



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS FLORIANÓPOLIS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Luiza Braulina Conceição

**POTENCIAL DE BACTÉRIAS ASSOCIATIVAS DE PLANTAS NO CONTROLE
BIOLÓGICO DE *RHIZOCTONIA SOLANI* NA CULTURA DA SOJA (*Glycine max* L)**

Florianópolis

2023

Luiza Braulina Conceição

POTENCIAL DE BACTÉRIAS ASSOCIATIVAS DE PLANTAS NO CONTROLE BIOLÓGICO DE *RHIZOCTONIA SOLANI* NA CULTURA DA SOJA (*Glycine max* L)

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao curso de Ciências Biológicas do Campus de Florianópolis da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Licenciado(a) em Ciências Biológicas.

Orientador(a): Dr.(a) Anabel Hernández González
Coorientador(a): Dr.(a) Emanuela Pille da Silva

Florianópolis

2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Braulina Conceição, Luiza
POTENCIAL DE BACTÉRIAS ASSOCIATIVAS DE PLANTAS NO
CONTROLE BIOLÓGICO DE RHIZOCTONIA SOLANI NA CULTURA DA SOJA
(Glycine max L) / Luiza Braulina Conceição ; orientadora,
Anabel Hernández González, coorientador, Emanuela Pille
da Silva, 2023.
42 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas, Florianópolis,
2023.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. agentes de biocontrole. 3.
microrganismos promotores do crescimento de plantas. 4.
fitopatógenos. 5. cultura agrícola . I. Hernández González,
Anabel . II. Pille da Silva, Emanuela . III. Universidade
Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas.
IV. Título.

Luiza Braulina Conceição

POTENCIAL DE BACTÉRIAS ASSOCIATIVAS DE PLANTAS NO CONTROLE BIOLÓGICO DE *RHIZOCTONIA SOLANI* NA CULTURA DA SOJA (*Glycine max* L)

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de Licenciado e aprovado em sua forma final pelo Curso de Ciências Biológicas.

Florianópolis, 05 de Novembro de 2023.

Daniela Cristina De Toni

Banca examinadora

Dr.(a) Anabel González Hernández
Orientador(a)

Ma. Emanuelli Marchioro
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Dr.(a) Dayana Montero Rodríguez
Universidade Católica de Pernambuco (Unicap)

Florianópolis, 2023

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a minha mãe e irmãs, que sempre acreditaram em mim e me apoiaram nas minhas escolhas. Agradeço imensamente ao Alexandre por todo companheirismo, paciência e afeto durante toda nossa união, pelo cuidado e amor que escolhemos compartilhar. Ao meu filho Luiz Alexandre por sua vida feliz, e por ser um rapaz tão maravilhoso e parte da minha inspiração. Amo muito vocês.

Agradeço com muito carinho aos amigos que conquistei durante a graduação. À todos que me incentivaram e me motivaram para continuar. Ao pessoal do laboratório, em especial a minha orientadora Anabel e a co-orientadora Emanuela por todo aprendizado e acolhimento. A todos os professores que influenciaram positivamente a minha trajetória e a de outros estudantes, e principalmente agradeço por contribuírem para meu crescimento pessoal e profissional.

Agradeço também a UFSC pela oportunidade de formação, pelos espaços e experiências, pelas bolsas que pude ter acesso durante a graduação, à todos os funcionários que com seus esforços diários permitem que a universidade funcione.

Obrigada a todos que direta ou indiretamente estão envolvidos nesta história. Vocês foram muito importantes para mim e estarão para sempre na minha memória.

RESUMO

As bactérias associativas de plantas, conhecidas como rizosféricas e endofíticas, influenciam no desenvolvimento, na nutrição e na saúde das plantas. Por habitarem a rizosfera e o interior do tecido vegetal apresentam grande potencial de emprego na nutrição de plantas e redução do uso de defensivos químicos, apresentando-se como uma alternativa sustentável para a agricultura. Nas últimas décadas tem sido crescente o interesse na identificação, caracterização e realização de ensaios para a seleção de potenciais microrganismos que atuam no controle biológico de pragas e doenças de culturas de importância econômica. Deste modo, o objetivo do presente projeto foi caracterizar bactérias associativas pertencentes ao banco de estirpes de microrganismos do Laboratório de Microrganismos e Processos Biotecnológicos da Universidade Federal de Santa Catarina (LAMPB-UFSC) quanto ao potencial uso no controle biológico do fitopatógeno *Rhizoctonia solani* em condições *in vitro*. Inicialmente foi realizado um *screening* para determinar o potencial de antagonismo de dez isolados de bactérias na inibição do crescimento de *R. solani* em meio de cultura Agar Batata Dextrose (BDA), método de cultivo *Dual*. Os isolados bacterianos mais promissores foram selecionados para realização dos ensaios de enfrentamento do fitopatógeno via inoculação de sementes de soja utilizando diferentes dosagens (0,5, 1,0 e 2 mL kg semente⁻¹). O isolado mais promissor foi submetido à identificação molecular, por meio do sequenciamento do gene 16S rRNA e caracterizado quanto a produção de substâncias promotoras do crescimento vegetal *in vitro* (produção da enzima ACC deaminase (1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico), quantificação de ácido indol acético-AIA, produção das enzimas celulase e quitinase). No método de cultivo *Dual*, o isolado UFSC-BS destacou-se quanto a redução do crescimento do patógeno, apresentando porcentagem de inibição superior a 50%, enquanto as estirpes de *Pseudomonas* sp. (UFSC-A605) e de *Bacillus* sp. (UFSC-1S3 e UFSC-4P3) apresentaram eficiência intermediária no controle (32 a 36%). Dentre estes isolados, o UFSC-BS também se destacou nos testes de antagonismo via inoculação de sementes, pois apresentou porcentagem de inibição do patógeno *R. solani* superior a 50% nas três doses avaliadas (0,5; 1,0; 2,0 mL kg sementes⁻¹). O isolado UFSC-BS foi identificado como *Bacillus* sp e apresentou resultado positivo para produção de celulase e negativo para quitinase e ACC deaminase, enquanto a produção de AIA foi de 3,43 µg mL⁻¹. Conclui-se que o isolado UFSC-BS (*Bacillus* sp) apresenta potencial de controle do fitopatógeno *R. solani* em condições *in vitro*. Desta forma recomenda-se a realização de estudos posteriores para determinação da capacidade de controle de outros fitopatógenos, inclusive em condições não controladas.

Palavras-chave: agentes de biocontrole; microrganismos promotores do crescimento de plantas; fitopatógenos.

ABSTRACT

Plant-associative bacteria, known as rhizospheric and endophytic, influence the development, nutrition and health of plants. Because they inhabit the rhizosphere and interior of plant tissue, they have great potential for use in plant nutrition and reducing the use of chemical pesticides, presenting themselves as a sustainable alternative for agriculture. In recent decades, there has been growing interest in identifying, characterizing and carrying out tests to select potential microorganisms that act in the biological control of pests and diseases of crops of economic importance. Therefore, the objective of the present project was to characterize associative bacteria belonging to the bank of microorganism strains of the Laboratory of Microorganisms and Biotechnological Processes of the Federal University of Santa Catarina (LAMPB-UFSC) regarding their potential use in the biological control of the phytopathogen *Rhizoctonia solani* under conditions in vitro. Initially, screening was carried out to determine the antagonism potential of ten isolates of bacteria in inhibiting the growth of *R. solani* in Potato Dextrose Agar (BDA) culture medium, Dual cultivation method. The most promising bacterial isolates were selected to carry out tests to combat the phytopathogen via inoculation of soybean seeds using different dosages (0.5, 1.0 and 2 mL kg seed⁻¹). The most promising isolate was subjected to molecular identification, through sequencing of the 16S rRNA gene and characterized for the production of substances that promote plant growth in vitro (production of the ACC deaminase enzyme (1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico), quantification of indole acetic acid-IAA, production of cellulase enzymes and chitinase). In the Dual cultivation method, the UFSC-BS isolate stood out in terms of reducing pathogen growth, showing an inhibition percentage greater than 50%, while the *Pseudomonas sp.* (UFSC-A605) and *Bacillus sp.* (UFSC-1S3 and UFSC-4P3) showed intermediate control efficiency (32 to 36%). Among these isolates, UFSC-BS also stood out in the antagonism tests via seed inoculation, as it presented a percentage of inhibition of the pathogen *R. solani* greater than 50% in the three doses evaluated (0.5; 1.0; 2.0 mL kg seeds⁻¹). The UFSC-BS isolate was identified as *Bacillus sp.* and presented a positive result for cellulase production and negative for chitinase and ACC deaminase, while IAA production was 3.43 µg mL⁻¹. It is concluded that the UFSC-BS isolate (*Bacillus sp.*) has the potential to control the phytopathogen *R. solani* under in vitro conditions. Therefore, it is recommended that further studies be carried out to determine the ability to control other phytopathogens, including in uncontrolled conditions.

Keywords: biocontrol agents; plant growth promoting microorganisms; phytopathogens.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Isolados de bactérias associativas em placas demonstrando a inibição do crescimento micelial do patógeno Rhizoctonia solani pelo método dual. (A) Fitopatógeno Rhizoctonia s, (B) isolado UFSC-20S3, (C) isolado UFSC-BS. 30

Figura 2 – (A)- Relação entre as bactérias associativas e a porcentagem de inibição nas diferentes concentrações (0,5, 1,0 e 2,0 mL/Kg de semente) comparadas ao controle positivo. (B)- Placas contendo sementes de soja inoculadas diferentes doses dos isolados avaliados (0,5, 1,0 e 2,0 mL kg sementes⁻¹) em enfrentamento com o fitopatógeno R. solani. 32

Figura 3 – (A)- Ensaio qualitativo para detecção da enzima celulase. Crescimento dos microrganismos em meio com adição de carboximetilcelulose como única fonte de C. Após sete dias de incubação foi realizada a adição do corante vermelho congo e NaCl ao meio para revelação da produção da enzima celulase in vitro. (B)- Ensaio qualitativos para detecção da enzima quitinase. Crescimento dos microrganismos em meio M9 + Chitin Azure após 14 dias de incubação. Degradação do corante indicaria resultado positivo para a produção de quitinase. (C)- Representação da produção de ácido indol acético por Bacillus sp (UFSC-BS) em meio de cultura contendo Triptofano (Trp) como indutor. 35

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Bactérias endofíticas provenientes do banco de microrganismos do LAMPB-UFSC empregadas nos testes de antagonismo contra o fitopatógeno Rhizoctonia solani.

LISTA DE TABELAS

*Tabela 1 – Efeito de isolados de bactérias endofíticas no percentual de inibição do crescimento micelial do patógeno *Rhizoctonia solani* pelo método dual. 30*

*Tabela 2 –Produção in vitro de substâncias promotoras do crescimento de plantas por *Bacillus sp* (UFSC-BS). 31*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	16
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1	CULTURA DA SOJA NO BRASIL	18
2.2	RHIZOCTONIA SOLANI NO CULTIVO DA SOJA.....	19
2.3	MICRORGANISMOS ASSOCIATIVOS DE PLANTAS.....	21
2.4	MICRORGANISMOS ASSOCIATIVOS DE PLANTAS COMO AGENTES DE BIOCONTROLE.....	22
3	HIPÓTESE.....	23
4	OBJETIVO GERAL.....	23
4.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
5	MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
5.1	OBTENÇÃO DOS ISOLADOS.....	24
5.2	SELEÇÃO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTAGÔNICO DAS BACTÉRIAS ASSOCIATIVAS IN VITRO.....	25
5.2.1	Ativação e teste inicial com bactérias com potencial antagonista.....	25
5.2.2	Seleção de bactérias com potencial antagonista via inoculação em semente de soja.....	26
5.2.3	Avaliação do potencial de antagonismo.....	26
5.3	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	27
5.4	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DO ISOLADO DE INTERESSE	27
5.4.1	Identificação do isolado por sequenciamento do gene rRNA 16S.....	27
5.5	AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE PROMOTORA DO CRESCIMENTO DE PLANTAS IN VITRO.....	28
5.5.1	Quantificação da produção de ácido indol acético (AIA).....	28
5.5.2	Quantificação da atividade enzimática da 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico (ACC) deaminase.....	29
5.5.3	Avaliação qualitativa da produção de enzimas hidrolíticas.....	29
5.5.3.1	<i>Produção de celulase.....</i>	<i>29</i>
5.5.3.2	<i>Produção de quitinase.....</i>	<i>30</i>
6	RESULTADOS.....	30
6.1	TESTE INICIAL COM BACTÉRIAS COM POTENCIAL ANTAGONISTA IN VITRO.....	30
6.2	SELEÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS COM POTENCIAL ANTAGONISTA EM SEMENTES DE SOJA.....	31
6.3	CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE PROMOTORA DO CRESCIMENTO DE PLANTAS.....	33

7	DISCUSSÃO.....	34
8	CONCLUSÃO.....	36
	REFERÊNCIAS	

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A agricultura é indiscutivelmente uma das atividades econômicas mais importantes de todo o mundo e as práticas de manejo adotadas impactam diretamente a qualidade ambiental. O uso intensivo de agrotóxicos e fertilizantes químicos acaba por poluir solos, rios e oceanos, contribuindo para o desequilíbrio ecológico, evidenciando assim, a necessidade de estabelecer estratégias mais sustentáveis e que causem menor impacto ao meio ambiente (EMBRAPA, 2020). Ao longo do último século, pesquisas demonstraram que bactérias e fungos são capazes de beneficiar as plantas simbiotes por meio de diferentes mecanismos, como promoção de biomassa, maior resistência a condições de estresse biótico e abiótico, bem como pelo estabelecimento de relações antagônicas como antibiose, competição, parasitismo, predação e indução de resistência em plantas contra patógenos e parasitas (WHIPPS, 2001), resultando assim em sistemas mais produtivos e sustentáveis.

A utilização de microrganismos, especialmente no controle biológico, tem sido crescente e promissora, minimizando consideravelmente o uso de agroquímicos e os danos ao meio ambiente. Desta forma, há um interesse crescente em encontrar produtos e novas práticas de controle para uso em estratégias de manejo integrado de pragas e doenças na agricultura (LOPES, 2018). As bactérias associativas de plantas são conhecidas como rizosféricas e endofíticas, as primeiras são definidas pelos microorganismos presentes na proximidade das raízes, que exercem influências significativas no desenvolvimento, nutrição e saúde das plantas. Além disso, contribuem para a melhoria da qualidade do solo, e as endofíticas são microrganismos que habitam o interior das plantas sem causar danos aos seus hospedeiros, firmando uma íntima relação com a espécie vegetal. Uma das principais vias de entrada deste grupo microbiano é a rizosfera, onde as plantas são capazes de liberar sinalização receptora aos microrganismos que facilitam a colonização de grupos específicos, bem como substâncias nutritivas que atuam na promoção do crescimento de plantas (BAIS et al., 2006; COMPANT et al., 2011). Essas bactérias associativas têm sido estudadas amplamente como agentes de biocontrole para diversas culturas agrícolas, incluindo a soja, que atualmente é uma das principais *commodities* agrícolas do mundo, sendo uma cultura de grande importância econômica e alimentar.

No entanto, os patógenos da soja, como a *Rhizoctonia solani* JG Kuhn, (1858), têm sido um grande problema para os produtores, causando perdas significativas de produtividade e qualidade dos grãos. O fungo *R. solani* ocorre em diversas culturas de importância econômica, como a batata, feijão, fumo, milho e, principalmente, a soja. Este patógeno causa podridões radiculares no início do desenvolvimento e provoca redução no vigor e na germinação da semente. A incidência e a severidade do ataque estão associados às condições do solo e a sequência de culturas cultivadas na área. O ataque é mais severo em lavouras com alta densidade de plantas, conduzidas em solos orgânicos, argilosos ou compactados e onde há acúmulo de água na superfície do solo. Comumente, o controle mais utilizado é o tratamento das sementes com fungicidas que geram grandes problemas ambientais e à saúde (FENILLE, 2001; ERPER et al., 2011; XING, 2022). O uso de agentes de biocontrole, como as bactérias associativas, podem ser uma alternativa para o controle desses patógenos (HENNING et al., 2014).

Neste sentido, o Laboratório de Microrganismos e Processos Biotecnológicos (LAMPB), da Universidade Federal de Santa Catarina, atua ativamente no isolamento, caracterização morfológica e molecular de microrganismos associativos e verificação da capacidade de produção de substâncias promotoras do crescimento vegetal *in vitro*. Como resultado, hoje o LAMPB-UFSC conta com uma vasta coleção desses microrganismos que possuem capacidade de promoção do crescimento vegetal com potencial emprego como inoculantes para espécies vegetais utilizadas para recuperação de áreas degradadas pela mineração de carvão e em sistemas agrícolas (MOURA et al., 2016, HERNÁNDEZ et al., 2017; NASCIMENTO 2018; SILVA, 2020). Estes isolados foram fundamentalmente caracterizados quanto à produção de substâncias promotoras do crescimento vegetal, não sendo avaliados quanto a capacidade de ação como agentes de biocontrole de patógenos de culturas de interesse agrícola. Deste modo, visando a adoção de técnicas mais sustentáveis na agricultura, o presente trabalho pretende explorar o potencial de bactérias associativas da coleção do LAMPB-UFSC no controle de *R. solani* em condições *in vitro*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CULTURA DA SOJA NO BRASIL

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), a soja foi introduzida no país na década de 1920, inicialmente como uma planta ornamental. A produção comercial de soja teve início nas décadas de 1950 e 1960, com a importação de variedades de sementes dos Estados Unidos. A partir daí, a cultura da soja começou a se expandir rapidamente, especialmente nas regiões Centro-Oeste e Sul do Brasil (BONATO Ê R. & BONATO A L., 1987)

A área de plantio de soja na região brasileira é de 40,9 milhões de hectares, com produção de 123,8 milhões de toneladas colhidas e produtividade média de 3.026 kg/ha (CONAB, 2022). Essa elevada produtividade tem colocado o Brasil em uma posição de destaque no cenário mundial de produção da soja. Atualmente, o Brasil é o segundo maior produtor e exportador mundial de soja, ficando atrás apenas dos Estados Unidos. A competitividade da agricultura brasileira, aliada à vasta extensão de terras disponíveis para a produção, tem contribuído para a consolidação do Brasil como um dos principais fornecedores globais desse grão. Estima-se que a soja brasileira, em 2033/2034, será responsável por cerca de 43% nas exportações nacionais de grãos para o comércio mundial (BRASIL, 2022; CONAB, 2022).

Os produtos derivados da soja podem ser classificados em quatro grupos, de acordo com o seu processamento: produtos não desengordurados, como leite de soja e extrato de soja; produtos de farelo desengordurado, resultantes da trituração dos grãos, como farinhas e farelos; produtos de óleo bruto, que incluem óleos comestíveis e margarinas; e alimentos naturais, que podem ser fermentados ou não fermentados, como shoyu e grãos frescos verdes, respectivamente (CARRÃO-PANIZZI, 2011). O avanço das tecnologias de processamento possibilitou novas aplicações para a cultura da soja, que hoje está disponível no mercado como matéria-prima para diversos subprodutos (CARRÃO-PANIZZI, 2011). Como resultado, o grão da soja é utilizado na produção de adesivos, nutrientes, espumas, fibras, adubos, revestimentos, emulsões para tintas, alimentação animal e outras

aplicações. Essas oportunidades de utilização contribuem para a valorização e versatilidade da soja como uma cultura de grande importância econômica e comercial (EMBRAPA-SOJA, 2001).

No entanto, a expansão da agricultura traz consigo desafios e impactos ambientais significativos que demandam ações urgentes. O desmatamento é uma das principais preocupações associadas a essa atividade, conforme apontado pelo Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE). Áreas de floresta amazônica têm sido convertidas em plantações de soja, especialmente no conhecido “Arco do Desmatamento”, além do uso extensivo de agroquímicos para controlar pragas agrícolas nas plantações. Essas práticas não afetam apenas a biodiversidade, mas toda a cadeia produtiva decorrentes destes atos. É crucial que medidas sejam adotadas e implementadas visando controle e fiscalização para conciliar o desenvolvimento agrícola com a preservação ambiental (SPADOTTO et al, 2022)

Um dos maiores desafios encontrados no processo de cultivo da soja é a utilização de sementes saudáveis, livres de patógenos, que possam reduzir o potencial germinativo, do vigor e da emergência, do período de armazenamento e danos econômicos para a safra (SOUSA, 2016). Adicionalmente, estudos que visam o desenvolvimento de tecnologias aplicadas ao campo vêm sendo desenvolvidos ao longo dos anos visando aumento da produtividade e a redução dos custos produtivos e, atualmente, ambientais.

2.2 *RHIZOCTONIA SOLANI* NO CULTIVO DA SOJA

No Brasil, a cultura da soja é afetada por uma diversidade de doenças e o controle representa um desafio significativo para os agricultores. Estima-se que mais de 40 doenças tenham sido identificadas no país, causadas por uma variedade de patógenos, como fungos, bactérias, nematóides e vírus. Essas doenças podem comprometer diferentes partes da planta, como sementes, plântulas, raízes, caule e folhas, resultando em perdas significativas na produção. A importância econômica de cada doença varia anualmente e é influenciada por fatores climáticos e práticas de manejo. Além disso, a disseminação das doenças pode ocorrer por meio de sementes infectadas, insetos, vento, água e até mesmo por atividades humanas, reforçando a necessidade de estratégias eficazes de controle e monitoramento (CELESTINO et al., 2016; BEN et al., 2015).

Dentre as doenças da soja no Brasil, algumas se destacam pela sua relevância econômica e impacto na produção, como a podridão radicular, causada principalmente pelo fungo *Rhizoctonia solani*. Este patógeno afeta o sistema radicular das plantas, prejudicando sua capacidade de absorver água e nutrientes (FENILLE, 2001).

O fungo *Rhizoctonia solani* (anamorfo *Thanatephorus cucumeris*) é a espécie mais estudada no gênero *Rhizoctonia* (SNEH, 1991). A descrição da espécie, assim como os sintomas da doença, foi realizada por Kühn em 1858 a partir de tubérculos de batata enferma (PARMETER, 1970). O patógeno é um parasita facultativo altamente competitivo e eficiente em relação a outros saprófitos do solo. Sua sobrevivência no solo é auxiliada pela formação de escleródios, estrutura formada pelo condensamento das hifas (HOITINK, 1991). Nos escleródios, surgem hifas que germinam e formam micélios, sendo assim, fonte de inóculo para infecção e propagação da doença (KEIJER, 1996).

Na infecção por *R.solani* geralmente os escleródios primeiro germinam para formar micélios, os quais crescem em direção à planta hospedeira. O crescimento micelial irá ocorrer em resposta a exsudatos de plantas hospedeiras e é sucedido por ligação das hifas aos tecidos do hospedeiro, crescimento das hifas ao longo das paredes celulares epidérmicas do hospedeiro, formação do apressório, colonização do tecido hospedeiro e eventual colapso das células (KEIJER, 1996). *R. solani* é considerado um patógeno necrotrófico, sendo que a atividade da maioria dos patógenos necrotróficos tem sido associada à produção de enzimas extracelulares ou toxinas (VAN KAN, 2006).

O apodrecimento de sementes e o *damping off* na pré-emergência ocorre com maior frequência em áreas com altas quantidades de inóculo ou em condições que afetam negativamente a germinação e emergência de plântulas, como clima frio e úmido. Sob menor pressão do inóculo, as raízes e hipocótilos das plantas germinadas ficam apodrecidas, sendo esses sintomas mais comuns após a emergência das plantas. As plantas com raízes afetadas podem exibir um crescimento lento das raízes laterais, tornando as plantas menos vigorosas, com redução da capacidade de absorção de água e nutrientes. Tais plantas apresentaram aparência cloróticas e atrofiadas (HWANG; HOWARD; CHANG, 1996).

O uso de tratamentos de sementes com a aplicação de fungicidas é um dos principais métodos adotados para o controle do patógeno. Esses oferecem proteção da semente durante os estágios iniciais de crescimento, sendo um dos métodos mais utilizados (KATARIA; GISI, 1996; DORRANCE et al., 2003). Os tratamentos de sementes não só protegem as sementes germinadas do tombamento de pré-emergência, mas também ajudam a garantir o desenvolvimento de um sistema radicular saudável, acelerando o crescimento e estabelecimento das plantas, tornando as plantas menos vulneráveis à infecção (LAZZARETTI & BETTIOL, 1997).

2.3 MICRORGANISMOS ASSOCIATIVOS DE PLANTAS

As bactérias associativas ou rizosféricas desempenham um papel crucial na promoção do crescimento das plantas. Ao colonizarem a rizosfera, esses microorganismos estabelecem uma relação simbiótica. A capacidade de fixação de nitrogênio atmosférico que essas bactérias apresentam contribui significativamente para o fornecimento desse nutriente vital, essencial para o desenvolvimento saudável das plantas. Além disso, as bactérias associativas estão envolvidas em processos de solubilização e disponibilização de nutrientes no solo. No contexto da rizosfera, as rizobactérias emergem como agentes promotores do crescimento vegetal. Essas secretam compostos bioativos que estimulam o desenvolvimento das raízes e aumentam a absorção de nutrientes pelas plantas. Além disso, as rizobactérias são conhecidas por conferir resistência às plantas contra patógenos do solo, e melhorar a saúde das plantas fortalecendo seu sistema imunológico. Já as bactérias endofíticas, estão presentes em todas as espécies vegetais, permanecendo em estado de latência ou colonizando ativamente os tecidos de forma local ou sistêmica (ZINNIEL et al., 2002; BOTTA et al., 2013). Essas bactérias estabelecem uma simbiose interna, estimulando o crescimento e a resistência das plantas. Esses microorganismos, ao colonizar o interior das plantas de forma não prejudicial, são ativos na produção de substâncias promotoras do crescimento. Estas incluem hormônios de crescimento e compostos que melhoram a eficiência da absorção de nutrientes. Já em relação as plantas, liberam compostos orgânicos no solo através de suas raízes, conhecidas como exsudatos radiculares, esses compostos podem servir como fonte de alimento para as bactérias

associativas. Em troca, as bactérias proporcionam benefícios às plantas, como a fixação de nitrogênio ou a promoção do desenvolvimento radicular, favorecendo as plantas contra estresses ambientais, contribuindo para um crescimento exitoso (BOTTA et al., 2013).

Além de desempenhar um papel na absorção de nutrientes, as bactérias associativas de plantas são capazes de modular os níveis de hormônios vegetais, como o ácido indol-acético (AIA) e a produção da enzima ACCd, que regula diretamente os níveis de etileno na planta. A ACCd é uma enzima responsável pela conversão irreversível de ACC, o precursor imediato do etileno, em amônia e α -cetobutirato. Desta forma, as bactérias associativas que possuem a capacidade de sintetizar ACCd podem promover o crescimento vegetal ao diminuir os efeitos dos níveis de etileno na planta (GLICK 2014; VURUKONDA et al., 2016).

2.4 MICRORGANISMOS ASSOCIATIVOS DE PLANTAS COMO AGENTES DE BIOCONTROLE

Várias são as bactérias associativas envolvidas no controle biológico, dentre estas as pertencentes aos gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus* são as mais estudadas (BETTIOL et al. 2009). Essas bactérias, apresentam interações do tipo antibiose, competição, parasitismo e indução de resistência, podendo ser encontradas no solo, rizosfera ou endofiticamente nos tecidos vegetais (LUDWIG et al., 2013). Antibiose é um tipo de interação entre organismos, na qual um ou mais metabólitos produzidos pelo antagonista têm efeito negativo sobre o patógeno, resultando na inibição do crescimento e/ou germinação. Competição é a interação entre organismos compelidos na mesma ação, ocorre principalmente quando há disputas seja por alimentos, por espaço e/ou por oxigênio. O parasitismo ocorre quando um microrganismo se nutre a partir de estruturas vegetativas e/ou reprodutivas do outro. Os hiperparasitas atacam hifas, estruturas de resistência e de reprodução dos fitopatógenos. A predação ocorre quando um organismo obtém alimento a partir de fitopatógenos e de diversas fontes. A indução de resistência é o estímulo dos mecanismos de defesa do hospedeiro por meio da introdução de organismos não patogênicos. A partir da introdução de determinado microrganismo de controle

biológico pode ocorrer a coexistência de diferentes mecanismos de controle (TORRES et al., 2000).

O uso de microrganismos no controle biológico minimizam os vários efeitos prejudiciais para o meio ambiente e saúde em relação ao uso de agroquímicos. Há um interesse considerável em encontrar abordagens de controle alternativo para uso em estratégias de manejo integrado de pragas e doenças na agricultura e essas estratégias têm sido amplamente pesquisadas (KORTEKAMP, 2011).

O grande empenho em pesquisas envolvendo o controle biológico está aumentando mundialmente, tornando-se gradualmente um componente no manejo integrado em plantios agrícolas. A partir da pesquisa sobre o uso de microrganismos antagonistas específicos, muitos microrganismos eficientes foram encontrados e inclusive vêm sendo utilizados em formulações comerciais com sucesso, como uma ferramenta eficaz no controle de pragas e doenças e também como inoculantes para biofertilização (SANTOS et al., 2011)

3 HIPÓTESE

Bactérias associativas pertencentes ao banco de microrganismos do LAMPB-UFSC possuem capacidade de atuar como agentes de biocontrole de fitopatógenos de importância agrícola, mais especificamente sobre o fungo *Rhizoctonia solani*.

4 OBJETIVO GERAL

Caracterizar bactérias associativas pertencentes ao banco de microrganismos do LAMPB-UFSC quanto ao potencial uso no controle biológico do fungo *Rhizoctonia solani* em condições *in vitro* .

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar *screening* de bactérias associativas com potencial atividade antagônica à *Rhizoctonia solani* em condições *in vitro*;
- Identificar a bactéria UFSC-BS por meio do sequenciamento do gene 16S rRNA
- Avaliar mecanismos diretos de promoção do crescimento de plantas no isolado UFSC-BS.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 OBTENÇÃO DOS ISOLADOS

Foram selecionados 10 isolados de bactérias associativas do banco de microrganismos do LAMPB-UFSC conforme descrito no quadro 1. Destes dez isolados, nove já foram identificados e avaliados quanto a promoção de crescimento de plantas (SILVA, 2020; MOURA et al., 2013; HERNÁNDEZ et al., 2017; HERNÁNDEZ et al., 2019). E um isolado não possui identificação e nem foi avaliado quanto à produção de compostos promotores do crescimento de plantas. Já o fitopatógeno *Rhizoctonia solani* CMES 1796 foi fornecido pela Embrapa Soja.

Quadro 1: Bactérias associativas provenientes do banco de microrganismos do LAMPB-UFSC empregadas nos testes de antagonismo contra o fitopatógeno *Rhizoctonia solani*. (continua)

Isolados	Procedência	Classificação	Local de isolamento	Referência
UFSC-1S3	Rizosférica	<i>Bacillus</i> sp.	Bom Jardim da Serra-SC	SILVA, 2020
UFSC-4P3	Endofítica			
UFSC-20S3	Rizosférica			
UFSC-M8	Rizosférica	<i>Rhizobium</i> sp.	Criciúma-SC	MOURA et al., 2013

Isolados	Procedência	Classificação	Local de isolamento	Referência
				HERNÁNDEZ et al., 2017
UFSC-A611	Rizosférica		Treviso-SC.	HERNÁNDEZ et al., 2019
UFSC-A605	Rizosférica	<i>Pseudomonas</i>	Treviso-SC.	
UFSC-AR18	Rizosférica	<i>sp.</i>	Lauro Muller-SC	
UFSC-A1211	Rizosférica		Siderópolis-SC.	HERNÁNDEZ et al., 2019
UFSC-AR02	Rizosférica	<i>Rhizobium sp.</i>	Lauro Muller-SC	
UFSC-BS	Endofítica		Semente de soja	

Fonte: elaborado pelo autor. (conclusão)

5.2 SELEÇÃO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTAGÔNICO DAS BACTÉRIAS ASSOCIATIVAS *IN VITRO*

5.2.1 Ativação e teste inicial com bactérias com potencial antagonista

As bactérias a serem empregadas para o teste de antagonismo foram reativadas em meio TSA (composição em g L⁻¹: 15,0 triptona; 5,0 digestão papáica de farinha de soja; 5,0 cloreto de sódio; 15,0 ágar, pH final 7,3), incubadas à 28 °C por 3 dias. O procedimento de reativação também foi realizado para o isolado de *R. solani* em meio BDA (composição em g L⁻¹: 200 batatas cruas, 20 dextrose, 17 ágar, pH final 5,6).

Para a seleção das bactérias potencialmente antagonistas, também foi realizado um teste de crescimento em meio de cultivo BDA. As bactérias que apresentaram crescimento foram utilizadas no teste de antagonismo (MARIANO, 1993). Para a realização do teste de antagonismo foram utilizadas placas de Petri de 90 x 15 mm como unidade experimental, sendo realizadas 3 repetições por

tratamento. Utilizou-se o método de cultivo Dual, onde um disco micelial (5 mm) de BDA do fungo é posicionado no centro da placa Petri e o isolado bacteriano é inserido na placa previamente marcada com o auxílio de um gabarito que garante uma posição equidistante dos inóculos em relação a placa (KUMARI et al., 2021). Para a padronização do inóculo, uma testemunha foi utilizada, que consistiu em placas de Petri contendo apenas o patógeno. Todas as placas foram incubadas a 25°C no escuro. As avaliações foram realizadas no momento em que o crescimento do patógeno alvo do tratamento testemunha atingiu 100% da placa de Petri. Os isolados que apresentaram capacidade de inibição do patógeno foram utilizados nos testes de inibição *in vitro*, via inoculação de sementes.

5.2.2 Seleção de bactérias com potencial antagonista via inoculação em semente de soja

Nesta etapa as placas de Petri de 90 x 15 mm foram utilizadas como unidade experimental, sendo realizadas 3 repetições por tratamento, desta vez com a utilização de sementes de soja em diferentes concentrações do inóculo bacteriano (0,5, 1,0 e 2 mL kg semente⁻¹). Foram também testados os seguintes tratamentos controle: a) Controle Positivo: sementes de soja tratadas com o produto comercial Organic(R) a base de *Trichoderma asperellum*, indicado para controle do patógeno de interesse, conforme indicação de uso da empresa fabricante (Lallemand-BR); b) Controle Negativo: sementes de soja tratadas apenas com água destilada esterilizada e; c) Testemunha: Placas de Petri contendo apenas o patógeno. Para a avaliação do potencial biofungicida foram adicionadas, em cada placa de Petri, quatro sementes de soja tratadas com as bactérias de interesse, conforme método de cultivo Dual descrito anteriormente (KUMARI et al., 2021). Todas as placas foram incubadas a 25°C no escuro. As avaliações foram realizadas no momento em que o crescimento do patógeno alvo do tratamento testemunha atingiu 100% da placa de Petri. As avaliações consistiram na determinação do diâmetro médio da colônia do alvo (em mm), utilizando-se um paquímetro digital, de modo a se determinar o percentual de inibição do crescimento do patógeno.

5.2.3 Avaliação do potencial de antagonismo

A porcentagem de inibição foi obtida por meio da relação entre o diâmetro da colônia do patógeno na presença de cada uma das bactérias endofíticas e o diâmetro da colônia do patógeno no tratamento controle sem a presença da bactéria. Com esses valores foi calculada a porcentagem de inibição (%In), sendo esta resultante da aplicação da seguinte fórmula (HAYAKAWA et al., 2004).

$$\% \text{ Inibição} = 100 - ((\varnothing \text{ CA} / \varnothing \text{ TC}) * 100), \text{ sendo:}$$

CA = diâmetro médio da colônia do patógeno alvo obtido a partir de duas medições perpendiculares (mm)

TC = diâmetro da colônia do tratamento controle ou testemunha (mm)

5.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados relacionados com a avaliação da porcentagem de inibição do patógeno nos testes com e sem sementes foram submetidos à análise de variância, utilizando o programa estatístico SISVAR. As médias dos tratamentos foram agrupadas pelo teste de separação de médias-Tukey, a 5% de probabilidade.

5.4 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DO ISOLADO DE INTERESSE

5.4.1 Identificação do isolado por sequenciamento do gene rRNA 16S

Uma colônia do isolado bacteriano foi transferida para tubos de 0,2 mL contendo 100 µL de água ultrapura e mantidos a 100 °C por 5 min, seguindo-se uma centrifugação a 13.000 g durante 3 min. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 0,2 mL e armazenados em freezer a -20 °C (HAGEN et al., 2002). Para a classificação do isolado até nível de gênero foi realizada a amplificação e o sequenciamento da região V1-V3 do gene rRNA 16S. Utilizou-se para a PCR o DNA extraído e os iniciadores PRBA63f (5' GGA TCC CAG GCC TAA CAC ATG CAA

GTC 3') (MARCHESI et al., 1998) e UN518r (5' ATT ACC GCG GCT GCT GG 3') (ØVREÅS et al., 1997). A amplificação foi feita em solução tampão para Taq DNA polimerase, contendo 0,2 mmol L⁻¹ de dNTPs, 3 mmol L⁻¹ de MgCl₂, 1 U de Taq DNA polimerase (Life Technologies, São Paulo, Brasil), 5 pmol dos iniciadores e 10 ng de DNA. A PCR foi realizada em termociclador modelo Mastercycler Personal (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) com as seguintes condições: 5 min a 95 °C, 30 ciclos de 1 min a 95 °C, 1 min a 55 °C e 1 min a 72 °C, e extensão final a 72 °C por 10 min. Os amplicons foram purificados usando o kit Invisorb Fragment CleanUp (Invitek, Berlim, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante, secos a 60 °C e 48 enviados para sequenciamento na Macrogen Inc., United State of America. As sequências fornecidas pela Macrogen foram processadas e comparadas com as sequências depositadas no Genbank. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

5.5 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE PROMOTORA DO CRESCIMENTO DE PLANTAS *IN VITRO*

5.5.1 Quantificação da produção de ácido indol acético (AIA)

A determinação da produção de ácido indol acético (AIA) foi realizada usando o método colorimétrico Salkowski, preparado a partir de cloreto férrico em ácido sulfúrico (GLICKMANN e DESSAUX, 1995). Vinte µL de cada inóculo foi adicionado em tubos contendo cinco mL de meio TSB com composição (em g L⁻¹): 17,0 peptona de caseína; 3,0 peptona de soja; 2,5 glicose; 5,0 cloreto de sódio; 2,5 fosfato dipotássico; e pH final 7,3 ± 0,2) suplementado com 500 µg mL⁻¹ de triptofano, no intuito de induzir a produção de AIA. Adicionalmente, 20 µL de cada inóculo foi adicionado em tubos contendo cinco mL de meio TSB sem adição de triptofano, a fim de se determinar compostos produzidos pelos microrganismos que possuem detecção no mesmo comprimento de onda. Foram também incluídos dois tratamentos branco, constituídos do meio TSB com e sem adição de triptofano, ambos sem inoculação. Após 24 horas de crescimento sob agitação constante a 135 rpm (Tecnal TE-421) e temperatura de 28 °C, os tubos foram centrifugados a 4000 rpm durante 15 min. Em seguida, o sobrenadante foi misturado com o reagente de Salkowski na proporção 1:2 e após 30 min de incubação realizou-se a leitura da

absorbância em espectrofotômetro (HACH DR3900) no comprimento de onda 530 nm. A concentração de AIA foi determinada utilizando uma curva padrão contendo 0, 5, 10, 20, 50 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AIA (Sigma, Shanghai, China). As análises foram realizadas em triplicatas.

5.5.2 Quantificação da atividade enzimática da 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico (ACC) deaminase

A atividade da enzima da 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico deaminase (ACCd) foi verificada em meio mínimo M9 com composição (em g L^{-1}): 20 mL da solução M9 20x (Na_2HPO_4 58 g; KH_2PO_4 30 g; NaCl 5 g; dissolvidos em 500 mL de H_2O Milli-Q); 0,2 mL solução CaCl_2 0,5 mol L^{-1} ; 0,4 mL solução MgSO_4 1 mol L^{-1} ; 0,4 mL solução de biotina 0,3 mg mL^{-1} ; 6 mL solução de glicose 1 mol L^{-1} e 374 mL de H_2O Milli-Q. Para tanto, uma alíquota de 10 μL de cada inóculo foi adicionada em: 1) 5 mL de meio mínimo M9 sem qualquer fonte de nitrogênio (controle negativo); 2) 5 mL de meio M9 + ACC 3 mmol L^{-1} , como a única fonte de nitrogênio; 3) 5 mL de meio M9 + NH_4Cl (controle) (SICUIA et al., 2015; NASCIMENTO, 2018). A incubação foi realizada a 28 °C sob agitação constante a 135 rpm (Tecnal TE-421), durante 14 dias. Os ensaios foram realizados em duplicata. A diferença entre o crescimento dos isolados em meio M9 sem N e meio M9 + ACC foi comparada, bem como o crescimento observado no controle. A atividade positiva de ACCd é descrita em isolados capazes de crescer em meio mínimo contendo ACC, mas não são capazes de crescer em meio mínimo sem fonte de nitrogênio.

5.5.3 Avaliação qualitativa da produção de enzimas hidrolíticas

5.5.3.1 Produção de celulase

A determinação qualitativa da enzima celulase foi determinada segundo Singh et al., (2013). Para tanto 10 μL de inóculo foi colocado no centro de placas com meio Bushnell Haas contendo (em g L^{-1}) 10,0 carboximetilcelulose (CMC); 1,0 K_2HPO_4 ; 1,0 KH_2PO_4 ; 0,2 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,0 NH_4NO_3 ; 0,05 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,02 CaCl_2 e 20,0 ágar (pH 7,0). As placas foram incubadas a 30 °C durante sete dias. Na sequência,

as placas foram inundadas com solução de vermelho congo 0,3%. Após 20 min foi retirada a solução e adicionada solução de NaCl 1 mol L⁻¹. Os isolados que mostraram uma zona clara ao redor das colônias foram considerados positivos para a produção da enzima. O ensaio foi realizado em triplicata.

5.5.3.2 *Produção de quitinase*

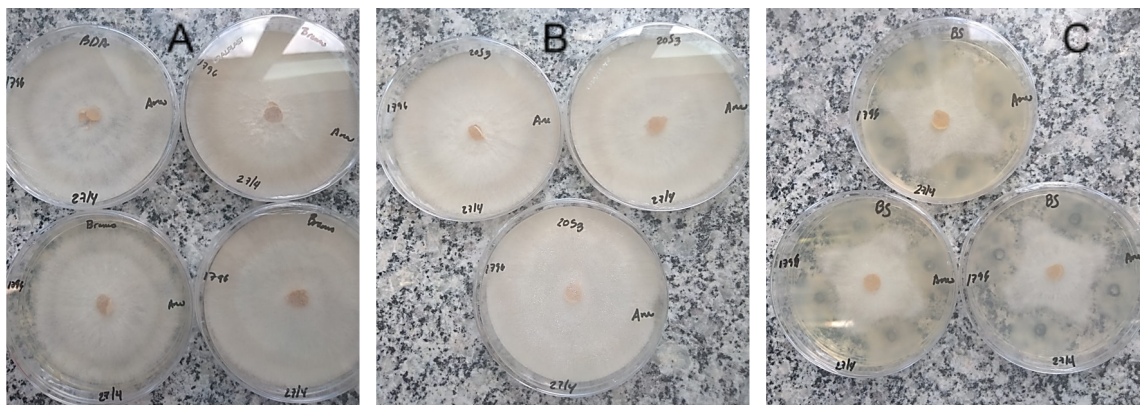
A determinação qualitativa da atividade da enzima quitinase foi realizada empregando duas metodologias. Primeiramente, procedeu-se segundo Pelizza et al. (2020) adicionando-se 10 µL de inóculo em meio mínimo M9 contendo 0,08% de Chitin Azure (Sigma). As placas foram incubadas em BOD a 30 °C durante 14 dias (Howard et al., 2003). Classificou-se a atividade como positiva quando foi verificado o aparecimento de zonas claras ao redor das colônias, produto da despolimerização da quitina.

6 RESULTADOS

6.1 TESTE INICIAL COM BACTÉRIAS COM POTENCIAL ANTAGONISTA *IN VITRO*

No teste inicial de antagonismo apenas quatro dos dez isolados testados apresentaram capacidade de inibição do patógeno. Na figura 1 é possível observar a diferença entre uma um dos isolados selecionados para a etapa seguinte. Em comparação com a testemunha, consiste somente na placa inoculada com o fitopatógeno (A), o isolado UFSC-20S3 que não foi selecionado (B), apresentando pouco ou nada de inibição do patógeno se comparadas com a placa contendo o isolado UFSC-BS (C). O isolado UFSC-BS destacou-se quanto a redução do crescimento micelial, com porcentagem de inibição superior a 50%, sendo diferente estatisticamente das estirpes de *Pseudomonas* sp. (UFSC-A605) e de *Bacillus* sp. (UFSC-1S3 e UFSC-4P3) que apresentaram eficiência intermediária no controle do patógeno (32 a 36%) e não diferiram entre si estatisticamente (Tabela 1).

Figura 1. Isolados de bactérias associativas em placas demonstrando a inibição do crescimento micelial do patógeno *Rhizoctonia solani* pelo método dual. (A) Fitopatógeno *Rhizoctonia s*, (B) isolado UFSC-20S3, (C) isolado UFSC-BS.



Fonte: elaborado pelo autor

Tabela 1. Efeito de isolados de bactérias associativas no percentual de inibição do crescimento micelial do patógeno *Rhizoctonia solani* pelo método dual.

Isolados	Média da Porcentagem de Inibição (%)
UFSC-A605 (<i>Pseudomonas</i> sp.)	36,02 b *
UFSC-1S3 (<i>Bacillus</i> sp.)	35,66 b
UFSC-4P3 (<i>Bacillus</i> sp.)	31,94 b
UFSC-BS	55,29 a

Fonte: elaborado pelo autor

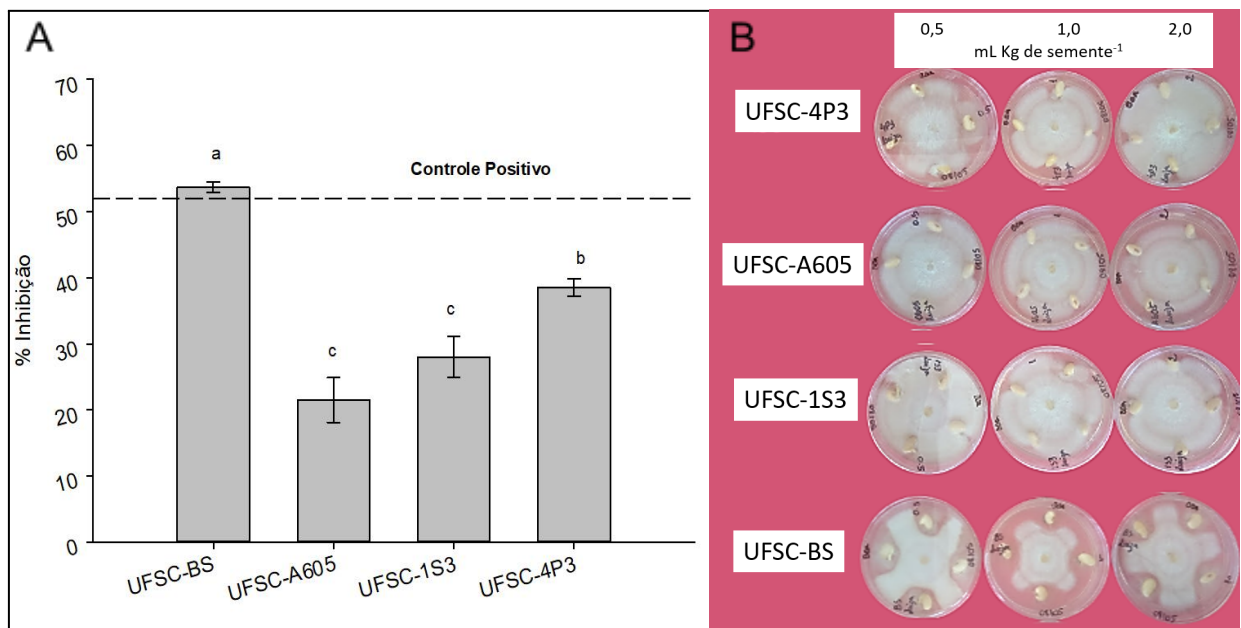
*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

6.2 SELEÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS COM POTENCIAL ANTAGONISTA EM SEMENTES DE SOJA

Dentre os isolados utilizados no teste de antagonismo via inoculação de sementes, merece destaque o isolado UFSC-BS, que apresentou porcentagem de inibição do patógeno *R. solani* maior que 50% nas três doses avaliadas, estatisticamente se mostrou superior aos outros três isolados, sendo obtidos valores semelhantes ao produto comercial (controle positivo) (Figura 2). Por sua vez, o

isolado *Bacillus sp.* (UFSC-4P3) teve um comportamento intermediário constatado estatisticamente com porcentagem de inibição média de 39% sendo diferente das estirpes com menores inibições e inferior ao isolado UFSC-BS e ao controle positivo, mas ainda assim, o isolado UFSC-BS é 33% mais inibidor que o isolado UFSC-4P3, enquanto as estirpes *Pseudomonas sp.* (UFSC-A605) e *Bacillus sp.* (UFSC-1S3) apresentaram a menor eficiência no controle do patógeno, em média 22 e 28% respectivamente, não apresentando diferença significativa entre elas.

Figura 2. (A)- Relação entre as bactérias associativas e a porcentagem de inibição nas diferentes concentrações (0,5, 1,0 e 2,0 mL/Kg de semente) comparadas ao controle positivo. (B)- Placas contendo sementes de soja inoculadas diferentes doses dos isolados avaliados (0,5, 1,0 e 2,0 mL kg sementes⁻¹) em enfrentamento com o fitopatógeno *R. solani*.

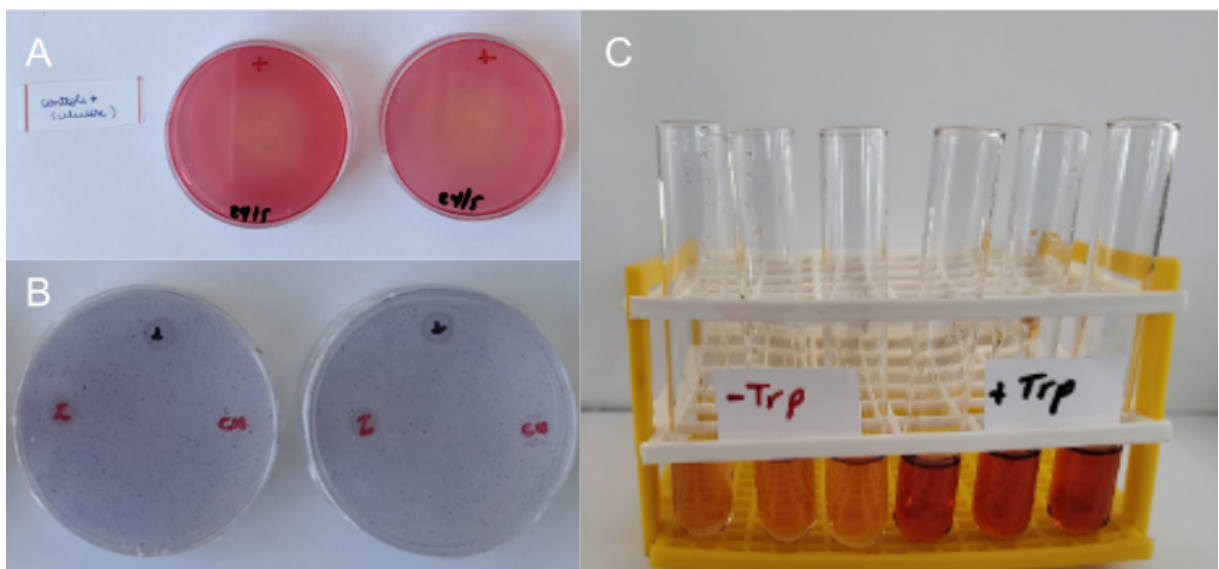


Fonte: elaborado pelo autor

6.3 CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE PROMOTORA DO CRESCIMENTO DE PLANTAS

Na Figura 3 é possível verificar resultado positivo para a produção da enzima celulase (A) e ácido indol acético (AIA) (C) e negativo para a quitinase (B) e ACC deaminase. As características associadas à promoção do crescimento vegetal do isolado UFSC-BS são apresentadas na Tabela 2. Quanto à produção de ácido indol acético (AIA) o isolado UFSC-BS teve a capacidade de produzir 3,43 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Além disso, foi possível obter a classificação da estirpe UFSC-BS até nível de gênero, sendo identificado como *Bacillus sp.*

Figura 3. (A)- Ensaio qualitativo para detecção da enzima celulase. Crescimento dos microrganismos em meio com adição de carboximetilcelulose como única fonte de C. Após sete dias de incubação foi realizada a adição do corante vermelho congo e NaCl ao meio para revelação da produção da enzima celulase *in vitro*.(B)- Ensaio qualitativo para detecção da enzima quitinase. Crescimento dos microrganismos em meio M9 + Chitin Azure após 14 dias de incubação. Degradação do corante indicaria resultado positivo para a produção de quitinase. (C)- Representação da produção de ácido indol acético por *Bacillus sp* (UFSC-BS) em meio de cultura contendo Triptofano (Trp) como indutor.



Fonte: elaborado pelo autor

Tabela 2: Produção *in vitro* de substâncias promotoras do crescimento de plantas por *Bacillus sp* (UFSC-BS)

Isolado	Características de Promoção do Crescimento de Plantas				
	Identificação (16S rRNA)	Celulase	Quitinase	ACC deaminase ^a	AIA ^b ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
UFSC-BS	<i>Bacillus sp.</i>	+	-	-	3,43
Controle(+)		+	+	+	+ ^c

Fonte: elaborado pelo autor

^a Enzima 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico (ACC) deaminase

^b Ácido Indol Acético (AIA)

^c Produção de 48,75 $\mu\text{g mL}^{-1}$ AIA

7 DISCUSSÃO

O interesse principal de estudar os microrganismos com potencial para controlar doenças que atingem à agricultura, é de identificar e manipular comunidades microbianas para atuarem na rizosfera de forma natural, de modo a repor as condições mais próximas às originais, visto que a saúde do solo está intimamente associada a sobrevivência e seleção dos microrganismos que influenciam nas culturas vegetais (MIRANSARI, 2013).

Os três isolados bacterianos de *Bacillus sp* que participaram dos testes de antagonismo com sementes avaliados que foram avaliados no presente estudo são UFSC-1S3, UFSC-4P3 e UFSC-BS, esses isolados apresentaram resultados distintos, sendo que um deles obteve o maior destaque, o isolado UFSC-BS foi superior nos testes realizados, sendo semelhante ao produto comercial. Essa observação da ação de isolados de *Bacillus* já foi descrita e constatada que podem apresentar diferenças no potencial de biocontrole perante o enfrentamento do mesmo fitopatógeno apesar de serem do mesmo gênero (LES, 2020).

O gênero *Bacillus* têm sido amplamente estudado devido a sua capacidade de inibir o crescimento micelial de diferentes fungos na cultura da soja ao ser empregado como uma abordagem alternativa no controle de fitopatógenos. Jain et

al. (2018), obtiveram resultados positivos quanto a inibição do crescimento micelial de *R. solani in vitro* com *Bacillus subtilis* Cohn, (1872), apresentando diminuição da incidência do patógeno em 81%, e as observações microscópicas revelaram que *Bacillus s.* causou deformidades morfológicas das hifas fúngicas, vazamento do protoplasto e destruição do micélio. Já Ma et al. (2015), apresentou eficácia no controle de *R. solani* de 79,9% em tomateiros (*Solanum lycopersicum L.*) utilizando microcápsulas à base de *B. subtilis*. Estes resultados são semelhantes aos observados no presente trabalho, onde o isolado UFSC-BS apresentou potencial de inibição do crescimento micelial deste mesmo fitopatógeno em mais de 50% nos testes de antagonismo.

Castillo-Reyes, (2015) demonstraram que espécies de *Bacillus sp* produzem quantidades consideráveis de quitinases, proteases e β - 1,3 glucanase, que degradam a parede celular de fungos, podendo assim contribuir com a inibição do fitopatógeno *R. solani*. Embora o isolado UFSC-BS utilizado no presente trabalho não apresentar produção de quitinases, ainda assim apresentou capacidade de liberar substâncias que também inibem o crescimento micelial. O isolado UFSC-BS apresentou resposta positiva para a enzima celulase, que também é uma enzima hidrolítica capaz de degradar algumas espécies de fitopatógenos como os *oomycetos*. Embora cepas de *Bacillus* sejam comprovadamente capazes de produzir metabólitos secundários eficazes tanto na promoção do crescimento de plantas quanto na indução de proteção das plantas contra patógenos, foi relatado que os metabólitos secundários produzidos por *Bacillus sp* podem ser muito diversos (ALENEZI et. al. 2021). Desta forma, outros mecanismos de ação, não avaliados no presente trabalho, podem ser responsáveis pelo potencial de biocontrole encontrado neste isolado.

Além de apresentar resultados positivos para a produção de celulase, o isolado UFSC-BS também produz AIA (Ácido Indol Acético). A produção de AIA desempenham um papel importante no crescimento das plantas, regulando a divisão e diferenciação celular, estimulando o desenvolvimento do sistema radicular, que contribui para um melhor enfrentamento às diversidades ambientais. Independentemente do mecanismo pelo qual as bactérias produtoras de AIA estão associadas à promoção do crescimento das raízes, o estímulo ao sistema radicular é benéfico para as plantas. Isso ocorre porque amplia a habilidade em se estabelecer no solo, além de aumentar a eficiência na absorção de água e nutrientes,

contribuindo assim, para uma maior sobrevivência (PATTEN; GLICK, 2002). Costa et al (2014) propôs um modelo que explica como as características de crescimento das plantas são influenciadas por bactérias associativas, dependendo da fertilidade do solo. O estudo revelou que em solos ricos em nutrientes, as plantas promovem interações com bactérias que produzem hormônios de crescimento, enquanto em solos com baixa fertilidade, as interações preferenciais são com bactérias que possuem mecanismos para aumentar a aquisição de nutrientes pelas plantas.

O isolado UFSC-A605 (*Pseudomonas sp*) apresentou valores bem abaixo do controle positivo nos dois testes, tanto no teste sem sementes quanto com a sementes, apesar dessa estirpe de *Pseudomonas sp* não ter apresentado resultados significativos para o fitopatógeno *Rhizoctonia s. Futuya* (1991) já demonstraram que outras espécies de *Pseudomonas* apresentaram diferenças nas atividades antibióticas contra fitopatógenos. Além de também atestar quanto mecanismos de promoção de crescimento de plantas.

8 CONCLUSÃO

O isolado UFSC-BS (identificado molecularmente como *Bacillus sp*) apresenta antagonismo para o fitopatógeno *Rhizoctonia solani* em condições *in vitro*, além de produzir substâncias que podem contribuir com a promoção de crescimento de plantas. Recomenda-se a sua avaliação no controle de doenças em casa de vegetação ou campo, além de testes com outros patógenos comuns na agricultura.

REFERÊNCIAS

- ALENEZI, FN; SLAMA, HB; BOUKET, AC; CHERIF-SILINI, H.; SILINI, A.; LUPTAKOVA, L.; NOWAKIWSKA, J A; OSZAKO, T.; BELBAHRI, L. ***Bacillus velezensis* : Um Tesouro de Compostos Bioativos de Importância Medicinal, Biocontrole e Ambiental.** *Florestas* 12 , 1714. 2021.
- ANDREOTE, F. D.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. **Assessing the diversity of bacterial communities associated with plants.** *Brazilian journal of microbiology* : [publication of the Brazilian Society for Microbiology], v. 40, n. 3, p. 417–32, jul. 2009.
- BAIS, H.P.; WEIR, T.L.; PERRY, L.G.; GILROY, S.; VIVANCO, J.M. **The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms.** *Annual Review of Plant Biology* , v. 57, p. 233-266, 2006
- BETTIOL, W. et al. **Supressividade a fitopatógenos habitantes do solo.** In: PLANTAS, Biocontrole de Doenças de; BETTIOL, Wagner; MORANDI, Marcelo A. B. (Ed.). *Biocontrole de doenças de plantas: usos e perspectivas.* Jaguariuna: Embrapa, cap. 12, p. 187-190, 2009.
- BEN, Cássio Alberto Vielmo et al. **Avaliação de cultivares de soja [*Glycine max* (L.) MERRILL] quanto à tolerância à *Rhizoctonia solani*.** 2015.
- BOTTA, A. L. et al. **In vitro and in vivo inoculation of four endophytic bacteria on *Lycopersicon esculentum*.** *New Biotechnology*, v. 30, n. 6, p. 666–674, 2013.
- BRADER, G. et al. **Metabolic potential of endophytic bacteria.** *Current Opinion in Biotechnology*, v. 27, p. 30–37, 2014.
- BRASIL. **Ministério da Agricultura e Pecuária. Mercado de Biodefensivos cresce mais de 70% no Brasil em um ano.** Gov.br 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/feffmercado-de-biodefensivos-cresce-em-mais-de-50-no-brasil>. Acesso em: 28 de Mai de 2023.
- CARRÃO-PANIZZI, MERCEDES CONCÓRDIA; SILVA, JB da. **Soja na alimentação humana: qualidade na produção de grãos com valor agregado.** In: Quinto Congresso de la Soja del Mercosur. 2011.
- CASTILLO-REYES, FRANCISCO et. al. **Eficácia in vitro de *Bacillus* e polifenóis de plantas nativas do México em *Rhizoctonia-Solani*.** *Rev. Ciência. Agríc* , Texcoco, v. 6, não. 3, pág. 549-562, maio de 2015. Disponível em <http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342015000300009&lng=es&nrm=iso>. acessado em 10 set. 2023.
- CELESTINO, G. G.; GODOY, C. V. **Ensaio cooperativo para avaliação da eficiência de fungicidas protetores no controle de doenças na cultura da soja.** In: Embrapa Soja-Artigo em anais de congresso (ALICE). In: JORNADA

ACADÊMICA DA EMBRAPA SOJA, 11. 2016, Londrina. Resumos expandidos... Londrina: Embrapa Soja, 2016.

COMPANT, S.; MITTER, B.; COLLI-MULL, J.G.; GANGL, H; SESSITSCH, A. **Endophytes of grapevine flowers, berries, and seeds: identification of cultivable bacteria, comparison with other plant parts, and visualization of niches of colonization.** Microbial Ecology , v. 62, p. 188-197, 2011.

COQUE JJR, ÁLVAREZ-PÉREZ JM, COBOS R, GONZALEZ-GARCIA S, IBANÉZ AM, DIEZ G A, CALVO-PEÑA C. **Advances in the control of phytopathogenic fungi that infect crops through their root system.** Adv Appl Microbiol. 111:123-170. doi: 10.1016/bs.aambs.2020.01.003. Epub 2020 Feb 10. PMID: 32446411. 2020

CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). **Produção nacional de grãos é estimada em 312,2 milhões de toneladas na safra 2022/23.** Publicado: Quinta, 08 de Dezembro de 2022, 09h00. Acesso em: 10 de maio de 2023.

COSTA, P. B. et al. **A model to explain plant growth promotion traits: a multivariate analysis** of 2,211 bacterial isolates. PLOS ONE, v. 9, n. 12, 2014.

DORRANCE A. E. et al. **Temperature, moisture, and seed treatment effects on *Rhizoctonia solani* root rot of soy bean.** Plant Disease, v. 87, p. 533–8, 2003.

ECOLOGY, Pathology and Disease Control. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p. 149–62, 1996.

EMBRAPA. VII **Plano diretor da Embrapa: 2020 - 2030** / Embrapa. Brasília, DF: Embrapa, 2020. 31 p. : il. color.;?. 2020. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/217274/1/VII-PDE-2020.pdf> . Acesso em 28 de mai de 2023.

EMBRAPA, Soja. **Tecnologias de produção de soja-Paraná-2001/2002.** Embrapa Soja-Documents (INFOTECA-E), 2001.

BONATO Ê R. & BONATO A L. **A Soja no Brasil: História e Estatística.** EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Londrina, PR Vinculada ao Ministério da Agricultura C)) Centro Nacional de Pesquisa de 50;' - CNPSo. 1987.

ERPER, İSMAIL & ÖZKOÇ, İBRAHİM & KARACA, GUESEL. **Identification and pathogenicity of *Rhizoctonia* species isolated from bean and soybean plants in Samsun, Turkey.** Archives of Phytopathology and Plant Protection. 44. 78-84. 10.1080/03235400903395427. (2011).

FENILLE, ROSELI C. **Caracterização citomorfológica, cultural, molecular e patogênica de *Rhizoctonia solani* Kühn associado à soja no Brasil.** 2001.

FUTUYA, N., KUSHIMA, Y., TSUCHIYA, K. *et al* **Protection of tomato seedling by pre-treatment with *Pseudomonas glumae* from infection with *Pseudomonas solanacearum* and its mechanisms.** Annals of the Phytopathological Society of Japan, Tokyo, v. 57, n. 3, p. 363-370, 1991.

GAGNE-BOURGUE F. *et al.* **Isolation and characterization of indigenous endophytic bacteria associated with leaves of switchgrass (*Panicum virgatum* L.) cultivars.** Journal of Applied Microbiology, v. 114, 3. Ed., p.836-853, 2013.

GLICK, B. R. **Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world.** Microbiological Research, v. 169, n. 1, p. 30-39, 2014.

GLICK, B. R. **Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications.** Scientifica, v. 2012, 2012.

GLICKMANN, E. E DESSAUX, Y. **Um exame crítico da especificidade do reagente Salkowski para compostos indólicos produzidos por bactérias fitopatogênicas.** Microbiologia Aplicada e Ambiental, 61, 793-796. 1995.

HAGEN, R.M., GAUTHIER, Y.P., SPRAGUE, L.D., VIDAL, D.R., ZYSK, G., FINKE, E.J., NEUBAUER, H. **Strategies for PCR based detection of *Burkholderia pseudomallei* DNA in paraffin wax embedded tissues.** Mol Pathol 55, 398-400. 2002.

HARDOIM, P. R.; VAN OVERBEEK, L. S.; ELSAS, J. D. VAN. **Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth.** Trends in Microbiology, v. 16, n. 10, p. 463–471, 2008.

HAYAKAWA, M.; YOSHIDA, Y. and Iimura, Y. **Selective isolation of bioactive soil actinomycetes belonging to the *Streptomyces violaceusniger* phenotypic cluster.** J. Appl. Microbiol. 96:973-981. 2004.

HENNING, A. A. *et al.* **Manual de identificação de doenças da soja.** Embrapa Soja, Documentos, n. 256, 2014. Disponível em: < <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/105942/1/Doc256-OL.pdf> >, acesso em: 24/04/2023.

HERNANDEZ, A. G. *et al.* **Selection and characterization of coal mine autochthonous rhizobia for the inoculation of herbaceous legumes.** Archives of microbiology. v.199, n. 7, p. 991-1001, 2017.

HERNÁNDEZ, A. G. **Rizóbios autóctones de áreas de mineração de carvão no crescimento e na microbiota de leguminosas herbáceas empregadas na revegetação de áreas degradadas.** Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina. 2019.

HOITINK, H. A. J.; INBAR, Y.; BOEHM, M. J. **Status of compost-amended potting mixes naturally suppressive to soil borne diseases of floricultural crops.** Plant Disease, v. 75, p. 869–73, 1991.

HOWARD, G., ET AL. **Fatores de risco que contribuem para a contaminação microbiológica de águas subterrâneas rasas em Kampala, Uganda.** Pesquisa Hídrica, 37, 3421-3429. 2003.

HWANG, S. F.; HOWARD, R. J.; CHANG, K. F. **Forage and oil seed legume diseases incited by *Rhizoctonia* species.** In: Sneh B, Jabaji-Hare S, Neate S, Dijst G, eds. *Rhizoctonia Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control.* Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p. 289–301, 1996.

JAIN, S., VAISHNAV, A., VARMA, A. & CHOUDHARY, D. K. **Comparative expression analysis of defence-related genes in *Bacillus*-treated *Glycine max* upon challenge inoculation with selective fungal phytopathogens.** Current science, 115(10), 1950. 2018.

KATARIA, H. R.; GISI, U. **Chemical control of *Rhizoctonia* species.** In: Parmeter J. J. R., ed. *Rhizoctonia Species: Taxonomy, Molecular Biology. Ecology, Pathology and Disease Control.* Berkeley, CA, USA: California Press, p. 537–47, 1996.

KEIJER J. **The initial steps of the infection process in *Rhizoctonia solani*.** In: Sneh B, Jabaji-Hare S, Neate S, Dijst G, eds. *Rhizoctonia Species: Taxonomy, Molecular Biology,*

KORTEKAMP, A. **Unexpected side effects of herbicides: modulation of plant-pathogen interactions.** In. KORTEKAMP, A. (Ed.). *Herbicides and environment.* Rijeka: InTech, p. 85-104. 2011.

LAZZARETI, E.; BETTIOL, W. **Tratamento de sementes de arroz, trigo, feijão e soja com um produto formulado à base de célula de *Bacillus subtilis*.** Scientia Agricola, Piracicaba, v. 54, p. 89-96, 1997.

LES N.; HENNEBERG L.; NADAL V G R.; MULLER M.; SZEMOCOWIAKI A G.; CARNEIRO F T. **Controle de *Rhizoctonia solani* com produtos biológicos no tratamento de sementes na cultura da soja.** Basilian journal Development. Curitiba, v. 6, n. 12, p.99919- 99935 dec. 2020.

LOPES, UEDER P; MICHEREFF, SAMI J (ed). **Desafios do manejo de doenças radiculares causadas por fungos.** Recife: EDUFRPE, 208 p., il. 2018.

LUDWIG, L.; MOURA, A. B.; GOMES, C. B. **Potencial da microbiolização de sementes de arroz com rizobactérias para o biocontrole do nematoide das galhas.** Tropical Plant Pathology, vol. 38, 3 ed., p. 264-268, 2013.

MARCHESI JR, SATO T, WEIGHTMAN AJ, MARTIN TA, FRY JC, HIOM SJ, DYMOCK D, WADE WG. **Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S 92 rRNA.** Applied and Environmental Microbiology, v. 64, n. 2, p. 795-799, 1998.

MA, X., WANG, X., CHENG, J., NIE, X., YU, X., ZHAO, Y., & WANG, W. **Microencapsulation of *Bacillus subtilis* B99-2 and its biocontrol efficiency against *Rhizoctonia solani* in tomato.** *Biological control*, 90, 34-41. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.05.013>. 2015.

MARIANO, R.L.R. **Métodos de seleção in vitro para o controle microbiológico de patógenos de plantas.** *Revisão Anual de Patologia de Plantas*. Passo Fundo, v.1, p. 369-409, 1993.

MELO, I. **Embrapa meio ambiente: Endofíticos.** *Portal Embrapa, 2021*. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: <https://www.embrapa.br/en/agencia-de-informacao-tecnologica/tematicas/agricultura-e-meio-ambiente/manejo/recursos-geneticos/endofiticos>. Acesso em 28 de mar de 2023.

MEYER, M C. BUENO, A DE F. MAZARO, S M. SILVA, JC. **Bioinsumos na cultura da soja.** Brasília, DF: 1ª edição: Embrapa. 550 p. ISBN: 978-65-87380-96-4. PDF digitalizado. 2022.

MIRANSARI, M. **Soil microbes and the availability of soil nutrients.** *Acta Physiologiae Plantarum*, Paris, v. 35, p. 3075-3084, 2013.

MOURA, G. G. D.; et al. **Rhizobia isolated from coal mining areas in the nodulation and growth of leguminous trees.** *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 40, 2016

NASCIMENTO., F. X. I. **Promoting plant growth using ACC deaminase-producing bacteria: insights into plant-bacterial interactions and agricultural and biotechnological applications.** 2018. Tese de doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2018.

ØVREÅS, L.; FORNEY, L.; DAAE, F.L.; TORSVIK, V. **Distribution of bacterioplankton in meromictic Lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA.** *Applied and Environmental Microbiology*, v. 63, p. 3367-3373, 1997.

PARMETER J. R., WHITNEY H. S. **Taxonomy and nomenclature of the imperfect state.** In: Parmeter JR, ed. *Rhizoctonia solani, Biology and Pathology*. Berkeley, CA, USA: University of California Press, p. 7–19, 1970.

PATTEN, C. L.; GLICK, B.R. **Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system.** *Appl. Environ. Microbiol.* v. 68, n. 8, p.:3795-801, 2002.

SANTOS, T T; VARVALHO M A. **Aplicação de microrganismos endofíticos na agricultura e na produção de substâncias de interesse econômica.** *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, Londrina, v. 32, n.2, p.199-212. jul/dez. 2011.

SICUIA OA, CONSTANTINESCU F., CÓRNEA CP. **Biodiversidade do grupo *Bacillus subtilis* e características benéficas de espécies de *Bacillus* úteis na proteção de plantas.** ROM. *Biotehnologia. Vamos.* 20 10737–10750. 2015

S.A. PELIZZA, H. MEDINA, N.A. FERRERI, L.A. ELÍADES, M.E. POCCO, S.A. STENGLEIN, C.E. **Lange, Virulence and enzymatic activity of three new isolates of *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) from the South American locust *Schistocerca cancellata* (Orthoptera: Acrididae),** Journal of King Saud University - Science, Volume 32, Issue 1, Pages 44-47, ISSN 1018-3647, 2020

SILVA, E. P. **Caracterização de bactérias associativas da bracatinga (*Mimosa scabrella Benth.*) e potencial aplicação em áreas de mineração de carvão em recuperação.** Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Florianópolis, 2020.

SINGH, S.; SINGH, BB. **Efeito da suplementação de folhas de árvores na população microbiana ruminal, atividade enzimática e cinética da água em cabras alimentadas com feno de capim *Cenchrus ciliaris*** . Anima. Nutr. Tecnologia de Alimentação, 13 (1): 131-138, 2013.

SNEH, B; BURPEE, L.; OGOSHI, A. **Identification of *Rhizoctonia solani* species.** St Paul: APS Press, 1991.

SOUSA, V. Y. K. et al. **Preliminary molecular studies of the first report of *Burkholderia pseudomallei* isolation from soil collected in the Amapá State, in Northern Brazil.** Embrapa Amapá-Artigo em periódico indexado (ALICE), 2016.

SPADOTTO, B; STEFANO, D; PITTA, F; MENDONÇA, M L. **Desmatamento, grilagem de terra e financeirização: Impactos da expansão do monocultivo de soja no Brasil.** Rede social de justiça e direitos humanos. p 28. ISBN: 978-85-99022-08-5. Piauí. 2022.

TORRES, J. B.; MICHEREFF, S. J. **Desafios do manejo integrado de pragas e doenças.** Recife: S/ed, 2000.

TULLIO, A E. **Potencial de bactérias endofíticas do cacau para o controle de fungos de solo e promoção de crescimento radicular na cultura da soja.**Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Ponta Grossa para a obtenção do título de Mestre em Agronomia. Área de concentração em Fitopatologia. Ponta Grossa, , 79 f. 2017.

VAN KAN J. A. **Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen.** Trends in Plant Science, v.11, 5 ed., p. 247-253, mai. 2006.

VURUKONDA, S. S. K. P., et al. **Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria.** Microbiological research, v. 184, p. 13-24, 2016.

XING B, ZHENG Y, ZHANG M, LIU X, LI L, MOU C, WU Q, GUO H, SHAO Q.
Biocontrol: **Endophytic bacteria could be crucial to fight soft rot disease in the rare medicinal herb, *Anoectochilus roxburghii***. Microb Biotechnol. Dec;15(12):2929-2941. 2022.

WHIPPS, J.M. **Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere**. Journal of Experimental Botany ,2, p. 487-511, v. 5, 2001.

ZINNIEL, D. K. et al. **Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants**. Applied and Environmental Microbiology, v. 68, n. 5, p. 2198–2208, 2002.

