23,5 \pm 2$ °C e a umidade relativa do ar acima de 90% após as inoculações, de forma a favorecer o desenvolvimento da doença.

2.2.2 Isolados fúngicos

Foram utilizados cinco isolados de *Laetisaria arvalis* (La1, La2, La3, La4 e La5), obtidos a partir de folhas de *Urochloa brizantha* cv. Marandu apresentando sintomas típicos de mela-das-folhas, coletadas em áreas de pastagem no município de Paragominas, PA (Chavarro-Mesa et al., 2020). Os isolados foram previamente purificados e preservados em tubos contendo sílica gel como descrito anteriormente (Chavarro-Mesa et al., 2020, mantidos na micoteca do Laboratório de Fitopatologia da UNESP – Campus de Ilha Solteira.

Como agente causal da queima-da-folha foi utilizado o isolado MTUB04E de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA, obtido de plantas de *Urochloa brizantha* cv. Marandu provenientes do município de Paranaíta, MT. A identidade do isolado e sua associação ao grupo de anastomose AG-1 IA haviam sido previamente confirmadas por análises moleculares baseadas na região ITS-rDNA e comparação com sequências de referência descritas para populações do patógeno associadas à braquiária (Chavarro-Mesa et al., 2020).

Os isolados de *L. arvalis* foram multiplicados individualmente em grãos de milho esterilizados, utilizados como veículo para produção do inóculo. O isolado de *R. solani* AG-1 IA foi multiplicado em grãos esterilizados de arroz parboilizado para utilização nos experimentos de inoculação.

A comparação entre isolados individuais não constituiu objetivo deste estudo, que visou avaliar o efeito global de *Laetisaria arvalis* como agente de controle biológico da queima-da-folha causada por *Rhizoctonia solani* AG-1 IA.

2.2.3 Preparo do inóculo

2.2.3.1 *Laetisaria arvalis*

Sementes de milho foram acondicionadas em sacos plásticos de polipropileno com capacidade para 500 mL, contendo 50 g de sementes e 50 mL de água deionizada. Os sacos foram autoclavados a 120 °C por 20 minutos e posteriormente inoculados com discos de meio batata-dextrose-água (BDA) de 5 mm de diâmetro contendo micélio dos isolados de *L. arvalis* com sete dias de crescimento.

Após a inoculação, os sacos foram mantidos em incubadora a 25 °C por 10 a 15 dias para colonização completa do substrato. A viabilidade do inóculo foi verificada visualmente pela intensidade do crescimento micelial sobre as sementes de milho. Para cada aplicação foram distribuídos 10 g de sementes colonizadas por vaso, em cobertura sobre o substrato.

2.2.3.2 *Rhizoctonia solani* AG-1 IA

O inóculo do patógeno foi produzido em grãos de arroz parboilizado previamente autoclavados a 121 °C por 20 minutos. Após o resfriamento, os grãos foram inoculados com discos de BDA contendo micélio de *R. solani* AG-1 IA com sete dias de crescimento e incubados a 25 °C por sete a dez dias.

A inoculação foi realizada mediante deposição de cinco grãos colonizados por vaso na região da bainha foliar das plantas.

2.2.3.3 Tratamentos-controle

Foram utilizados dois tratamentos-controle. O controle negativo (testemunha absoluta) não recebeu aplicação de milho colonizado nem inoculação com o patógeno. O controle de substrato recebeu apenas sementes de milho autoclavadas não colonizadas, permitindo avaliar possíveis efeitos do veículo utilizado para produção do inóculo.

2.2.4 Condução das plantas

Foram semeadas quinze sementes de *Urochloa brizantha* por vaso de polipropileno com capacidade para 2 L, contendo substrato composto por composto organomineral e vermiculita na proporção 2:1 (v:v). Não foi realizado desbaste, permitindo o desenvolvimento natural das touceiras.

Aos 30 dias após a semeadura foi realizada adubação de cobertura com 15 g por vaso de fertilizante NPK 10–10–10.

Foram avaliadas as cultivares Marandu e Piatã. O inóculo de *L. arvalis* foi aplicado ao substrato quinze dias antes da inoculação de *R. solani* AG-1 IA, permitindo o estabelecimento prévio do antagonista. Após a inoculação do patógeno, a irrigação por aspersão foi suspensa, mantendo-se a umidade do substrato quando necessário para evitar estresse hídrico das plantas.

2.2.5 Delineamento experimental e análise estatística

Foram conduzidos dois experimentos independentes em casa de vegetação. No primeiro experimento, os tratamentos foram aplicados em plantas com 30 dias após a semeadura (DAS). O antagonista foi aplicado aos 30 DAS, o patógeno aos 45 DAS e a severidade da doença avaliada aos 60 DAS.

No segundo experimento, os tratamentos foram aplicados em plantas com 90 DAS. O antagonista foi aplicado aos 90 DAS, o patógeno aos 105 DAS e a severidade da doença avaliada aos 120 DAS.

Cada experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamento. Foram avaliados cinco isolados de *Laetisaria arvalis* em duas cultivares de *Urochloa brizantha* (Marandu e Piatã), na presença ou

ausência de inoculação com *Rhizoctonia solani* AG-1 IA, além dos controles positivo, negativo e de substrato.

Cada experimento totalizou 130 unidades experimentais, correspondentes a 26 tratamentos e cinco repetições. Considerando-se os dois experimentos, foram avaliadas 260 unidades experimentais.

Para a análise estatística apresentada neste capítulo, os dados obtidos com os cinco isolados de *L. arvalis* foram agrupados, permitindo avaliar o efeito global do antagonista sobre a severidade da doença. Os tratamentos foram reorganizados em cinco categorias: testemunha sem inoculação, milho esterilizado, *Laetisaria arvalis*, *Rhizoctonia solani* AG-1 IA e *Laetisaria arvalis* + *Rhizoctonia solani* AG-1 IA.

A severidade da doença foi estimada pela porcentagem de área foliar total necrosada (AFTN), determinada por análise digital de imagens utilizando o software Assess 2.0 (APS Press) (Lamari, 2008). As pressuposições de normalidade dos resíduos (teste de Shapiro-Wilk) e homogeneidade de variâncias (teste de Bartlett) foram verificadas previamente à análise de variância, sendo atendidas para os dados avaliados. Os dados foram submetidos à análise de variância em esquema fatorial envolvendo tratamentos, cultivares e épocas de aplicação (30 e 90 DAS). Quando significativo, o efeito dos fatores foi desdobrado pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$) utilizando o programa SISVAR (Ferreira, 2019).

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A porcentagem de área foliar total necrosada (AFTN%) foi significativamente influenciada pelos tratamentos, cultivares e idades das plantas no momento da aplicação dos tratamentos (Tabela 6). Foram observados efeitos altamente significativos dos fatores tratamento ($p < 0,01$), cultivar ($p < 0,01$) e idade da planta ($p < 0,01$). As interações tratamento $\times$ cultivar e tratamento $\times$ idade da planta também foram significativas, indicando que a resposta ao controle biológico variou em função do genótipo da hospedeira e do estágio de desenvolvimento das plantas.

Tabela 6 – Análise de variância para a severidade da queima-da-folha, expressa como porcentagem de área foliar total necrosada (AFTN%), em braquiária (*Urochloa brizantha*) sob efeito de tratamentos com *Laetisaria arvalis*, cultivares e épocas de aplicação.

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrados (SQ)	Quadrados Médios (QM)	F calculado	p
Tratamento (T)	4	24.837,58	6.209,39	322,32	0,00**
Cultivar (C)	1	158,85	158,85	8,246	0,00**
Época (E)	1	1.830,99	1.830,99	95,04	0,00**
Cultivar x Época	1	19,03	19,03	0,98	0,32 (ns)
Tratamento x Cultivar	4	317,77	79,44	4,12	0,00**
Tratamento x Época	4	2.070,58	517,64	26,87	0,00**
Tratamento x Cultivar x Época	4	33,1	8,27	0,43	0,78 (ns)
Erro	240	4.623,47	19,26		
Total	259	33.891,40			
CV (%)		45,22			

Fonte: elaborado pelo próprio autor

Nota: GL = Graus de liberdade; ** = significativo a 1% de probabilidade pelo teste F; (ns) = não significativo.

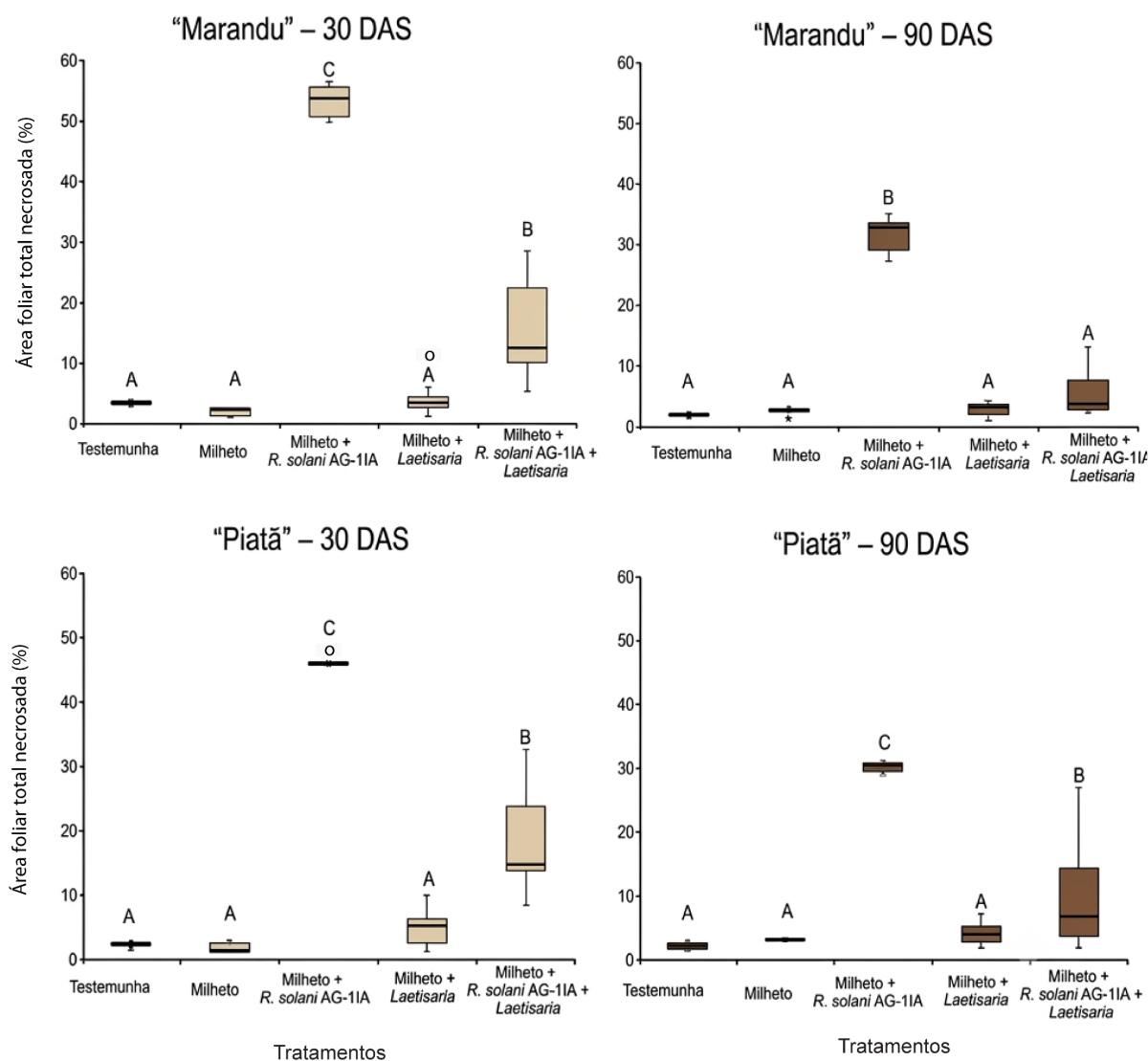
Em contrapartida, a interação cultivar × idade da planta não foi significativa ($p = 0,32$), assim como a interação tripla tratamento × cultivar × idade da planta ($p = 0,78$), demonstrando que os efeitos relativos dos tratamentos foram consistentes entre as cultivares avaliadas.

Quando considerados todos os tratamentos, a cultivar Marandu apresentou menor severidade média da doença (8,92%) do que a cultivar Piatã (10,48%). De forma semelhante, plantas tratadas aos 90 dias após a semeadura (DAS) apresentaram menor severidade média (7,05%) do que aquelas tratadas aos 30 DAS (12,36%), evidenciando influência do estágio de desenvolvimento da planta sobre a intensidade da doença (Figura 11, Tabela 7).

Os maiores valores de AFTN foram observados nos tratamentos inoculados apenas com *Rhizoctonia solani* AG-1 IA, confirmando a elevada agressividade do isolado MTUB04E (Figura 11, Tabela 7). Na cultivar Marandu, a severidade atingiu 30,18% e 31,66% em plantas tratadas aos 30 e 90 DAS, respectivamente. Na cultivar Piatã, os valores foram ainda mais elevados, alcançando 46,40% e 53,43%.

A aplicação prévia de *Laetisaria arvalis* reduziu significativamente a severidade da doença em ambas as cultivares e idades das plantas.

Figura 11 – Severidade da queima-da-folha [área foliar total necrosada (%)] em plantas de *Urochloa brizantha* cultivares "Marandu" e "Piatã" inoculadas com *Rhizoctonia solani* AG-1 IA e tratadas com o antagonista *Laetisaria arvalis*.



Fonte: elaborado pelo próprio autor

Nota: Os boxplots representam a distribuição dos valores observados em cada tratamento. Para os tratamentos contendo *Laetisaria arvalis*, os dados correspondem ao conjunto dos cinco isolados avaliados. O preenchimento em marrom claro representa as plantas aos 30 dias após a semeadura (DAS) e o marrom escuro representa as plantas aos 90 DAS. Letras iguais indicam ausência de diferença significativa pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Tabela 7 – Desdobramento das interações entre tratamentos, cultivares e épocas de aplicação na severidade da queima-da-folha, expressa como porcentagem de área foliar total necrosada (AFTN%), em plantas de braquiária (*Urochloa brizantha*) inoculadas com *Rhizoctonia solani* AG-1 IA e tratadas com o antagonista *Laetisaria arvalis*.

Tratamentos	"Marandu"		"Piatã"	
	30 DAS	90 DAS	30 DAS	90 DAS
Testemunha	2,25 aA	1,86 aA	2,36 aA	3,36 aA
Milheto	3,09 aA	2,48 aA	1,88 aA	1,94 aA
Milheto + <i>R. solani</i> AG-1 IA	30,18 cA	31,66 bA	46,40 cB	53,43 cB
Milheto + <i>Laetisaria</i>	4,15 aA	2,98 aA	5,07 aA	3,88 aA
Milheto + <i>R. solani</i> AG-1 IA + <i>Laetisaria</i>	9,81 bA	5,41 aA	18,26 bB	15,16 bB

Fonte: elaborado pelo próprio autor

Nota: DAS = Dias após a semeadura; médias seguidas pela mesma letra, minúsculas nas colunas (comparando tratamentos dentro da mesma cultivar/época) e maiúsculas nas linhas (comparando o mesmo tratamento entre diferentes cultivares/épocas), não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5%.

Na cultivar Marandu, a severidade foi reduzida de 30,18% para 9,81% em plantas tratadas aos 30 DAS e de 31,66% para 5,41% em plantas tratadas aos 90 DAS, correspondendo a reduções de 67,5% e 82,9%, respectivamente. Na cultivar Piatã, as reduções foram de 60,6% e 71,6%, com a severidade diminuindo de 46,40% para 18,26% aos 30 DAS e de 53,43% para 15,16% aos 90 DAS.

Esses resultados evidenciam o elevado potencial de *L. arvalis* como agente de controle biológico da queima-da-folha da braquiária. Particularmente na cultivar Marandu tratada aos 90 DAS, a severidade observada após aplicação do antagonista (5,41%) não diferiu estatisticamente daquela registrada na testemunha não inoculada (1,86%), demonstrando elevada eficiência de supressão da doença (Figura 11; Tabela 7).

As diferenças observadas entre as idades das plantas sugerem que o estágio de desenvolvimento da hospedeira influencia a eficiência do biocontrole. De modo geral, plantas tratadas aos 90 DAS apresentaram menor severidade da doença e responderam mais favoravelmente à aplicação do antagonista. Esse comportamento pode estar associado ao maior desenvolvimento estrutural dos tecidos vegetais, ao acúmulo de compostos relacionados à defesa e à maior capacidade de estabelecimento prévio de *L. arvalis* antes da inoculação do patógeno (Pascholati; Leite, 1995; Brito et al., 2003).

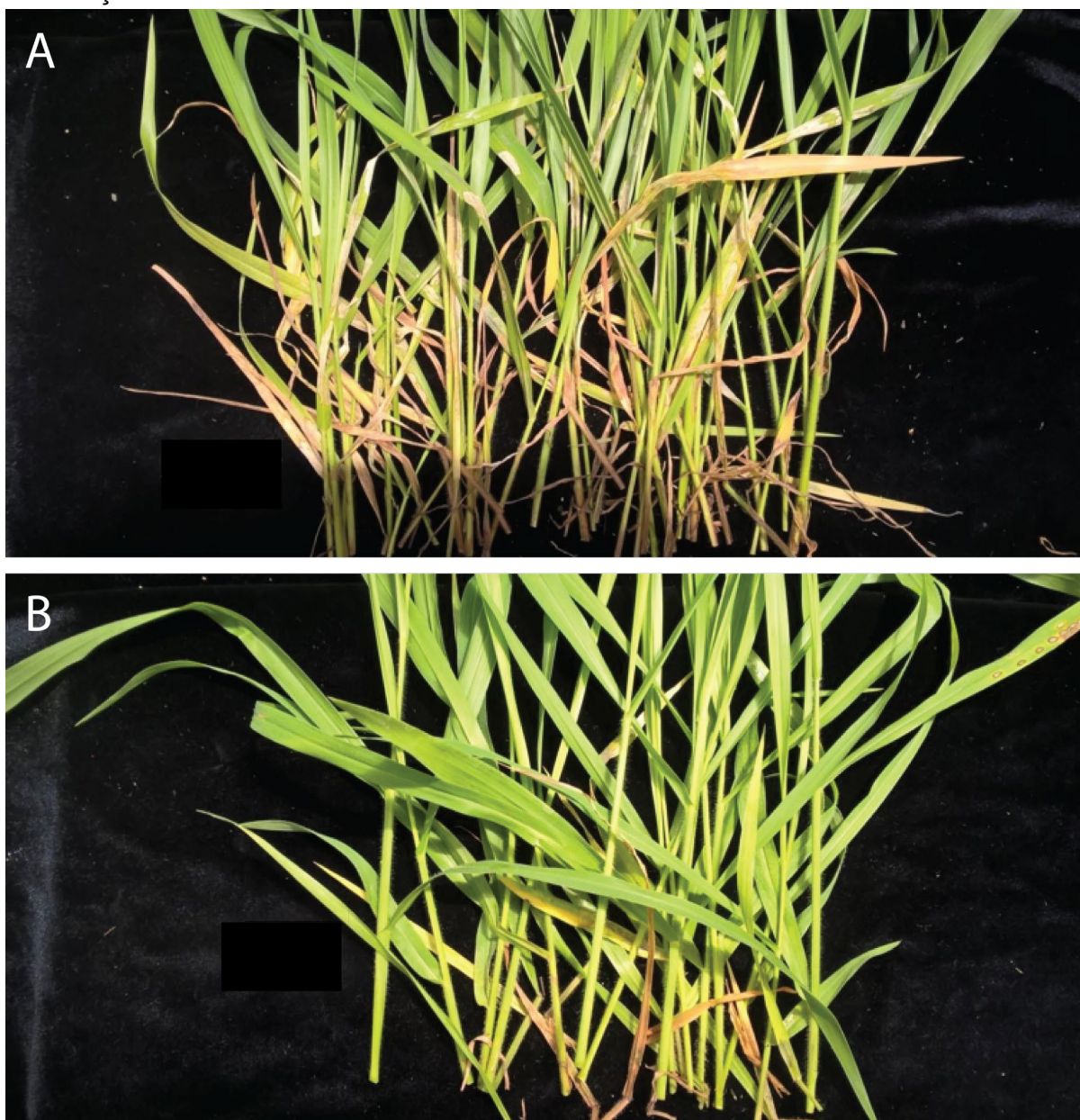
O efeito visual do tratamento biológico foi evidente (Figura 12). Plantas inoculadas apenas com *R. solani* AG-1 IA apresentaram extensa necrose foliar, redução da área fotossintética e sintomas típicos da queima-da-folha. Em contraste, plantas previamente tratadas com *L. arvalis* apresentaram menor intensidade de sintomas, preservação da área foliar verde e redução expressiva da progressão das lesões.

Os resultados obtidos neste estudo corroboram observações anteriores envolvendo *Laetisaria arvalis* como antagonista de espécies de *Rhizoctonia*. Odvody et al. (1980) demonstraram redução da sobrevivência saprofítica de *R. solani* em solos tratados com esse fungo, enquanto Larthey et al. (1991) verificaram redução significativa do tombamento causado por *R. solani* em algodoeiro. Lewis e Papavizas (1992) observaram que a eficácia do controle estava diretamente associada ao estabelecimento prévio do antagonista no solo, resultado consistente com a maior eficiência observada neste estudo quando o antagonista foi aplicado antes da inoculação do patógeno.

A maior severidade observada na cultivar Piatã contrasta com resultados de alguns estudos anteriores que reportaram maior tolerância desse material à queima-da-folha (Verzignassi; Fernandes, 2001). Os resultados obtidos neste estudo sugerem que a interação entre o isolado MTUB04E de *R. solani* AG-1 IA e as cultivares avaliadas difere daquela observada em outros trabalhos. Considerando a elevada diversidade genética descrita para populações brasileiras do patógeno (Chavarro-Mesa et al., 2015; Ramos-Molina et al., 2016), diferenças de agressividade entre isolados podem contribuir para explicar essas divergências.

Os mecanismos responsáveis pela supressão da doença não foram investigados diretamente neste trabalho. Entretanto, estudos anteriores indicam que *L. arvalis* atua por meio de hiperparasitismo, competição por recursos e produção de metabólitos antifúngicos, incluindo o ácido laetisárico (Bowers et al., 1986; Lewis; Papavizas, 1992; Bobba; Conway, 2003). A aplicação do antagonista quinze dias antes da inoculação do patógeno provavelmente favoreceu seu estabelecimento sobre o substrato e os tecidos vegetais, ampliando sua capacidade de interferir no processo infeccioso. Estudos realizados em outras culturas demonstraram que o tempo de estabelecimento do antagonista é um fator determinante para o sucesso do controle biológico (Allen et al., 1985; Martin et al., 1986).

Figura 12 – Aspecto visual de touceiras de *Urochloa brizantha* cv. "Marandu" aos 30 dias após a inoculação, demonstrando o efeito do tratamento biológico na redução da severidade da doença.



Fonte: elaborado pelo próprio autor

Nota: (A) Planta inoculada apenas com *Rhizoctonia solani* AG-1 IA, evidenciando sintomas severos de necrose e queima foliar. (B) Planta tratada com a combinação de milheto + *R. solani* AG-1 IA + *Laetisaria*, apresentando visível preservação da área foliar verde e controle da evolução das lesões.

A ocorrência natural de *L. arvalis* em áreas de pastagem afetadas pela queima-da-folha sugere ainda que esse antagonista possa participar de processos naturais de supressividade do solo e da filosfera, hipótese que merece investigação em estudos futuros.

Considerando a elevada importância econômica da queima-da-folha da braquiária e as limitações do controle químico em sistemas extensivos de produção

animal (Lucon, 2008; Bettiol; Morandi, 2009), *Laetisaria arvalis* apresenta potencial para integração em programas de manejo da doença. Conforme destacado por David et al. (2018), o manejo de doenças causadas por *Rhizoctonia* no agroecossistema brasileiro requer estratégias sustentáveis, dado o comportamento necrotrófico do patógeno e sua capacidade de sobrevivência no solo por longos períodos. Estudos futuros em condições de campo deverão avaliar a persistência do antagonista no ambiente, sua compatibilidade com outras práticas de manejo e o desenvolvimento de formulações adequadas para utilização em larga escala.

2.4 CONCLUSÃO

Laetisaria arvalis reduziu significativamente a severidade da queima-da-folha causada por *Rhizoctonia solani* AG-1 IA em *Urochloa brizantha*. O efeito foi observado em ambas as cultivares avaliadas (Marandu e Piatã), com reduções de severidade variando de 60,6% a 82,9%, dependendo da cultivar e da idade das plantas no momento da aplicação dos tratamentos.

A eficiência do controle biológico foi maior em plantas tratadas aos 90 dias após a semeadura, evidenciando que o estágio de desenvolvimento da hospedeira influencia a resposta ao antagonista. Na cultivar Marandu tratada aos 90 DAS, a severidade observada após aplicação de *L. arvalis* não diferiu estatisticamente daquela registrada na testemunha não inoculada, demonstrando elevado potencial de supressão da doença.

Laetisaria arvalis apresenta potencial para utilização como componente de programas de manejo integrado da queima-da-folha em pastagens tropicais. Estudos adicionais em condições de campo são necessários para validar sua eficiência sob condições naturais e para subsidiar o desenvolvimento de estratégias de aplicação e formulações adequadas para uso em larga escala.

REFERÊNCIAS

- ALLEN, M. F. et al. Population dynamics of sugar beets, *Rhizoctonia solani*, and *Laetisaria arvalis*: responses of a host, plant pathogen, and hyperparasite to perturbation in the field. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 50, n. 5, p. 1123-1127, 1985.
- BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. Controle biológico de doenças de plantas no Brasil. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Org.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. cap. 1, p. 7-14.
- BETTIOL, W. et al. **Produtos comerciais à base de agentes de biocontrole de doenças de plantas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2012. 155 p.
- BOBBA, V.; CONWAY, K. E. Competitive saprophytic ability of *Laetisaria arvalis* compared with *Sclerotium rolfsii*. **Proceedings of the Oklahoma Academy of Science**, Stillwater, v. 83, p. 17-22, 2003.
- BOWERS, W. S. et al. Thallophytic allelopathy: isolation and identification of laetisarinic acid. **Science**, Washington, v. 232, n. 4746, p. 105-107, 1986.
- BRITO, C. J. F. A. et al. Perfil químico da parede e suas implicações na digestibilidade de *Brachiaria brizantha* e *Brachiaria humidicola*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 32, n. 6, p. 1835-1844, 2003.
- BURDSALL, J. R. et al. *Laetisaria arvalis* (Aphyllophorales, Corticiaceae): a possible biological control agent for *Rhizoctonia solani* and *Pythium* species. **Mycologia**, New York, v. 72, n. 4, p. 728-736, 1980.
- CHAVARRO-MESA, E. et al. The *Urochloa* foliar blight and collar rot pathogen *Rhizoctonia solani* AG-1 IA emerged in South America via a host shift from rice. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 105, n. 4, p. 452-462, 2015.
- CHAVARRO-MESA, E. et al. A broad diversity survey of *Rhizoctonia* species from the Brazilian Amazon reveals the prevalence of *R. solani* AG-1 IA on signal grass and the new record of AG-1 IF on cowpea and soybeans. **Plant Pathology**, v. 69, n. 3, p. 455-466, 2020.
- CONWAY, K. E. Use of fluid-drilling gels to deliver biological control agents to soil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 70, n. 9, p. 835-839, 1986.
- COOK, R. J.; BAKER, K. F. **The nature and practice of biological control of plant pathogens**. St. Paul: American Phytopathological Society, 1983. 539 p.
- DAVID, G. Q.; CHAVARRO-MESA, E.; SCHURT, D. A.; CERESINI, P. C. *Rhizoctonia* como fitopatógeno no agroecossistema brasileiro. In: LOPES, U. P.; MICHEREFF, S. J. (Ed.). **Desafios do manejo de doenças radiculares causadas por fungos**. Recife: EDUFRPE, 2018. p. 46-67.

DE SÁ MEDICA, J. A.; REIS, N. S.; SANTOS, M. E. R. Caracterização morfológica em pastos de capim-marandu submetidos a frequências de desfolhação e níveis de adubação. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 18, p. 1-13, 2017.

DIAS-FILHO, M. B. **Degradação de pastagens: processos, causas e estratégias de recuperação**. 5. ed. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2017. 38 p.

DUARTE, M. L. R. et al. Etiologia da podridão do coleto de *Brachiaria brizantha* em pastagens da Amazônia. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 3, p. 261-265, 2007.

FERRAZ, J. B. S.; FELÍCIO, P. E. Produção de bovinos de corte no Brasil: desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 39, supl. especial, p. 387-394, 2010.

FERREIRA, D. F. SISVAR: a computer analysis system to fixed effects split plot type designs. **Revista Brasileira de Biometria**, Jaboticabal, v. 37, n. 4, p. 529-535, 2019.

HARMAN, G. E. et al. *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 2, p. 43-56, 2004.

HOWELL, C. R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 87, n. 1, p. 4-10, 2003.

KELEMU, S. et al. Sources of resistance in species of *Brachiaria* to foliar blight disease caused by *Rhizoctonia solani*. **Tropical Grasslands**, St. Lucia, v. 29, n. 4, p. 257-262, 1995.

LAMARI, L. **ASSESS: image analysis software for plant disease quantification**. St. Paul: American Phytopathological Society, 2008. 1 CD-ROM.

LARTEY, R. T. et al. Control of *Rhizoctonia solani* and cotton seedling disease by *Laetisaria arvalis* and a mycophagous insect *Proisotoma minuta* (Collembola). **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 133, n. 2, p. 89-98, 1991.

LEWIS, J. A.; PAPAIVIZAS, G. C. Potential of *Laetisaria arvalis* for the biocontrol of *Rhizoctonia solani*. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 24, n. 11, p. 1075-1079, 1992.

LUCON, C. M. M. *Trichoderma* no controle de doenças de plantas causadas por patógenos de solo. **O Biológico**, São Paulo, v. 70, n. 2, p. 3-9, 2008.

MACEDO, M. C. M. et al. Degradação de pastagens, alternativas de recuperação e renovação, e formas de mitigação. In: ENCONTRO DE ADUBAÇÃO DE PASTAGENS DA SCOT CONSULTORIA – TEC-FÉRTIL, 1., 2013, Ribeirão Preto. Anais... Bebedouro: Scot Consultoria, 2013. p. 158-181.

MARCHI, C. E.; FERNANDES, C. D.; VERZIGNASSI, J. R. **Doenças em plantas forrageiras**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2011. 54 p.

MARTIN, S. B.; ABAWI, G. S.; HOCH, H. C. The relation of population densities of the antagonist, *Laetisaria arvalis*, to seedling diseases of table beet incited by *Pythium ultimum*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 32, p. 156-159, 1986.

ODVODY, G. N.; BOOSALIS, M. G.; KERR, E. D. Biological control of *Rhizoctonia solani* with a soil-inhabiting basidiomycete. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 70, n. 7, p. 655-658, 1980.

OGOSHI, A. Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraspecific groups of *Rhizoctonia solani* Kühn. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 25, n. 1, p. 125-143, 1987.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMINI-FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 1, p. 417-453.

RAMOS-MOLINA, L. M. et al. *Rhizoctonia solani* AG-1 IA infects both rice and signalgrass in the Colombian Llanos. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 46, n. 1, p. 65-71, 2016.

SNEH, B.; BURPEE, L.; OGOSHI, A. **Identification of *Rhizoctonia* species**. St. Paul: American Phytopathological Society, 1991. 133 p.

SOUZA, O. C. et al. **Diagnóstico de morte de pastagens de *Brachiaria brizantha* nas regiões de Araguaína, TO e Redenção, PA**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2000. 11 p.

SUMNER, D. R.; BELL, D. K. Antagonism of binucleate *Rhizoctonia*-like fungi and other basidiomycetes to *Rhizoctonia solani* AG-4 and AG-2 type 2. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 78, n. 5, p. 629, 1988.

TEIXEIRA NETO, J. F. et al. **Prováveis causas da morte do capim braquiarião (*Brachiaria brizantha* cv. Marandu) na Amazônia Oriental**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2000. 36 p. (Documentos, 36).

VALÉRIO, J. R. et al. **Diagnóstico de morte de pastagens nas regiões central e norte do Estado de Mato Grosso**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2000. 10 p. (Documentos, 98).

VALLE, C. B. et al. Tropical forage breeding in Embrapa: current situation and prospects. In: SUENAGA, K.; OSHIBE, A.; TANIGUSHI, T. (Ed.). **Development of sustainable agro-pastoral systems in the subtropical zone of Brazil**. Tsukuba: Japan International Researcher Center for Agricultural Sciences, 2004. p. 61-65. (Working Report, 36).

VALLE, C. B.; RESENDE, R. M. S. **Melhoramento genético de *Brachiaria* (syn. *Urochloa*)**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2014. 52 p. (Documentos, 203).

VERZIGNASSI, J. R.; FERNANDES, C. D. **Doenças em forrageiras**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2001. 4 p. (Boletim de Divulgação Técnica Online, 50).

WHIPPS, J. M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, suppl. 1, p. 487-511, 2001.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A queima-da-folha da braquiária causada por *Rhizoctonia solani* AG-1 IA é doença limitante à sustentabilidade de pastagens tropicais, demandando alternativas de manejo compatíveis com a realidade dos sistemas pecuários extensivos. Nesse contexto, a biodiversidade microbiana dos biomas Amazônia e Cerrado constitui uma valiosa fonte de agentes de controle biológico com potencial para contribuir para o manejo sustentável dessa doença.

A prospecção realizada neste estudo permitiu identificar uma diversidade de microrganismos antagonistas de diferentes grupos taxonômicos, incluindo bactérias do complexo *Bacillus cereus* sensu lato, fungos do gênero *Trichoderma* e o basidiomiceto *Laetisaria arvalis*. A capacidade desses microrganismos de reduzir a severidade da doença e promover o crescimento das plantas demonstra que podem atuar de forma complementar no manejo de *R. solani* AG-1 IA.

Trichoderma destacou-se pela elevada capacidade de supressão da severidade da doença quando aplicado via foliar, enquanto o tratamento de sementes com isolados de *Bacillus* ou *Trichoderma* favoreceu o desenvolvimento radicular das plantas. Da mesma forma, *Laetisaria arvalis* foi eficaz na redução da severidade da doença, ampliando o conjunto de agentes de biocontrole com potencial de utilização em pastagens tropicais e reforçando a importância da exploração de grupos microbianos ainda pouco estudados.

A utilização de agentes de controle biológico adaptados às condições tropicais apresenta particular relevância para sistemas pecuários extensivos. As limitações operacionais e econômicas associadas ao controle químico em grandes áreas de pastagem, somadas à elevada capacidade de sobrevivência do patógeno no solo e às preocupações relacionadas aos impactos ambientais, reforçam a necessidade de estratégias fundamentadas em processos biológicos naturais e ambientalmente sustentáveis.

Os microrganismos antagonistas identificados neste estudo possuem potencial para integrar programas de manejo da queima-da-folha da braquiária, contribuindo para a redução das perdas produtivas, para a manutenção da funcionalidade das pastagens e para o desenvolvimento de sistemas pecuários mais sustentáveis. A validação dos isolados de elite em condições de campo e o desenvolvimento de formulações adequadas constituem os próximos passos para transformar esse potencial biológico em tecnologias aplicáveis ao setor produtivo.