



UNIVERSIDADE FEDERAL DE RORAIMA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

MARCELO RIBEIRO DA SILVA

**SELEÇÃO DE GENÓTIPOS DE SOJA RESISTENTES À MELA
(*Rhizoctonia solani* AG1-IF E AG1-IA), PROMOÇÃO DE
CRESCIMENTO E BIOCONTROLE DA DOENÇA POR ISOLADOS
BACTERIANOS**

BOA VISTA - RR

2023

MARCELO RIBEIRO DA SILVA

**SELEÇÃO DE GENÓTIPOS DE SOJA RESISTENTES À MELA
(*Rhizoctonia solani* AG1-IF E AG1-IA), PROMOÇÃO DE
CRESCIMENTO E BIOCONTROLE DA DOENÇA POR ISOLADOS
BACTERIANOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Universidade Federal de Roraima, em parceria com a Embrapa Roraima, como pré-requisito para obtenção do título de Doutor em Agronomia, na área de concentração: Produção Vegetal.

Orientador: Pesquisador Dr. Daniel Augusto Schurt

Coorientador: Professor Dr. Paulo Cesar Ceresini

BOA VISTA - RR

2023

MARCELO RIBEIRO DA SILVA

**SELEÇÃO DE GENÓTIPOS DE SOJA RESISTENTES À MELA
(*Rhizoctonia solani* AG1-IF E AG1-IA), PROMOÇÃO DE
CRESCIMENTO E BIOCONTROLE DA DOENÇA POR ISOLADOS
BACTERIANOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Universidade Federal de Roraima, em parceria com a Embrapa Roraima, como pré-requisito para obtenção do título de Doutor em Agronomia, na área de concentração: Produção Vegetal. Defendida em 12 de dezembro de 2022 e avaliada pela seguinte banca examinadora:

Pesq. Dr. Daniel Augusto Schurt

Orientador - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Pesq^a. Dra. Hyanameyka Evangelista de Lima Primo

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Pesq. Dr. Bernardo de Almeida Halfeld Vieira

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Pesq^a. Dra. Kátia de Lima Nechet

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Prof^a. Dra. Kedma da Silva Matos

Universidade Federal de Roraima

Dedico este trabalho aos meus familiares pelo apoio e aos amigos por sempre estarem por perto, que de muitas formas me incentivaram e ajudaram para que fosse possível a concretização desta tese.

*A ferrovia que leva ao sucesso é
construída em cima de um solo de
humildade com pesados trilhos
chamados erros que somente são
fixados numa linha reta com
maciços pregos de perseverança.*

Eduardo Siqueira Filho

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por tudo, principalmente pela força, perseverança e objetivo o qual me concedeu.

A Universidade Federal de Roraima - UFRR, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES e a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA Roraima pela infraestrutura, fomento e compromisso com a pesquisa científica.

A minha família, em especial minha avó Maria das Dores Ribeiro, que sempre acreditou no meu esforço e potencial para alcançar o término da tese em Agronomia.

Aos meus orientadores o Pesquisador Dr. Daniel Augusto Schurt e o Professor Dr. Paulo Cesar Ceresini, por quem expresse admiração, respeito e carinho. Agradeço pela paciência, partilha de conhecimento e ensinamentos para a vida.

Aos amigos do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - POSAGRO e da EMBRAPA Roraima, Elias Ariel, Ramila Santana, Meiricely Marques, Nathalya Lúcia, Rosianne Nara Thomé, Gabriela Pelzer, Maria Xavier, Moriele Ladislau, Victor Castro, enfim toda a equipe do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Roraima, pelo companheirismo, amizade e constate apoio na execução deste trabalho.

Aos funcionários da EMBRAPA Roraima, em especial, Giovanni Ribeiro de Souza, Rita de Cássia Pompeu de Sousa, Adebaldo Sampaio Teles, Eliane do Nascimento Cunha Farias, Márcio André de Melo e Silva e Ilda Maria Sobral de Almeida, pela ajuda e amizade, durante a condução deste trabalho.

Ao nosso querido auxiliar administrativo do POSAGRO, Ismael Costa, que sempre nos ajudou solucionando quaisquer problemas, facilitando o intermédio do discente com todo o corpo docente da pós-graduação.

A minha companheira Evezania Lino, pelo apoio e incentivo, na concretização desse sonho.

Muito obrigado a todos!!!

RESUMO

A cultura da soja está presente em todas as regiões brasileiras, contudo o fungo *Rhizoctonia solani* causador da mela da soja é considerado uma das principais doenças no estado de Roraima. Neste contexto, o uso de genótipos de soja resistentes a mela é uma alternativa essencial para a manutenção do sistema produtivo da cultura. Além disso, existe o interesse por bactérias no biocontrole da doença, por ser uma alternativa ao controle químico e, bactérias promotoras de crescimento de plantas associadas ao biocontrole da mela. Assim, o objetivo do trabalho foi selecionar em dois períodos distintos genótipos de soja resistentes ao fungo *R. solani* (AG1-IF e AG1-IA), analisar bactérias isoladas de plantas de soja e arroz para o biocontrole da *R. solani* e verificar a promoção de crescimento da soja pelos isolados bacterianos. Os experimentos foram conduzidos no laboratório de fitopatologia e em casa de vegetação da Embrapa Roraima. No primeiro capítulo, os genótipos de soja foram cultivados em vasos de plástico, utilizando o delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições, onde cada repetição foi constituída por uma planta de soja. Na execução do Experimento I, em períodos distintos, foram utilizados 94 tratamentos (genótipos de soja) inoculados com *R. solani* (AG1-IF) e, posteriormente, 26 tratamentos inoculados com *R. solani* (AG1-IA), no qual foi possível ocorrer a germinação dos genótipos. No Experimento II, conduzido no mesmo período, foram testados 34 tratamentos (genótipos de soja), inoculados com os mesmos patógenos de *R. solani* (AG1-IF) e (AG1-IA). No segundo capítulo, para o controle biológico da doença foram utilizados 171 bactérias, no qual efetuados o teste de antibiose e a produção de compostos voláteis *in vitro*. De posse dos melhores isolados bacterianos foi verificado a capacidade de solubilização de fosfato, a produção de quitinase e a produção de ácido indol acético *in vitro*. Em seguida, foi analisado a produção de metabólitos termoestáveis *in vitro*, depois foi realizado a microbiolização das sementes de soja e, observado a promoção de crescimento de plantas de soja em casa de vegetação. Posteriormente, investigado o período de incubação, incidência e severidade das plantas de soja pulverizadas com os isolados bacterianos e analisado área abaixo da curva do progresso da doença na capacidade de biocontrole da em casa de vegetação. Por fim, a identificação molecular dos melhores isolados bacterianos. Assim, no primeiro capítulo, não houve diferença no período de incubação da mela, no qual todas as plantas de soja apresentaram incidência de 100% dos sintomas da mela. A severidade e as respostas de resistência dos genótipos de soja foram diferentes entre os dois períodos no controle da *R. solani*. No experimento conduzido em diferentes períodos, a severidade da doença variou de <5 a 50% e 11 a >50% de área foliar

infectada para *R. solani* (AG1-IF) e (AG1-IA), respectivamente. No experimento conduzido no mesmo período, a severidade da mela foi entre 6 a 50% e <5 a 30% de área foliar infectada para *R. solani* (AG1-IF) e (AG1-IA), respectivamente. Já no segundo capítulo, foi possível selecionar isolados bacterianos de plantas de soja com potencial para o biocontrole da *R. solani*. No teste de antibiose, produção de compostos voláteis e produção de metabólicos termoestáveis *in vitro*, os isolados bacterianos foram responsáveis por inibir o crescimento micelial de *R. solani* (AG1-IF e AG1-IA) superior a 50%. Isolados bacterianos, testaram positivos para capacidade de solubilização de fosfato e a produção de ácido indol acético, exceto a produção de quitinase. Na microbiolização das sementes de soja, foram observados incrementos percentuais da massa fresca das sementes a partir de 130%. Na capacidade de promoção de crescimento da soja, foi influenciada na variável do diâmetro do caule. Nos componentes da massa seca da planta, foram observados incrementos percentuais a partir de 120%. Na capacidade de biocontrole da mela da soja, o período de incubação foi nas primeiras 48 h, no qual todas as plantas apresentaram incidência de 100% dos sintomas da mela. A área abaixo da curva do progresso da doença apresentou uma redução na severidade da mela (*R. solani* AG1-IF e AG1-IA) a partir de 44%.

Palavras-chave: Antibiose. *Glycine max*. Incidência. Incubação. Produção de metabólicos termoestáveis. Severidade da Mela.

ABSTRACT

The soybean crop is present in all Brazilian regions, but the fungus *Rhizoctonia solani* that causes soybean blight is considered one of the main diseases in the state of Roraima. In this context, the use of mildew-resistant soybean genotypes is an essential alternative for maintaining the crop's productive system. In addition, there is interest in bacteria in the biocontrol of the disease, as an alternative to chemical control, and bacteria that promote plant growth associated with the biocontrol of mela. Thus, the objective of this study was to select soybean genotypes resistant to the fungus *R. solani* (AG1-IF and AG1-IA) in two different periods, to analyze the bacteria learned from soybean and rice plants for the biocontrol of *R. solani* and to verify the growth promotion of soybean by bacterial isolates. The experiments were treated in the plant pathology laboratory and in a greenhouse at Embrapa Roraima. In the first chapter, soybean genotypes were cultivated in plastic pots, using a completely randomized design with four replications, where each replication was fixed by a soybean plant. In the execution of Experiment I, in different periods, 94 treatments (soybean genotypes) inoculated with *R. solani* (AG1-IF) were used and, later, 26 treatments inoculated with *R. solani* (AG1-IA), in which it was possible to occur the germination of the genotypes. In Experiment II, treated in the same period, 34 treatments (soybean genotypes) were tested, inoculated with the same pathogens of *R. solani* (AG1-IF) and (AG1-IA). In the second chapter, for the biological control of the disease, 171 bacteria were used, in which we wanted the antibiosis test and the production of volatile compounds *in vitro*. In possession of the best bacterial isolates, the ability to solubilize phosphate, the production of chitinase and the production of indole acetic acid *in vitro* was verified. Then, the production of thermostable metabolites *in vitro* was analyzed, after which the microbiolization of the soybean seeds was carried out, and the promotion of the growth of soybean plants in a greenhouse was observed. Subsequently, the incubation period, incidence and severity of soybean plants sprayed with bacterial isolates were investigated and analyzed below the curve of disease progress in the biocontrol capacity of the greenhouse. Finally, a molecular identification of the best bacterial isolates. Thus, in the first chapter, there was no difference in the period of mela incubation, in which all soybean plants had a 100% incidence of mela symptoms. The severity and resistance responses of the soybean genotypes were different between the two periods in the control of *R. solani*. In the controlled experiment at different periods, disease severity ranged from <5 to 50% and 11 to >50% of infected leaf area for *R. solani* (AG1-IF) and (AG1-IA), respectively. In the controlled experiment in the

same period, the severity of mela was between 6 to 50% and <5 to 30% of infected leaf area for *R. solani* (AG1-IF) and (AG1-IA), respectively. In the second chapter, it was possible to select bacteria isolated from soybean plants with potential for biocontrol of *R. solani*. In the antibiosis test, production of volatile compounds and production of thermostable metabolites *in vitro*, the bacterial isolates were responsible for inhibiting the mycelial growth of *R. solani* (AG1-IF and AG1-IA) by more than 50%. Bacterial isolates tested positive for phosphate solubilization capacity and indole acetic acid production, except for chitinase production. In the microbiolization of soybean seeds, percentage increments of seed fresh mass were observed from 130%. In soybean growth promotion capacity, it was influenced by the stem diameter variable. In the components of the dry mass of the plant, percentage increments were observed from 120%. In the soybean blight biocontrol capacity, the incubation period was the first 48 h, in which all plants showed a 100% incidence of blight symptoms. The area under the disease progress curve showed a reduction in mela severity (*R. solani* AG1-IF and AG1-IA) from 44%.

Keywords: Antibiosis. Glycine max. Incidence. Incubation. Mela Severity. Production of thermostable metabolites.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Localização da área de estudo no Estado de Roraima, com avaliação de resistência de genótipos de soja à mela (<i>Rhizoctonia solani</i> AG1-IF e AG1-IA) em condições de casa de vegetação.	37
Figura 2 - Avaliação da severidade da mela da soja pela porcentagem da área foliar infectada.	41
Figura 3 - Amostras de diferentes partes vegetativas de soja colocadas separadamente em Erlenmeyers contendo solução salina na câmara de fluxo.	61
Figura 4 - Diluição seriada das amostras de soja na câmara de fluxo.	61
Figura 5 - Teste de antibiose <i>in vitro</i> em meio de cultura BDA formando uma zona de inibição com diferentes bactérias nas extremidades da placa de Petri e <i>R. solani</i> no centro.	63
Figura 6 - Produção de compostos voláteis <i>in vitro</i> por bactéria em meio de cultura 523 formando uma zona de inibição do micélio de <i>R. solani</i> em meio BDA.	64
Figura 7 - Capacidade de solubilização de fosfato <i>in vitro</i> em meio NBRIP com diferentes bactérias nas extremidades e no centro da placa de Petri com formação de halo transparente.	65
Figura 8 - Produção de quitinase <i>in vitro</i> em meio mineral de Renwick contendo quitina coloidal com diferentes bactérias nas extremidades e no centro da placa de Petri.	66
Figura 9 - Produção de Ácido Indol Acético em meio de cultura DYGS com diferentes bactérias em cavidades da placa ELISA com a presença da coloração rosa.	67
Figura 10 - Produção de metabólitos termoestáveis <i>in vitro</i> em meio BDA com a inibição do crescimento micelial de <i>R. solani</i> no centro da placa de Petri.	68
Figura 11 - Microbiolização das sementes de soja por isolados bacterianos da soja e arroz após três dias da semente. A - Início da germinação e da radícula; B - Germinação completa e o desenvolvimento da radícula; C - Massa fresca da semente.	69
Figura 12 - Promoção de crescimento de plantas de soja por isolados bacterianos da soja e arroz em condições de casa de vegetação. A - Contagem do número de folhas; B - Altura da parte aérea; C - Diâmetro do caule.	70
Figura 13 - Plantas de soja representativas dos tratamentos com 30 dias após o plantio. A - Colheita da parte aérea e do sistema radicular; B - Massa seca da parte aérea; C - Massa seca do sistema radicular.	71

Figura 14 - Pulverização das plantas de soja com os isolados bacterianos após 20 dias do plantio.	72
Figura 15 - Inoculação das plantas de soja com os isolados de <i>R. solani</i>	73
Figura 16 - Avaliação da severidade da mela da soja pela porcentagem da área foliar infectada.	75
Figura 17 - Inibição do crescimento micelial <i>in vitro</i> por isolados bacterianos da soja (S) e arroz (A). A - Inibição de <i>R. solani</i> (AG1-IF) pelos 13 isolados bacterianos; B - Inibição de <i>R. solani</i> (AG1-IA) pelos 20 isolados bacterianos.	81
Figura 18 - Inibição do crescimento micelial <i>in vitro</i> por isolados bacterianos do arroz (A). A - Inibição do crescimento de <i>R. solani</i> (AG1-IF) por dois isolados bacterianos; B - Inibição do crescimento de <i>R. solani</i> (AG1-IA) por quatro isolados bacterianos.	84
Figura 19 - Capacidade de solubilização de fosfato <i>in vitro</i> em meio NBRIP com diferentes bactérias nas extremidades e no centro da placa de Petri com formação de halo transparente.	87
Figura 20 - Produção de Ácido Indol Acético em meio de cultura DYGS com diferentes bactérias em cavidades da placa ELISA com a presença da coloração rosa.	88
Figura 21 - Produção de metabólitos termoestáveis <i>in vitro</i> por bactérias da soja (S) e arroz (A). A - Inibição do crescimento micelial de <i>R. solani</i> (AG1-IF) pelo isolado 126A. B - Inibição do crescimento micelial de <i>R. solani</i> (AG1-IA) pelos isolados 98A e 127S.	91
Figura 22 - Área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD) após a inoculação com <i>R. solani</i> (AG1-IF) em plantas de soja pulverizadas com isolados bacterianos em casa de vegetação. Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.	101
Figura 23 - Área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD) após a inoculação com <i>R. solani</i> (AG1-IA) em plantas de soja pulverizadas com isolados bacterianos em casa de vegetação. Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Severidade e as respostas de resistência dos 94 genótipos de soja à mela <i>R. solani</i> (AG1-IF) em casa de vegetação no estado de Roraima.....	42
Tabela 2 - Severidade e as respostas de resistência dos 26 genótipos de soja à mela <i>R. solani</i> (AG1-IA) em casa de vegetação no estado de Roraima.	45
Tabela 3 - Severidade dos 34 genótipos de soja à mela <i>R. solani</i> (AG1-IF) e (AG1-IA) em casa de vegetação no estado de Roraima.....	46
Tabela 4 - Respostas de resistência dos 34 genótipos de soja à mela <i>R. solani</i> (AG1-IF) e (AG1-IA) em casa de vegetação no estado de Roraima.	47
Tabela 5 - Isolados bacterianos de genótipos de soja e arroz em Roraima.	77
Tabela 6 - Teste de antibiose (mm) <i>in vitro</i> de <i>R. solani</i> (AG1-IF) e (AG1-IA) por isolados bacterianos da soja e arroz.....	79
Tabela 7 - Inibição do crescimento micelial de <i>R. solani</i> (AG1-IF) e (AG1-IA) com os melhores isolados bacterianos.....	80
Tabela 8 - Produção de compostos voláteis <i>in vitro</i> por isolados bacterianos da soja e arroz e a inibição do crescimento micelial de <i>R. solani</i> (AG1-IF) e (AG1-IA).	83
Tabela 9 - Avaliação dos mecanismos de ação de bactérias isoladas de plantas de soja e arroz.	85
Tabela 10 - Produção de metabólitos termoestáveis <i>in vitro</i> por bactérias da soja e arroz e a inibição do crescimento micelial de <i>R. solani</i> (AG1-IF) e (AG1-IA).	89
Tabela 11 - Microbiolização das sementes de soja por isolados bacterianos da soja e arroz em caixa gerbox.....	92
Tabela 12 - Promoção de crescimento de plantas de soja aos 10, 20 e 30 dias por intermédio de isolados bacterianos da soja e arroz em condições de casa de vegetação em Boa Vista - Roraima.	95
Tabela 13 - Capacidade de promoção de crescimento de plantas de soja por intermédio de isolados bacterianos da soja e arroz em condições de casa de vegetação em Boa Vista - Roraima.	98

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVO	19
2.1 Objetivo Geral.....	19
2.2 Objetivos Específicos	19
3. JUSTIFICATIVA	20
4. REFERENCIAL TEÓRICO	21
4.1 Cultura da soja	21
4.2 <i>Rhizoctonia solani</i> Kühn.....	21
4.3 Mela da soja	23
4.4 Resistência de cultivares de soja.....	24
4.5 Controle biológico por isolados bacterianos.....	25
5. REFERÊNCIAS	28
6. CAPÍTULO 1: AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE GENÓTIPOS DE SOJA À MELA (<i>Rhizoctonia solani</i> AG1-IA e AG1-IF) EM CONDIÇÕES DE CASA DE VEGETAÇÃO	33
7. INTRODUÇÃO	35
8. MATERIAL E MÉTODOS	37
8.1 Localização da Área de Estudo.....	37
8.2 Obtenção de Sementes de Soja	38
8.3 Avaliação de Resistência de Genótipos de Soja em Casa de Vegetação	38
8.3.1 Delineamento Experimental.....	38
8.3.2 Correção da Acidez e do Solo	38
8.3.3 Produção do Inóculo de <i>Rhizoctonia solani</i> (AG1-IF e AG1-IA)	39
8.3.4 Condução Experimental em Casa de Vegetação.....	39
8.4 Avaliação da Incubação da Mela nos Genótipos de Soja	40
8.5 Avaliação da incidência da Mela nos Genótipos de Soja	40
8.6 Avaliação da Severidade e Respostas de Resistência da Mela nos Genótipos de Soja ..	40
8.7 Análise Estatística.....	41
9. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
9.1 Experimento I - Avaliação da Incubação, da Incidência, da Severidade e as Respostas de Resistência da Mela (<i>R. solani</i> AG1-IF) em Diferentes Períodos	42

9.2 Experimento I - Avaliação da Incubação, da Incidência e da Severidade da Mela e as Respostas de Resistência (<i>R. solani</i> AG1-IA) em Diferentes Períodos.....	44
9.3 Experimento II - Avaliação da Incubação, da Incidência e da Severidade da Mela <i>R. solani</i> (AG1-IF) e (AG1-IA) no Mesmo Período.....	45
9.4 Experimento II - Respostas de Resistência da Mela <i>R. solani</i> (AG1-IF) e (AG1-IA) no Mesmo Período.....	46
10. CONCLUSÕES.....	51
11. REFERÊNCIAS	52
12. CAPÍTULO 2: BIOCONTROLE DE <i>Rhizoctonia solani</i> (AG1-IF e AG1-IA) NA SOJA POR ISOLADOS BACTERIANOS E A PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO	56
13. INTRODUÇÃO	58
14. MATERIAL E MÉTODOS	60
14.1 Localização da Área de Estudo.....	60
14.2 Coletas de plantas de soja.....	60
14.3 Controle biológico in vitro de <i>R. solani</i>	60
14.3.1 Isolamento de Bactérias do Filoplano e do Rizoplano.....	60
14.4 Mecanismos de Biocontrole de <i>Rhizoctonia solani</i> (AG1-IF e AG1-IA).....	62
14.4.1 Teste de Antibiose.....	62
14.4.2 Produção de Compostos Voláteis.....	63
14.4.3 Análise Estatística	64
14.5 Capacidade de Solubilização de Fosfato (CSF).....	64
14.6 Produção de Quitinase (PQ).....	65
14.7 Produção de Ácido Indol Acético (AIA).....	66
14.8 Produção de Metabólitos Termoestáveis (MT)	67
14.9 Microbiolização das Sementes de Soja em Caixa Gerbox	68
14.9.1 Capacidade de Promoção de Crescimento de Plantas em Condições de Casa de Vegetação.....	69
14.10 Capacidade de Biocontrole in vivo da Mela da Soja (<i>R. solani</i> AG1-IF e AG1-IA) em Casa de Vegetação	71
14.10.1 Produção dos Isolados Bacterianos	71
14.10.2 Produção do Inóculo de <i>R. solani</i> (AG1-IF) e (AG1-IA)	71
14.10.3 Delineamento Experimental.....	72
14.10.4 Condução Experimental em Casa de Vegetação.....	72
14.10.5 Avaliação da Incubação no Biocontrole <i>in vivo</i> da Mela.....	74

14.10.6 Avaliação da incidência no Biocontrole <i>in vivo</i> da Mela.....	74
14.10.7 Avaliação da Severidade e as Respostas de Resistência no Biocontrole <i>in vivo</i> da Mela.....	74
14.10.8 Área Abaixo da Curva do Progresso da Doença (AACPD).....	75
14.10.9 Análise Estatística	75
14.11 Extração do DNA dos Isolados Bacterianos	76
14.11.1 Amplificação do Gene 16S rDNA	76
15. RESULTADOS E DISCUSSÃO	77
15.1 Isolamento de Bactérias do Filoplano e do Rizoplano	77
15.2 Teste de Antibiose	78
15.3 Produção de Compostos Voláteis	82
15.4 Avaliação da Solubilização de Fosfato, Produção de Quitinase e de Ácido Indol acético	85
15.5 Capacidade de Solubilização de Fosfato.....	86
15.6 Produção de Ácido Indol Acético	87
15.7 Produção de Metabólitos Termoestáveis	88
15.8 Microbiolização das Sementes de Soja em Caixa Gerbox	92
15.9 Capacidade de Promoção de Crescimento de Plantas em Condições de Casa de Vegetação.....	94
15.10 Avaliação da Incubação, da Incidência, da Severidade da Mela <i>R. solani</i> (AG1-IF e AG1-IA) e a Área Abaixo da Curva do Progresso da Doença	100
16. CONCLUSÃO.....	106
17. REFERÊNCIAS	108

1. INTRODUÇÃO

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] é uma das mais importantes leguminosas produzida atualmente, apresentando grande interesse econômico mundial, em razão da ampla utilização de seus grãos, e excelente adaptação em diversas regiões (BIANCO *et al.*, 2012; BORNHOFEN *et al.*, 2015). É uma oleaginosa rica em proteína (BAMJI; CORBITT, 2017), indispensável na alimentação humana e animal, também como fonte de energia na produção de biocombustível (ABDULKHANI *et al.*, 2015).

A cultura é uma das principais cultivadas nas regiões tropicais e subtropicais, sendo os quatro patógenos mais frequentes que afetam o rendimento da cultura são a *Rhizoctonia* spp., *Fusarium* spp., *Pythium* spp. e *Phytophthora* spp. (KOENNING; WRATHER, 2010). No estado de Roraima, a cultura da soja vem sendo implantada nas áreas de cerrado e mata de transição, no qual a safra coincide com o período chuvoso sob condições favoráveis das principais doenças da cultura, em especial, pelo fungo *Rhizoctonia solani* Kühn [teleomorfo: *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk] (NECHET *et al.*, 2008).

Esse fungo, causador da doença conhecida como rizoctoniose, requeima ou mela da soja, promove a podridão da raiz e da base das hastes, *damping-off* na pré e pós-emergência ou morte em reboleira (WOICIECKOSKI; COSTA, 2016), além da podridão de sementes (GOULART, 2018). A doença é causada em solos contaminados com escleródios e fragmentos de micélio que crescem ao longo da superfície da planta, alcançando a parte superior e se espalhando por toda a planta (COPLEY *et al.*, 2017).

A classificação de *R. solani* é realizada com base na fusão entre as hifas, o que permite a classificação em 14 grupos de anastomose (AGs) (MONTERO-TAVERA *et al.*, 2013; AJAYI-OYETUNDE; BRADLEY, 2018), no qual AG1 foi dividido nos seguintes subgrupos intraespecíficos: IA, IB, IC, ID, IE e IF (YANG; LI, 2012; WIBBERG *et al.*, 2013).

A disponibilidade de genótipos de soja resistente à doença é limitada (ROESE *et al.*, 2018), além da carência de informações sobre os componentes moleculares responsáveis pela suscetibilidade ou resistência da soja aos isolados de *Rhizoctonia* (COPLEY *et al.*, 2017).

Atualmente, cresce o interesse pelo controle biológico de doenças de plantas, por ser uma alternativa ao controle químico (SOUSA *et al.*, 2017), no qual utiliza microrganismos, particularmente, bactérias endofíticas isoladas de uma variedade de plantas saudáveis no cultivo (SADRATI *et al.*, 2013). Os mecanismos de ação contra os fitopatógenos são por meio do parasitismo, antibiose e competição, além da atuação como indutores de resistência das plantas contra doenças (MACHADO *et al.*, 2012).

Assim, pesquisas com bactérias do filoplano têm demonstrado resultados promissores no controle de doenças fúngicas e bacterianas, atuando como indutores de resistência mediante os mecanismos de antagonismo, como a competição e antibiose (LANNA FILHO *et al.*, 2010). Além disso, existem bactérias que, quando associadas às raízes, são capazes de induzir efeitos positivos sobre o crescimento e a aptidão das plantas, denominadas rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (PII *et al.*, 2015).

O gênero *Bacillus* sp. é uma das rizobactérias mais importantes para aumentar o crescimento, a germinação, o desenvolvimento e o rendimento das culturas por meio da produção de substâncias que melhoram a nutrição das plantas (GAGNÉ-BOURQUE *et al.*, 2015). No controle biológico, os isolados do gênero *Bacillus* e *Burkholderia* foram eficazes em antagonizar *R. solani* na cultura da soja (LOPES *et al.*, 2018).

Diante do exposto, acredita-se que os novos genótipos de soja possuem alguma resposta de resistência ou suscetibilidade aos fungos de *R. solani* (AG1-IF) e (AG1-IA). Os isolados bacterianos inibem o crescimento micelial dos fungos, aumentam a resistência das plantas, contribuem na promoção de crescimento e, permitem sua utilização como agente de biocontrole da mela da soja.

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Selecionar genótipos de soja resistentes à mela (*Rhizoctonia solani* AG1-IF e AG1-IA), verificar a promoção de crescimento da soja por isolados bacterianos e o biocontrole da doença.

2.2 Objetivos Específicos

Determinar em dois períodos distintos a incubação, incidência e severidade em genótipos de soja inoculadas com *R. solani* (AG1-IF) e (AG1-IA) em casa de vegetação para verificar as respostas de resistência dos genótipos;

Obter de genótipos de soja isolados bacterianos das folhas, raízes, vagens e sementes como possíveis agentes de biocontrole de *R. solani* (AG1-IF) e (AG1-IA) *in vitro* e *in vivo*;

Testar a antibiose e a produção de compostos voláteis dos isolados bacterianos selecionados para o controle de *R. solani* (AG1-IF) e (AG1-IA) *in vitro*;

Verificar a capacidade de solubilização de fosfato, a produção de quitinase e a produção de ácido indol acético dos melhores isolados bacterianos *in vitro*;

Analisar a produção de metabólitos termoestáveis pelos isolados bacterianos no biocontrole da *R. solani* (AG1-IF) e (AG1-IA) *in vitro*;

Determinar a microbiolização das sementes de soja com os isolados bacterianos;

Observar a promoção de crescimento de plantas de soja mediadas pelos isolados bacterianos em casa de vegetação;

Investigar o período de incubação, incidência e severidade das plantas de soja pulverizadas com os isolados bacterianos e analisar área abaixo da curva do progresso da doença na capacidade de biocontrole da mela (*R. solani* AG1-IF e AG1-IA) em casa de vegetação.

Identificar molecularmente dos melhores isolados bacterianos;

3. JUSTIFICATIVA

A cultura da soja está presente em todas as regiões brasileiras com produção de grãos em diversas condições ambientais. O fungo *R. solani* causador da mela da soja é considerado uma das principais doenças da cultura, onde em determinados estados brasileiros como Maranhão, Mato Grosso, Piauí, Tocantins, Pará e Roraima, as perdas causadas pela mela podem variar de 31 a 60%.

No estado de Roraima, a doença se desenvolve bem nas condições locais, devido à combinação de temperatura elevada, clima chuvoso e distribuição das chuvas com frequência durante o ciclo da cultura, no qual são fatores determinantes para o surgimento e estabelecimento da doença. Diante dessa problemática, com o aumento do cultivo da soja em Roraima, houve também um crescimento do uso de agrotóxicos. O uso do controle químico tem sido a principal medida adotada, que apesar de eficiente e econômico pode gerar impactos ambientais, como a poluição do solo, águas e do próprio homem.

Além disso, existe a ausência de informações que ainda são incipientes sobre os novos genótipos de soja que podem ser resistentes ou susceptíveis a doença nas condições de Roraima. A resistência de genótipos de soja é uma alternativa essencial para a manutenção do sistema produtivo da cultura sem gerar impacto ao meio ambiente.

Por outro lado, cresce o interesse pelo controle biológico de doenças e a promoção do crescimento por agentes antagonistas, em especial, os isolados bacterianos do filoplano e as rizobactérias. Essa prática é uma possibilidade a ser investigada que pode ser adotada no manejo da mela com a existência de produtos biológicos registrados para o controle de *R. solani*. Nesse contexto, o presente estudo poderá contribuir com a comunidade científica, e sobretudo, com os produtores de soja.

4. REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 Cultura da soja

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é nativa do leste da Ásia, sendo uma leguminosa pertencente à família das fabáceas (SONAKAR *et al.*, 2014), excelente fonte de proteína para alimentação humana e animal, com oferta de óleo, no qual apresenta cultivo em diversas regiões do mundo (ALBRECH *et al.*, 2012; BIANCO *et al.*, 2012). O Brasil é o segundo maior produtor de soja, a cultura corresponde a *commodity* de maior importância no cenário agrícola brasileiro, contribuindo significativamente para o superávit da balança comercial (ARTUZO *et al.*, 2018).

A produtividade da cultura vem crescendo a cada ano, segundo a Conab (2022) a temporada 2021/22 mantém a tendência de crescimento de 3,8% em relação à safra passada, correspondendo ao plantio de 40.399,2 mil hectares. Isso se deve, às extensas áreas cultivadas a partir das décadas de 1970 e 1980 com a exploração do Cerrado brasileiro (MARIN *et al.*, 2015).

No estado de Roraima, a produção de soja tem importância significativa, por viabilizar os Cerrados ao sistema produtivo de grãos (BARBOSA *et al.*, 2010). Em 2021, ocorreu uma produção recorde estimada em 135,9 milhões de toneladas, no qual representou um incremento de 8,9% em relação à safra 2019/20, com produtividade estimada de 3.098 kg/ha (CONAB, 2021).

Entretanto, as doenças provocadas por fungos do solo são responsáveis por reduzir o rendimento e causar impacto significativo para quase todas as culturas (GOULART *et al.*, 2018), inclusive a cultura da soja está sujeita a diversas doenças que podem afetar seu potencial produtivo. Nesse contexto, uma das principais doenças da cultura no Estado é a mela da soja causada pelo fungo *Rhizoctonia solani* Kühn (NECHET *et al.*, 2008).

4.2 *Rhizoctonia solani* Kühn

O fungo *Rhizoctonia solani* Kühn [teleomorfo: *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk] pertence ao filo Basidiomycota, sendo um necrotrófico de origem onipresente no solo que causa danos a uma ampla gama de culturas economicamente importantes (AJAYI-OYETUNDE; BRADLEY, 2018). A morfologia do fungo consiste em longas ramificações septadas com formação de ângulos retos em suas hifas principais, sendo o fungo incolor na juventude e marrom quando desenvolvido (MONTERO-TAVERA *et al.*, 2013). Assim, as

espécies de *Rhizoctonia* podem ser diferenciadas pela cor dos micélios, número de núcleos e a morfologia do seu teleomorfo (YANG; LI, 2012).

A espécie *R. solani* produz escleródios como estrutura de sobrevivência que é castanha a negra composta por aglomerados de células incrustadas de melanina, de paredes espessas, formadas por ramificações repetidas de hifas laterais curtas e espessas, podendo ser produzidas em partes de plantas, sendo a temperatura um parâmetro considerável para o seu crescimento e desenvolvimento do fungo, juntamente com a produção de escleródios (SONAKAR *et al.*, 2014).

As espécies de *R. solani* demonstram divergência significativa em seus conteúdos genéticos, apesar de pertencerem à mesma classificação taxonômica (GHOSH *et al.*, 2014), o que permitiu sua classificação em 14 grupos somaticamente incompatíveis, denominados grupos de anastomose (AGs) composto por isolados que apresentam fusão de hifas entre si (AJAYI-OYETUNDE; BRADLEY, 2018). Com base em características como morfologia da colônia, bioquímica, genética e patogenicidade, o *R. solani* AG1 foi dividido em seis subgrupos intraespecíficos: IA, IB, IC, ID, IE e IF (YANG; LI, 2012; WIBBERG *et al.*, 2013).

Dentro do complexo de espécies *R. solani*, o grupo de anastomose AG1-IA é bem conhecido por causar doenças como a mela, queima da bainha, manchas marrons, ferrugem foliar, podridão da cabeça, ferrugem da folha em variedades de hospedeiros (YANG; LI, 2012). Um outro grupo recém descrito AG1-IF foi encontrado como o principal patógeno associado a doença em soja, feijão-caupi e brachiaria no estado de Roraima (CERESINI, 2014).

No estado de Roraima, em recente caracterização do perfil de ocorrência de doenças de plantas foi observado que *R. solani* é o patógeno mais frequente (HALFELD-VIEIRA *et al.*, 2011). Segundo Youssef *et al.* (2012), avaliando isolados de *Rhizoctonia* obtidos de plantas de feijão-caupi, soja, seringueira, melancia, alface e feijão-guandu com sintomas da doença no estado de Roraima, observaram grupamento de anastomose predominante de AG1 com isolados pertencentes aos subgrupos AG1-IA (feijão-caupi, soja e melancia), além do AG1-IB (feijão-caupi, soja, alface e feijão-guandu), sendo o isolado de seringueira não identificado como pertencente a nenhum dos padrões de anastomose.

No entanto, sabe-se da dificuldade de controle de *R. solani* devido a não homogeneidade da espécie que apresenta grande diversidade na sua morfologia, patogenicidade e fisiologia, além de informações insuficientes sobre as características do patógeno associado a doença (YOUSSEF *et al.*, 2012). Nesse sentido, pouco se sabe sobre os grupos de anastomoses e subgrupos de seus fungos (YANG; LI, 2012), especialmente o causador da doença da mela da soja no estado de Roraima.

4.3 Mela da soja

O fungo *Rhizoctonia solani*, é responsável por causar rizoctoniose, requeima ou mela na soja (WOICIECKOSKI; COSTA, 2016), no qual se estabelece devido as condições ambientais de temperatura e umidade relativa elevadas (YOUSSEF *et al.*, 2012). A mela da soja é causada por solos contaminados contendo escleródios e fragmentos de micélio que crescem na superfície da planta, atingindo a parte superior e se dispersando de folha em folha e de planta em planta (COPLEY *et al.*, 2017).

A doença ataca toda a parte aérea da planta, como folhas, cotilédones, caule, pecíolos e vagens, além de inibir o alongamento do sistema radicular causando podridão nas raízes (SONAKAR *et al.*, 2014). Inicialmente, a infecção começa abaixo da superfície do solo e os sintomas típicos incluem descoloração marrom do hipocótilo que sobe da superfície do solo, resultando em murchamento e a morte de plântulas infectadas (NOOR; KHAN, 2018). Para Goulart (2018), nos hipocótilos, as lesões são marrom-avermelhadas e deprimidas.

Em plântulas, os sintomas são observados geralmente na região do colo, apresentando manchas encharcadas, as quais crescem rapidamente tornando-se escuras, podendo progredir para lesões deprimidas, causando o seu tombamento (WOICIECKOSKI; COSTA, 2016), nesse estágio fonológico o tombamento é o sintoma mais comum causado por *R. solani* (GOULART, 2018).

Nessa situação, o tombamento pode ocorrer em um período de 10 a 15 dias após emergência da muda (GOULART, 2016), sendo importante destacar que os sintomas variam de acordo com o hospedeiro e a parte da planta afetada (GOULART, 2018). Em plantas adultas, os sintomas são a podridão da raiz, lesões avermelhadas, circulares a alongadas e marrons na base do caule (GOULART, 2018).

Na maioria dos cultivos, as perdas podem variar de <5% a >50% nos casos graves, resultando em perdas de rendimento significativo (CHEN; JABAJI, 2009). No Canadá, pesquisas tem revelado que *R. solani* causou uma perda de 48% no estabelecimento e 52% no rendimento de sementes em soja (CHANG *et al.*, 2018). No Brasil, perdas de rendimento de 5 a 10% são comuns, contudo foi relatado perdas de rendimento de 60% em feijão (RASHAD *et al.*, 2012).

Na caracterização do perfil de ocorrência de doenças de plantas no estado de Roraima, foi observado que *R. solani* foi o patógeno mais frequentemente registrado (HALFELD-VIEIRA *et al.*, 2011). Diante dessa problemática, busca-se por informações sobre os genótipos de soja que podem ser resistentes ou susceptíveis à mela da soja. De acordo com Nechet *et al.*

(2008), o estudo sobre a reação de cultivares de soja à mela e o desenvolvimento de genótipos resistentes é essencial para a manutenção do sistema produtivo da cultura no estado de Roraima.

4.4 Resistência de cultivares de soja

Pouco se sabe sobre os componentes moleculares responsáveis pela suscetibilidade ou resistência da soja aos isolados de *R. solani*, sendo essa informação importante devido ao impacto da mela da soja na agricultura (COPLEY *et al.*, 2017). Infelizmente, nossa compreensão dos mecanismos que promovem a infecção e outros aspectos da interação do patógeno-hospedeiro é limitada, impedindo o desenvolvimento de genótipos resistentes (AJAYI-OYETUNDE; BRADLEY, 2018).

Nessa perspectiva, compreender a virulência do patógeno e identificar genes e suas interações com a cultura da soja é indispensável aos produtores, pois facilita na adoção da estratégia de controle dessa importante doença (COPLEY *et al.*, 2017). Os produtores geralmente usam um sistema integrado, incluindo plantio antecipado, rotação de culturas, variedades resistentes, bem como aplicações de fungicidas para controlar *R. solani* (NOOR; KHAN, 2018).

Atualmente, sabe-se sobre o modo de ação de cada fungicida registrado para o manejo das doenças de soja, sendo quatro grupos de fungicidas usados para controlar a podridão da raiz e do hipocótilo com auxílio dos inibidores externos da quinona, inibidores da succinato desidrogenase, inibidores da desmetilação e os fenilpirroles (AJAYI-OYETUNDE; BRADLEY, 2018).

No entanto, os controles culturais e químicos atuais não são completamente eficazes para gerenciar os problemas persistentes das doenças de *R. solani*, além de abranger os problemas ambientais, no qual muitos produtos agrícolas sintéticos saíram do mercado e outros são alvos de proibição (SADRATI *et al.*, 2013), podendo o patógeno desenvolver resistência a esses produtos (FENG *et al.*, 2017).

Assim, com a proibição dos produtos existe a necessidade de encontrar formas alternativas de controle da doença (SADRATI *et al.*, 2013), utilizando cultivares resistentes à mela da soja. Nechet *et al.* (2008), avaliando cultivares de soja (BRS Tracajá, BRS Pati, UFV-9, Embrapa 63 (Mirador), Jataí, FT-16, BRS Juçara, BRS Sambaíba, BRSMA Seridó RCH, Padre, Leflore, BRS 219 (Boa Vista), BR-36, IAC 8-2 e IAC-8) em relação à mela, observaram que todas as cultivares testadas apresentaram incidência da mela nas folhas e vagens,

demonstrando a existência da reação diferenciada entre as cultivares quanto à mela e o uso de genótipos promissores visando resistência à doença nas condições do Cerrado de Roraima.

Para tal, é necessário quantificar a intensidade da doença em diferentes cultivares de soja por meio da classificação visual utilizando escalas de sintomatologia, comparável às observadas em condições naturais de infecção ou produzida por meio de inoculação (GOULART, 2018). Além disso, é recomendado análises de adaptabilidade e estabilidade capazes de identificar cultivares de comportamento promissor que respondam as variações ambientais sob condições específicas ou amplas (MATSUO *et al.*, 2012).

Nesse cenário, o biocontrole surge como uma das alternativas complementares à resistência genética e ao uso de produtos químicos, por proporcionar o controle de doenças que não são gerenciadas por outras estratégias, bem como, o uso de bactérias fitopatogênicas (BERIC *et al.*, 2013), especialmente na ausência de cultivares resistentes.

4.5 Controle biológico por isolados bacterianos

Para atender a necessidade de produtos e alimentos livres de resíduos deixados pelas aplicações de agrotóxicos (MACHADO *et al.*, 2012), métodos alternativos de proteção de plantas têm sido estudados (NABRDALIK *et al.*, 2018), sendo o controle biológico de doenças por antagonista uma importante alternativa (MACHADO *et al.*, 2012).

Nesse sentido, o controle biológico por microrganismos é reconhecido como fonte potencial de novos produtos naturais para a exploração na medicina, indústria e agricultura (SADRATI *et al.*, 2013). Na agricultura, uma grande quantidade de espécies bacterianas, incluindo espécies de *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Rhizobium* e *Serratia*, são registradas com potencial de biocontrole e promoção de crescimento (SAHARAN; NEHRA, 2011).

Nessa circunstância, Lopes *et al.* (2018) ao identificar e caracterizar isolados bacterianos endofíticos com capacidade de antagonizar o fungo *R. solani* na cultura da soja, observaram que os isolados do gênero *Bacillus* e *Burkholderia* foram eficazes no controle *in vitro* do patógeno, indicando que as espécies podem ser utilizadas para o desenvolvimento de inoculantes na proteção de cultivos da soja. Segundo Nabrdalik *et al.* (2018), avaliando as propriedades antagonísticas de cepas endofíticas de *Pantoea agglomerans* contra *R. solani*, observaram que *P. agglomerans* suprimiram a doença nas raízes de beterraba, contudo não reduziu os níveis do patógeno no solo.

Portanto, as bactérias endofíticas antagonistas vivem entre plantas, mas não causam sintomas de doença (NABRDALIK *et al.*, 2018). Essas bactérias são encontradas em todas as espécies de plantas, no qual existe uma estreita relação que permite a proteção de plantas (SADRATI *et al.*, 2013; NABRDALIK *et al.*, 2018).

As bactérias endofíticas quando associadas às raízes, são capazes de induzir efeitos positivos sobre o crescimento e a aptidão das plantas, denominadas rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP) (PII *et al.*, 2015). Trabalhos estão sendo desenvolvidos visando a supressão de doenças por meio de vários agentes que habitam a rizosfera, que é uma zona de influência das raízes que vai desde a sua superfície até uma distância de 1 a 3 mm, sendo os termos rhizo/rhiza e sphaera significa a área de influência e/ou localização física em volta da raiz (MACHADO *et al.*, 2012).

A maioria das rizobactérias estabelecem interações neutras, aproveitando os exsudatos radiculares como alimento sem afetar as plantas, como RPCP podem desempenhar um papel importante na promoção da aquisição de nutrientes pelas plantas, favorecendo os fatores que induzem o acúmulo de biomassa radicular e/ou dificultando possíveis patógenos que poderiam ter efeitos prejudiciais no desenvolvimento do sistema radicular (PII *et al.*, 2015).

Efeitos significativos foram observados utilizando um isolado da rizobactéria *Burkholderia sp.* na atividade antagonista *in vitro* contra *R. solani* em plantas de arroz, no qual inibiu o crescimento micelial do fungo, reduziu a incidência e a severidade da queima da bainha de arroz (LI *et al.*, 2011a).

Além das rizobactérias, também existem outras alternativas a serem investigadas utilizando as bactérias do filoplano, no qual Halfeld-Vieira *et al.* (2015) verificaram alta eficiência no controle de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* com bactérias do filoplano do maracujazeiro, devido a competição por íons de ferro e nitrogênio que limitaram as condições do patógeno.

Para o sucesso do controle biológico de fitopatógenos e da promoção de crescimento é necessário conhecer os mecanismos de ação que contribuem para a implantação de métodos eficazes (HAIDAR *et al.*, 2016). Dentre os mecanismos conhecidos de antagonismo existem o parasitismo, antibiose e competição. A competição é um processo referente à interação entre dois ou mais organismos, empenhados na mesma ação, seja por espaço e/ou nutrientes; já o parasitismo é uma relação nutricional entre dois seres vivos, no qual o parasita obtém todo ou parte de seu alimento às custas do outro hospedeiro (MACHADO *et al.*, 2012).

Dentre esses mecanismos de antagonismo, o mais importante é a antibiose, no qual diversas espécies de bactérias são capazes de excretar substâncias como enzimas líticas,

antibióticos e vários metabólitos que podem inibir o crescimento de diferentes microrganismos fitopatogênicos (GUERRERO *et al.*, 2011). Conforme observado por Oliveira *et al.* (2011), a antibiose é considerada o principal mecanismo responsável pelo controle biológico do cancro-cítrico por um isolado de *Pseudomonas* sp.

Em seus estudos, Lanna Filho *et al.* (2010) encontraram resultados satisfatórios no teste de antibiose *in vitro* que mostrou a atividade direta de bactérias isoladas de folhas de tomateiro saudáveis contra *Xanthomonas vesicatoria* e *Alternaria solani*. Elkahoui *et al.* (2015) observaram que isolados de *Pseudomonas* sp. apresentaram elevada atividade antifúngica contra a *R. solani* por meio da produção de compostos voláteis à base de enxofre.

5. REFERÊNCIAS

ABDULKHANI, A. *et al.* Evaluation of the antibacterial activity of cellulose nanofibers/polylactic acid composites coated with ethanolic extract of propolis. **Polymer Composites**, v. 38, p. 13-19, 2015.

AJAYI-OYETUNDEA, O. O.; BRADLEY, C. A. *Rhizoctonia solani*: taxonomy, population biology and management of rhizoctonia seedling disease of soybean. **Plant Pathology**, v. 67, p. 3-17, 2018.

ALBRECHT, L. P. *et al.* Biorregulador na composição química e na produtividade de grãos de soja. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n. 4, p. 774-782, 2012.

ARTUZO, F. D. *et al.* Gestão de custos na produção de milho e soja. **Revista brasileira de gestão de negócios**. v. 20, n. 2, p.273-294, 2018.

BAMJI, S. F., CORBITT, C. Glyceollins: Soybean phytoalexins that exhibit a wide range of health-promoting effects. **Journal of Functional Foods**, v. 34, p. 98-105, 2017.

BARBOSA, C. Z. R. *et al.* Qualidade de sementes de soja BRS Tracajá, colhidas em Roraima em função do tamanho no armazenamento. **Revista Ciência Agronômica**, v. 41, n. 1, p. 73-80, 2010.

BERIC, T. *et al.* Novel antilisterial bacteriocin licheniocin 50.2 from *Bacillus licheniformis* VPS50.2 isolated from soil sample. **Journal of Applied Microbiology**, v. 116, p. 502-510, 2013.

BIANCO, S. *et al.* Acúmulo de massa seca e de macronutrientes por plantas de *Glycine max* e *Solanum americanum*. **Planta Daninha**, v. 30, n. 1, p. 87-95, 2012.

BORNHOFEN, E. *et al.* Épocas de semeadura e desempenho qualitativo de sementes de soja. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 45, n. 1, p. 46-55, 2015.

CERESINI, P. C. *et al.* The origin of the emerging populations of the Brachiaria collar rot pathogen (*Rhizoctonia solani* AG-1 IA) in the Amazon and its potential for adaptation to another Brazilian agroecosystem. **Phytopathology**, v. 104, n. 11, p. 24-24, 2014.

CHANG, K. F. *et al.* Disease reaction to *Rhizoctonia solani* and yield losses in soybean. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 98, n. 1, p. 115-124, 2018.

CHEN, H. *et al.* Differential expression of genes encoding the phenylpropanoid pathway upon infection of soybean seedlings by *Rhizoctonia solani*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 31, p. 356-367, 2009.

CONAB. **Companhia Nacional de Abastecimento Acompanhamento da safra brasileira de grãos - Safra 2020/21**. Disponível em <www.conab.gov.br> Acesso: 31/01. Brasília, v. 8, n. 12, p. 1-97, 2021.

CONAB. **Companhia Nacional de Abastecimento Acompanhamento da safra brasileira de grãos - Safra 2021/22**. Disponível em <www.conab.gov.br> Acesso: 31/01. Brasília, v. 9, n. 4, p. 1-98, 2022.

COPLEY, T. *et al.* Biochar amendment modifies expression of soybean and *Rhizoctonia solani* genes leading to increased severity of rhizoctonia foliar blight. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 1-15, 2017.

ELKAHOUI, S. *et al.* Antifungal activity of volatile compounds-producing *Pseudomonas* P2 strain against *Rhizoctonia solani*. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 31, p. 175-185, 2015.

GAGNÉ-BOURQUE, F. *et al.* Accelerated growth rate and increased drought stress resilience of the model grass *Brachypodium distachyon* colonized by *Bacillus subtilis* B26. **Plos one**, v.10, n.6, p.1-23, 2015.

GHOSH, S. *et al.* Identification and functional analysis of AG1-IA specific genes of *Rhizoctonia solani*. **Curr Genet**, v. 60, p. 327-341, 2014.

GOULART, A. C. P. Reação de cultivares de algodoeiro a *Rhizoctonia solani* na fase de plântula e benefícios do tratamento de sementes com fungicidas. **Summa Phytopathologica**, v. 42, n. 4, p. 308-312, 2016.

GOULART, A. C. P. Setting a rating scale for assess *Rhizoctonia solani* lesions on cotton, soybean and common bean seedlings. **Bioscience Journal**, v. 34, n. 6, p. 1632-1639, 2018.

GUERRERO, Y. *et al.* Perspectivas del uso de bacterias rizosféricas en el control de *Pyricularia grisea* (Cooke Sacc.) em el cultivo de arroz (*Oryza sativa* L.). **Revista Colombiana de Biotecnología**, v. 13, n. 1, p. 16-22, 2011.

Haidar, R. *et al.* Modes of action for biological control of *Botrytis cinerea* by antagonistic bacteria. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 55, n. 3, p. 13-34, 2016.

HALFELD-VIEIRA, B. A. *et al.* Caracterização do perfil de ocorrência de doenças de plantas no estado de Roraima. **Revista Agro@mbiente On-line**, v. 5, p. 220-226, 2011.

HALFELD-VIEIRA, B. A. *et al.* Understanding the mechanism of biological control of passionfruit bacterial blight promoted by autochthonous phylloplane bacteria. **Biological Control**, v. 80, p. 40-49, 2015.

KOENNING, S. R.; WRATHER, J. A. Suppression of soybean yield potential in the continental United States by plant diseases from 2006 to 2009. **Plant Health Progress**, 2010.

LANNA FILHO, R. *et al.* Bacterial spot and early blight biocontrol by epiphytic bacteria in tomato plants. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n. 12, p. 1381-1387, 2010.

LI, B. *et al.* Phenotypic and molecular characterization of *rhizobacterium Burkholderia* sp. strain R456 antagonistic to *Rhizoctonia solani*, sheath blight of rice. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 27, p. 2305–2313, 2011a.

LOPES, K. B. A. *et al.* Screening of bacterial endophytes as potential biocontrol agents against soybean diseases. **Journal of Applied Microbiology**, v. 125, p. 1466-1481, 2018.

MACHADO, D. F. M. *et al.* *Trichoderma* no Brasil: o fungo e o bioagente. **Revista de ciências Agrárias**, v. 35, n.1, p. 274-288, 2012.

MARIN, R. S. F. *et al.* Efeito da adubação fosfatada na produção de sementes de soja. **Revista Ceres**, v. 62, n. 3, p. 265-274, 2015.

MATSUO, É. *et al.* Estimates of the genetic parameters, optimum sample size and conversion of quantitative data in multiple categories for soybean genotypes. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 34, n. 3, p. 265-273, 2012.

MONTERO-TAVERA, V. *et al.* Genetic diversity of *Rhizoctonia solani* isolates (Kuhn) from pepper in Mexico. **Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas**, v. 4, n. 7, p. 1043-1054, 2013.

NABRDALIK, M. *et al.* Importance of endophytic strains *Pantoea agglomerans* in the biological control of *Rhizoctonia solani*. **Ecological Chemistry and Engineering**, v. 25, n. 2, p. 331-342, 2018.

NECHET, K. L. *et al.* Reação de cultivares de soja à mela (*Thanatephorus cucumeris*) em campo em dois estádios de desenvolvimento das plantas. **Summa Phytopathologica**, v. 34, p. 277-279, 2008.

NOOR, A.; KHAN, M. F. R. Efficacy of Azoxystrobin at controlling *Rhizoctonia solani* at early growth stages of sugar beet. **Agricultural Research & Technology: Open Access Journal**, v. 17, n. 3, p. 1-4, 2018.

OLIVEIRA, A. G. *et al.* Evaluation of the antibiotic activity of extracellular compounds produced by the *Pseudomonas* strain against the *Xanthomonas citri* pv. *citri* 306 strain. **Biological Control**, v. 56, n. 2, p. 125-131, 2011.

PII, YOURY. *et al.* Microbial interactions in the rhizosphere: beneficial influences of plant growth-promoting rhizobacteria on nutrient acquisition process. A review. **Biology and Fertility of Soils**, v. 51, p. 403-415, 2015.

RASHAD, Y. M. *et al.* Diversity among some Egyptian isolates of *Rhizoctonia solani* based on anastomosis grouping, molecular identification and virulence on common bean. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n. 37, p. 6661-6667, 2012.

SADRATI, N. *et al.* Screening of antimicrobial and antioxidant secondary metabolites from endophytic fungi isolated from wheat (*Triticum durum*). **Journal of plant protection research**, v. 53, n. 2, p. 128-136, 2013.

SAHARAN, B; NEHRA, V. Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. **Life Sciences and Medicine Research**, v. 21, p. 1-30. 2011.

SONAKAR, V. K. *et al.* Screening of chemical fungicides in control of *Rhizoctonia solani* causing aerial or web blight of soybean. **Ecology, Environment and Conservation**, v. 20, p. 381-386, 2014.

SOUSA, I. A. L. *et al.* Potencial de biocontrole de *Rhizoctonia solani* do Feijão-Caupi. **Biota Amazônia**, v. 7, n. 1, p. 86-89, 2017.

WIBBERG, D. *et al.* Establishment and interpretation of the genome sequence of the phytopathogenic fungus *Rhizoctonia solani* AG1-IB isolate 7/3/14. **Journal of Biotechnology**, v.167, p. 142-155, 2013.

WOICIECKOSKI, C. P.; COSTA, M. L. N. Severidade da *Rhizoctonia solani* em cultivares de soja em relação ao potássio. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v. 10, n. 2, p. 22-27, 2016.

YANG, G.; LI, C. General description of *Rhizoctonia* species complex. **Plant Pathology**, v. 2, p. 41-52, 2012.

YOUSSEF, D. R. *et al.* Caracterização de isolados de *Rhizoctonia* associados à queima foliar em Roraima. **Revista Agro@mbiente On-line**, v. 6, n. 2, p. 158-165, 2012.

6. CAPÍTULO 1: AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE GENÓTIPOS DE SOJA À MELA (*Rhizoctonia solani* AG1-IA e AG1-IF) EM CONDIÇÕES DE CASA DE VEGETAÇÃO

RESUMO

A soja é uma importante leguminosa com grande interesse econômico mundial, em razão da ampla utilização de seus grãos e, excelente adaptação em diversas regiões. Entretanto, a cultura está sujeita a diversas doenças que podem afetar seu potencial produtivo, como exemplo, o fungo *Rhizoctonia solani* (AG1-IF e AG1-IA) causador da mela da soja. A disponibilidade de plantas de soja resistente à doença é limitada, sendo indispensável a seleção de genótipos resistentes no agrossistema. Diante da problemática, objetivou-se selecionar em dois períodos distintos genótipos de soja resistentes ao fungo *R. solani* (AG1-IF e AG1-IA) em condições de casa de vegetação. Os experimentos foram conduzidos no laboratório de fitopatologia e em casa de vegetação da Embrapa Roraima. Os genótipos de soja foram cultivados em vasos de plástico (1000 mL), utilizando o ensaio experimental em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições, onde cada repetição foi constituída por uma planta de soja. No Experimento I, em períodos distintos, foram utilizados 94 tratamentos (genótipos) inoculados com *R. solani* (AG1-IF) e, posteriormente, 26 tratamentos inoculados com *R. solani* (AG1-IA), no qual foi possível ocorrer a germinação dos genótipos. No Experimento II, conduzido no mesmo período, foram testados 34 tratamentos, inoculados com os mesmos patógenos de *R. solani* (AG1-IF) e (AG1-IA). Assim, não houve diferença no período de incubação da mela, no qual todas as plantas de soja apresentaram incidência de 100% dos sintomas da mela. A severidade e as respostas de resistência dos genótipos de soja foram diferentes entre os dois períodos no controle da *R. solani* (AG1-IF) e (AG1-IA). No experimento conduzido em diferentes períodos, a severidade da doença variou de <5 a 50% e 11 a >50% de área foliar infectada para *R. solani* (AG1-IF) e (AG1-IA), respectivamente. No experimento conduzido no mesmo período, a severidade da mela foi entre 6 a 50% e <5 a 30% de área foliar infectada para *R. solani* (AG1-IF) e (AG1-IA), respectivamente.

Palavra-chave: Área Foliar Infectada. *Glycine max*. Incidência. Incubação. Severidade.

ABSTRACT

Soybean is an important legume with great economic interest worldwide, due to the wide use of its grains and excellent adaptation in different regions. However, the crop is subject to several diseases that can affect its productive potential, for example, the fungus *Rhizoctonia solani* (AG1-IF and AG1-IA) that causes soybean blight. The availability of soybean plants resistant to the disease is limited, and the selection of resistant genotypes in the agrosystem is essential. Faced with this problem, the objective was to select, in two different periods, soybean genotypes resistant to the fungus *R. solani* (AG1-IF and AG1-IA) under greenhouse conditions. The experiments were carried out in the phytopathology laboratory and in a greenhouse at Embrapa Roraima. Soybean genotypes were cultivated in plastic pots (1000 mL), using the experimental trial in a completely randomized design with four replications, where each replication consisted of one soybean plant. In Experiment I, in different periods, 94 treatments (genotypes) inoculated with *R. solani* (AG1-IF) were used and, later, 26 treatments inoculated with *R. solani* (AG1-IA), in which it was possible to occur the germination of the genotypes. In Experiment II, conducted in the same period, 34 treatments were tested, inoculated with the same pathogens of *R. solani* (AG1-IF) and (AG1-IA). Thus, there was no difference in the mela incubation period, in which all soybean plants had a 100% incidence of mela symptoms. The severity and resistance responses of the soybean genotypes were different between the two periods in the control of *R. solani* (AG1-IF) and (AG1-IA). In the experiment conducted in different periods, disease severity ranged from <5 to 50% and 11 to >50% of infected leaf area for *R. solani* (AG1-IF) and (AG1-IA), respectively. In the experiment carried out in the same period, the severity of mela was between 6 to 50% and <5 to 30% of infected leaf area for *R. solani* (AG1-IF) and (AG1-IA), respectively.

Keywords: Infected Leaf Area. Incidence. Incubation. *Glycine max.* Severity.

7. INTRODUÇÃO

No Brasil, a produtividade da soja [*Glycine max* (L.) Merrill] vem crescendo a cada ano, e segundo a Conab (2022) a temporada 2021/22 mantém a tendência de crescimento de 3,8% em relação à safra passada, correspondendo ao plantio de 40.399,2 milhões de hectares com colheita de 140,5 milhões de toneladas. A produção de soja em regiões tropicais aumentou nas últimas décadas, apesar das condições climáticas que favorecem o desenvolvimento de doenças (LOPES *et al.*, 2018).

Dentre as principais doenças que afetam o cultivo da soja, o fungo *Rhizoctonia solani* Kühn [teleomorfo: *Thanatephorus cucumeris* (A. B. Frank) Donk], é responsável por causar doenças conhecidas como rizoctoniose, requeima ou mela da soja (WOICIECKOSKI; COSTA, 2016), o qual se estabelece devido as condições ambientais de temperatura e umidade relativa elevadas (YOUSSEF *et al.*, 2012). Os sintomas manifestam-se, primeiramente, nas folhas próximas ao solo, apresentando manchas irregulares e posterior necrose, podendo acontecer desfolha e a presença de teia micelial do patógeno na face abaxial das folhas atacadas (NECHET; HALFELD-VIEIRA, 2006).

No cultivo da soja, as perdas podem variar de <5% a >50%, nos casos de alta severidade, ocasionando perdas de rendimento significativo (CHEN; JABAJI, 2009). No Canadá, pesquisas revelaram que *R. solani* causou perdas de 48 % no estabelecimento e 52 % na produção de sementes de soja (CHANG *et al.*, 2018).

O fungo *R. solani* produz escleródios como estruturas de sobrevivência de cor marrom a preto, composta de aglomerados de células incrustadas de melanina e paredes espessas, formadas por ramificações repetidas de hifas laterais curtas e espessas, e pode ser produzido em partes da planta (SONAKAR *et al.*, 2014). A classificação de *R. solani*, baseia-se na fusão entre as hifas, o que permitiu a formação de 14 grupos de anastomose (AGs) (MONTERO-TAVERA *et al.*, 2013; AJAYI-OYETUNDE; BRADLEY, 2018), no qual AG1 foi dividido nos seguintes subgrupos intraespecíficos: IA, IB, IC, ID, IE e IF (YANG; LI, 2012; WIBBERG *et al.*, 2013).

Dentro do complexo de espécies *R. solani*, o grupo de anastomose AG1-IA é bem conhecido por causar doenças como à mela, queima da bainha, manchas marrons, ferrugem foliar, podridão da cabeça, ferrão da folha em variedades de hospedeiros (YANG; LI, 2012). Um grupo recém descrito AG1-IF foi encontrado como o principal patógeno associado a queima foliar na soja e feijão-caupi no estado de Roraima, no qual foi observado dentre 562

plantas infectadas em uma diversidade de 132 isolados de AG1-IF, além de 27 isolados de AG1-IA (CHAVARRO-MESA *et al.*, 2020).

A disponibilidade de genótipos de soja resistente à doença é limitada (ROESE *et al.*, 2018), sendo indispensável o desenvolvimento e a padronização de metodologias que permitam a seleção segura de fontes de resistência e a determinação precisa da reação, de resistência ou suscetibilidade dos genótipos observados (MEDEIROS *et al.*, 2015). Além disso, é necessária a busca de métodos alternativos aos meios químicos de controle que podem diminuir a dependência de fungicidas, reduzir custos e mitigar os danos ao meio ambiente, principalmente na carência de genótipos resistentes (GODFRAY *et al.*, 2010; LAMICHHANE *et al.*, 2016).

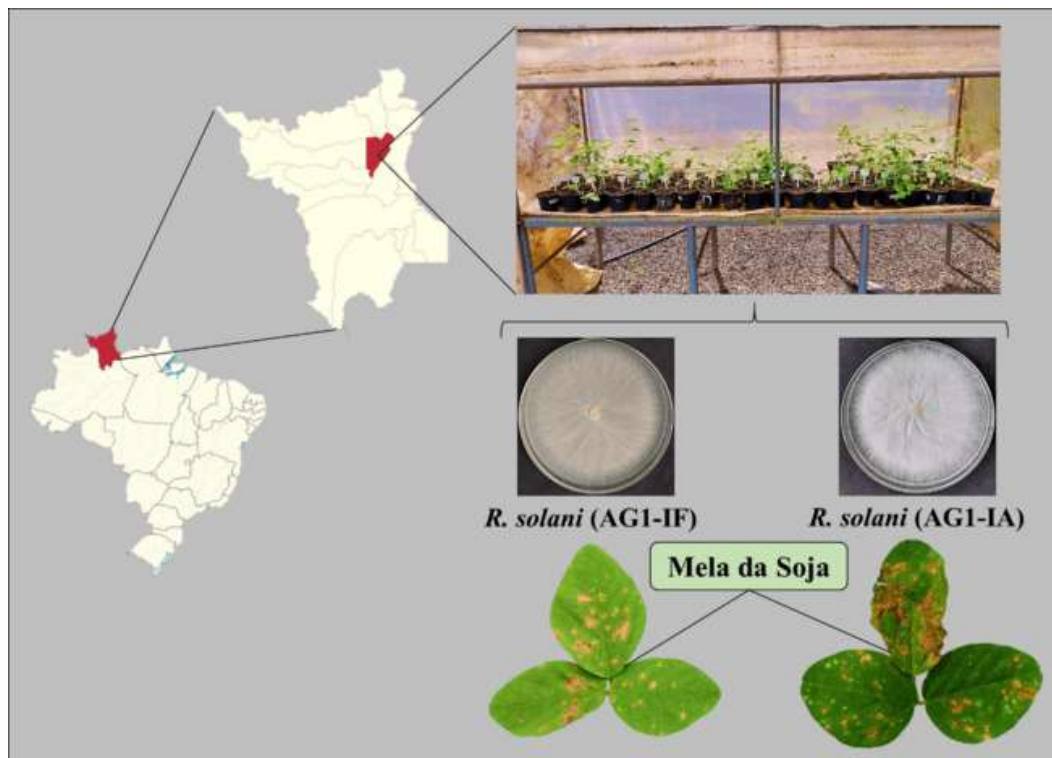
A resistência de genótipos de soja é uma alternativa essencial para a manutenção do sistema produtivo dessa cultura sem gerar impacto ao meio ambiente. Por isso, é imprescindível conhecer a reação de resistência ou suscetibilidade dos novos genótipos de soja à mela nas condições edafoclimáticas de Roraima. Nesse contexto, objetivou-se com o presente trabalho selecionar em dois períodos distintos genótipos de soja resistentes ao fungo *R. solani* (AG1-IF e AG1-IA) em condições de casa de vegetação.

8. MATERIAL E MÉTODOS

8.1 Localização da Área de Estudo

Os experimentos foram conduzidos no período de junho de 2019 a julho de 2021 no laboratório de fitopatologia e em casa de vegetação, localizados na Embrapa Roraima, município de Boa Vista-RR (Figura 1).

Figura 1 - Localização da área de estudo no Estado de Roraima, com avaliação de resistência de genótipos de soja à mela (*Rhizoctonia solani* AG1-IF e AG1-IA) em condições de casa de vegetação.



Fonte: SILVA, M. R. (2020).

O clima da região, segundo Köppen, é do tipo Aw, com duas estações climáticas bem definidas, uma chuvosa (abril-setembro) e outra seca (outubro-março), precipitação média de 1688,4 mm e temperatura média mínima 20 °C e máxima 38 °C (ARAÚJO *et al.*, 2001). Para as condições do experimento, em casa de vegetação, foi utilizado o equipamento Termohigrometro Digital (Jprolab) para leitura das máximas e mínimas da umidade relativa do ar e da temperatura referentes aos experimentos.

8.2 Obtenção de Sementes de Soja

As sementes de soja utilizadas foram de genótipos convencionais e variedades; tolerantes ao glifosato (Roundup Ready ou RR); com genes da bactéria *Bt* (*Bacillus thuringiensis*) e com uso da tecnologia IPRO (RR + *Bt*), provenientes do Banco de Germoplasma da Embrapa Cerrados e Embrapa Roraima, as quais foram acondicionadas em sacos de papel e encaminhadas ao laboratório de fitopatologia da Embrapa Roraima para armazenagem.

8.3 Avaliação de Resistência de Genótipos de Soja em Casa de Vegetação

8.3.1 Delineamento Experimental

Os genótipos de soja foram cultivados em vasos de plástico (1000 mL), utilizando o ensaio experimental em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com quatro repetições, onde cada repetição foi constituída por uma planta de soja. No Experimento I, em períodos distintos, foram utilizados 94 tratamentos (genótipos) inoculados com *R. solani* (AG1-IF, isolado 141RR) e, posteriormente, 26 tratamentos inoculados com *R. solani* (AG1-IA, isolado NRR), no qual foi possível ocorrer a germinação dos genótipos.

No Experimento II, conduzido no mesmo período, foram testados 34 tratamentos, inoculados com os mesmos patógenos de *R. solani* (AG1-IF) e (AG1-IA). A testemunha utilizada para ambos os Experimentos I e II foi a cultivar BRS-Tracajá de ciclo médio, recomendada para o plantio nas condições edafoclimáticas do estado de Roraima.

8.3.2 Correção da Acidez e do Solo

A dose de calcário dolomítico, 1,5 Mg ha⁻¹ (100% PRNT), foi estimada para elevar a saturação por base a 60%. O calcário foi incorporado ao solo e umedecido a aproximadamente 60% da capacidade. O solo foi fertilizado com macro e micronutrientes, conforme Novais (1991) com doses (mg dm⁻³) de nutrientes: N, 20; P, 150; K, 150; B, 0,5; Cu, 1,5; Mo, 0,1; Zn, 5 e Fe, 5. A fonte utilizada para fertilização dos macronutrientes (N-P-K) foi a granulada (ureia, superfosfato simples e cloreto de potássio) e dos micronutrientes (B, Cu, Mo, Zn e Fe).

8.3.3 Produção do Inóculo de *Rhizoctonia solani* (AG1-IF e AG1-IA)

Para o teste de resistência em casa de vegetação, foram utilizados os isolados de *R. solani* AG1-IF e AG1-IA pertencentes à coleção de trabalho do laboratório de fitopatologia da Embrapa Roraima. Para a obtenção de fragmentos de micélio (fgm), os isolados foram semeados em placas de Petri contendo meio Batata Dextrose Ágar (BDA), mantido por 24 h em estufa a 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 h (luz do dia e luz negra). Após esse período, cinco discos de micélio, foram retirados das bordas das colônias e transferidos para Erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL do meio líquido Batata Dextrose (BD). Os Erlenmeyers foram mantidos em incubadora com agitação orbital (Shaker) a 180 rpm, a 28 ± 2 °C por 7 dias.

Posteriormente, a massa micelial obtida foi filtrada em gaze e triturada por um minuto em agitador mecânico MA-039 para obtenção homogênea da suspensão de inóculo de *R. solani*. Uma alíquota de 1,0 mL da suspensão triturada foi retirada para quantificação de fragmentos de micélio, utilizando-se a câmara de Neubauer sob um microscópio óptico de luz. A concentração da suspensão adotada foi na ordem 1×10^6 fgm.mL⁻¹ de suspensão de inóculo para inoculação das plantas de soja (NECHET; HALFELD-VIEIRA, 2011).

8.3.4 Condução Experimental em Casa de Vegetação

O experimento em casa de vegetação foi realizado seguindo a metodologia descrita por Muyolo *et al.* (1993b) com modificações. As sementes de soja foram previamente inoculadas com o formulado líquido a base das Cepas SEMIA 5079 e SEMIA 5080 da bactéria fixadora de nitrogênio *Bradyrhizobium japonicum* (Kirchner) Jordan. A concentração do inoculante líquido é na ordem de $7,2 \times 10^9$ de *B. japonicum* por mL do produto, sendo utilizada a proporção de 100 mL de inoculante para 50 kg de sementes.

Posteriormente, quando as plantas de soja atingiram o estágio V6 (sexto nó com a quinta folha trifoliolada completamente desenvolvida) foram inoculadas com auxílio de um pulverizador manual contendo suspensão de 1×10^6 fragmentos de micélio dos isolados de *R. solani*.

Após a pulverização, as plantas foram mantidas em câmara úmida e borrifadas com água três a quatro vezes ao dia para garantir a saturação da umidade do ar e a presença de água livre nas folhas, no intuito de manter o máximo de umidade por 24 h para favorecer o aparecimento dos sintomas da doença nas folhas das plantas.

Na condução experimental em diferentes períodos, na inoculação com *R. solani* (AG1-IF), a umidade relativa do ar permaneceu entre 77 a 40% e a temperatura entre 31,9 a 26,8 °C, respectivamente para as máximas e mínimas. NA inoculação com *R. solani* (AG1-IA), a umidade relativa do ar permaneceu entre 80 a 54% e a temperatura entre 29,7 a 28,3 °C, respectivamente para as máximas e mínimas.

Já a condução experimental no mesmo período, a inoculação com *R. solani* (AG1-IF) e (AG1-IA), a umidade relativa do ar permaneceu entre 81 a 69% e a temperatura entre 28,9 a 25,8 °C, respectivamente para as máximas e mínimas.

8.4 Avaliação da Incubação da Mela nos Genótipos de Soja

A avaliação do período de incubação foi realizada após a deposição dos fragmentos de micélio dos isolados de *R. solani* sobre os genótipos de soja e o aparecimento dos sintomas nas folhas, por meio, da visualização da doença observável a olho nu (BERGAMIN FILHO; AMORIM, 2002).

8.5 Avaliação da incidência da Mela nos Genótipos de Soja

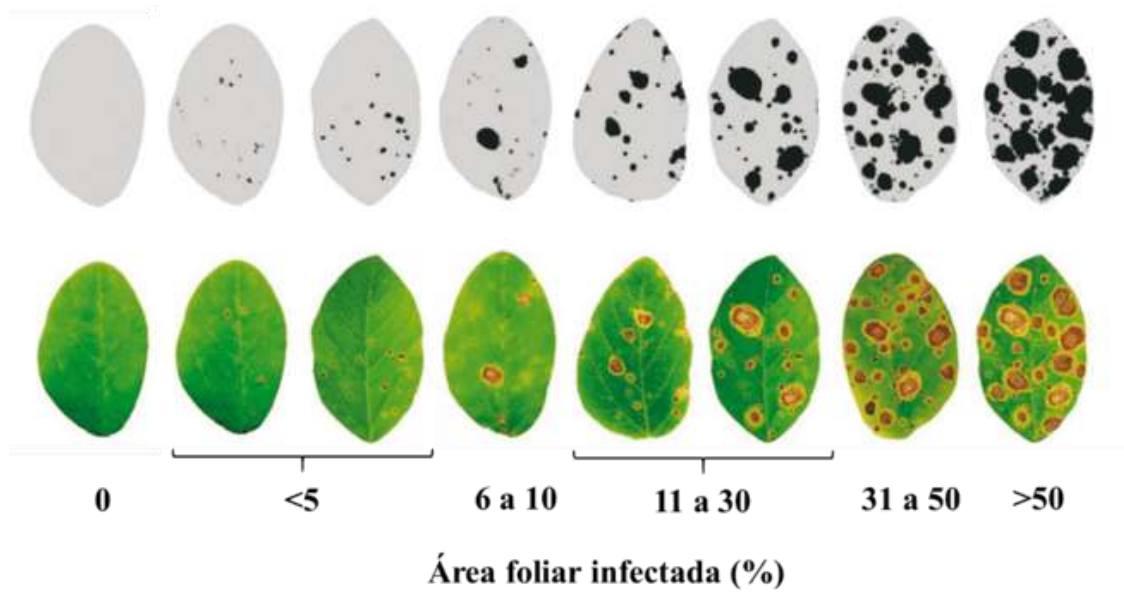
Para a avaliação da incidência, observou-se após a inoculação dos isolados de *R. solani* as folhas dos genótipos de soja com sintomas da doença, durante sete dias. Foram quantificadas o número de plantas sintomáticas e número de plantas totais. Assim, a incidência da doença (ID) foi calculada utilizando a seguinte fórmula (CAMPBELL; MADDEN, 1990):

$$ID (\%) = (\text{Número de Plantas Doentes} / \text{Número Total de Plantas Avaliadas}) \times 100$$

8.6 Avaliação da Severidade e Respostas de Resistência da Mela nos Genótipos de Soja

A avaliação da severidade da doença foi realizada após sete dias da inoculação, utilizando-se uma escala de notas de 0 a 5 (Figura 2), onde 0 = sem sintomas; 1 = <5% de área foliar infectada (AFI); 2 = 6% a 10% de AFI; 3 = 11% a 30% de AFI; 4 = 31% a 50% de AFI; 5 = >50% de AFI (HARVILLE *et al.*, 1996).

Figura 2 - Avaliação da severidade da mela da soja pela porcentagem da área foliar infectada.



Fonte: Adptado de Soares *et al.* (2009).

A classificação das respostas de resistência foi feita em função da escala de notas de 0 a 5, de acordo com o seguinte critério: resistente (R) = 0 a 1,99; moderadamente resistente (MR) = 2,0 a 2,99; moderadamente suscetível (MS) = 3,0 a 3,99; suscetível (S) = 4,0 a 4,99 e altamente suscetível (AS) = 5 (HARVILLE *et al.*, 1996).

8.7 Análise Estatística

Os resultados foram analisados estatisticamente utilizando o programa computacional software RStudio versão 3.5.1, utilizando-se o teste de Scott-knott a 5% de probabilidade. Utilizou-se o pacote ExpDes para obtenção das análises.

9. RESULTADOS E DISCUSSÃO

9.1 Experimento I - Avaliação da Incubação, da Incidência, da Severidade e as Respostas de Resistência da Mela (*R. solani* AG1-IF) em Diferentes Períodos

A partir da avaliação dos 94 genótipos de soja à mela (*R. solani* AG1-IF) em casa de vegetação, foi possível observar a incubação e a incidência da doença, além da severidade da mela por meio de escalas de notas e as respostas de resistência da doença (Tabela 1). O período de incubação da doença foi constatado nas primeiras 24 horas após a pulverização do isolado nas folhas. A incidência da doença foi verificada nos 94 genótipos, incluindo a testemunha que apresentaram 100% dos sintomas da mela.

Tabela 1 - Severidade e as respostas de resistência dos 94 genótipos de soja à mela *R. solani* (AG1-IF) em casa de vegetação no estado de Roraima.

Genótipos de Soja				Severidade da Mela					
45S	4,75 a	14S	3,25 a	31S	3,00 a	55S	2,75 a	92S	2,25 b
8S	4,50 a	20S	3,25 a	32S	3,00 a	61S	2,75 a	7S	2,00 b
13S	4,50 a	21S	3,25 a	33S	3,00 a	62S	2,75 a	25S	2,00 b
6S	4,25 a	49S	3,25 a	34S	3,00 a	63S	2,75 a	39S	2,00 b
15S	4,00 a	59S	3,25 a	50S	3,00 a	64S	2,75 a	68S	2,00 b
5S	3,75 a	81S	3,25 a	57S	3,00 a	72S	2,75 a	70S	2,00 b
26S	3,75 a	83S	3,25 a	58S	3,00 a	79S	2,75 a	74S	2,00 b
43S	3,75 a	85S	3,25 a	60S	3,00 a	93S	2,75 a	75S	2,00 b
44S	3,75 a	86S	3,25 a	66S	3,00 a	11S	2,50 b	76S	2,00 b
87S	3,75 a	90S	3,25 a	71S	3,00 a	17S	2,50 b	67S	1,75 b
88S	3,75 a	91S	3,25 a	77S	3,00 a	23S	2,50 b	69S	1,75 b
41S	3,50 a	4S	3,00 a	78S	3,00 a	24S	2,50 b	2S	1,50 b
42S	3,50 a	9S	3,00 a	82S	3,00 a	56S	2,50 b	36S	1,50 b
46S	3,50 a	10S	3,00 a	89S	3,00 a	T	2,50 b	37S	1,50 b
51S	3,50 a	19S	3,00 a	16S	2,75 a	94S	2,50 b	38S	1,50 b
53S	3,50 a	22S	3,00 a	18S	2,75 a	40S	2,25 b	1S	1,25 b
54S	3,50 a	28S	3,00 a	27S	2,75 a	48S	2,25 b	3S	1,25 b
84S	3,50 a	29S	3,00 a	35S	2,75 a	73S	2,25 b	47S	1,00 b
12S	3,25 a	30S	3,00 a	52S	2,75 a	80S	2,25 b	CV	29,11%
Genótipos de Soja				Respostas de Resistência à Mela					
45S	S	14S	MS	31S	MS	55S	MR	92S	MR
8S	S	20S	MS	32S	MS	61S	MR	7S	MR
13S	S	21S	MS	33S	MS	62S	MR	25S	MR
6S	S	49S	MS	34S	MS	63S	MR	39S	MR

15S	S	59S	MS	50S	MS	64S	MR	68S	MR
5S	MS	81S	MS	57S	MS	72S	MR	70S	MR
26S	MS	83S	MS	58S	MS	79S	MR	74S	MR
43S	MS	85S	MS	60S	MS	93S	MR	75S	MR
44S	MS	86S	MS	66S	MS	11S	MR	76S	MR
87S	MS	90S	MS	71S	MS	17S	MR	67S	R
88S	MS	91S	MS	77S	MS	23S	MR	69S	R
41S	MS	4S	MS	78S	MS	24S	MR	2S	R
42S	MS	9S	MS	82S	MS	56S	MR	36S	R
46S	MS	10S	MS	89S	MS	T	MR	37S	R
51S	MS	19S	MS	16S	MR	94S	MR	38S	R
53S	MS	22S	MS	18S	MR	40S	MR	1S	R
54S	MS	28S	MS	27S	MR	48S	MR	3S	R
84S	MS	29S	MS	35S	MR	73S	MR	47S	R
12S	MS	30S	MS	52S	MR	80S	MR	CV	29,11%

Médias da avaliação da severidade e classificação das respostas de resistência da doença seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. N°+S - genótipos de soja; T - testemunha; S - Suscetível (grau de severidade de 4,0 a 4,99); MS - moderadamente suscetível (3,0 a 3,99); MR - moderadamente resistente (2,0 a 2,99); R - resistente (0 a 1,99); CV - coeficiente de variação.

Foi observado que os 29 genótipos (47S, 3S, 1S, 38S, 37S, 36S, 2S, 69S, 67S, 76S, 75S, 74S, 70S, 68S, 39S, 25S, 7S, 92S, 80S, 73S, 48S, 40S, 94S, 56S, 24S, 23S, 17S, 11S e incluindo a testemunha) demonstraram resultados significativos na redução da severidade da doença, no qual o genótipo 47S apresentou uma menor severidade da doença com <5% de área foliar infectada. O presente genótipo pertence a cultivar BRS-1001IPRO, transgênico e tolerante ao herbicida glifosato e com a tecnologia Intacta RR2 PROTM, que promove o controle de um grupo de lagartas.

De acordo com a classificação das respostas de resistência dos genótipos de soja á mela (*R. solani* AG1-IF), verificou-se que cinco genótipos foram considerados suscetíveis ao fungo, 47 genótipos foram moderadamente suscetíveis, 33 genótipos contendo a testemunha foram moderadamente resistentes, nove genótipos foram resistentes e não foi encontrado nenhum genótipo altamente susceptível.

Os genótipos considerados resistentes foram os 47S, 3S, 1S, 38S, 37S, 36S, 2S, 69S e 67S, pertencentes a BRS-1001IPRO, BRRY45-10740, BRS-7680, BRB45-2008, BRBY67-18335, BRBY67-18333, BRS-Valiosa, BRS-8381 e CM-15, respectivamente. A partir dessas informações pode-se traçar estratégias para o melhoramento genético por meio de cruzamentos entre os materiais para o controle da mela no agrossistema estudado.

9.2 Experimento I - Avaliação da Incubação, da Incidência e da Severidade da Mela e as Respostas de Resistência (*R. solani* AG1-IA) em Diferentes Períodos

A respeito da avaliação do período de incubação da mela (*R. solani* AG1-IA), observou-se nas primeiras 24 horas após a pulverização do isolado sobre as folhas. A incidência da doença foi identificada em todos os 26 genótipos incluindo a testemunha.

Na Tabela 2, verifica-se a avaliação da severidade e as respostas de resistência de 26 genótipos de soja à mela incluindo a testemunha. Na ocasião, não foram encontrados resultados significativos quanto a severidade do isolado entre os genótipos por meio das escalas de notas. Em relação as respostas de resistência, observa-se que um genótipo foi considerado altamente suscetível, 24 genótipos contendo a testemunha foram considerados suscetíveis e um genótipo foi moderadamente suscetível. Não foi encontrado nenhum genótipo moderadamente resistente e resistente.

Os resultados obtidos mostram a existência de suscetibilidade genética para resistência à mela, sendo indispensável o cruzamento de genótipos promissores em programas de melhoramento genético com a finalidade de desenvolver novas cultivares resistentes. Espera-se encontrar com a realização de novos testes da severidade com os outros genótipos de soja resultados promissores contra *R. solani* (AG1-IA).

Tabela 2 - Severidade e as respostas de resistência dos 26 genótipos de soja à mela *R. solani* (AG1-IA) em casa de vegetação no estado de Roraima.

Genótipos de Soja				Severidade da Mela	
93S	5,00 ^{ns}	72S	4,50 ^{ns}	91S	4,50 ^{ns}
T	4,75 ^{ns}	77S	4,50 ^{ns}	92S	4,50 ^{ns}
70S	4,75 ^{ns}	78S	4,50 ^{ns}	94S	4,50 ^{ns}
73S	4,75 ^{ns}	79S	4,50 ^{ns}	82S	4,25 ^{ns}
83S	4,75 ^{ns}	80S	4,50 ^{ns}	89S	4,25 ^{ns}
84S	4,75 ^{ns}	81S	4,50 ^{ns}	74S	4,00 ^{ns}
87S	4,75 ^{ns}	85S	4,50 ^{ns}	90S	4,00 ^{ns}
68S	4,50 ^{ns}	86S	4,50 ^{ns}	67S	3,75 ^{ns}
71S	4,50 ^{ns}	88S	4,50 ^{ns}	CV	12,54%

Genótipos de Soja				Respostas de Resistência à Mela	
93S	AS	72S	S	91S	S
T	S	77S	S	92S	S
70S	S	78S	S	94S	S
73S	S	79S	S	82S	S
83S	S	80S	S	89S	S
84S	S	81S	S	74S	S
87S	S	85S	S	90S	S
68S	S	86S	S	67S	MS
71S	S	88S	S	CV	12,54%

ns - Não significativo ao teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. N^o+S - genótipos de soja; T - testemunha; AS - Altamente suscetível (grau de severidade de 5,0); S - Suscetível (4,0 a 4,99); MS - moderadamente suscetível (3,0 a 3,99); CV - coeficiente de variação.

9.3 Experimento II - Avaliação da Incubação, da Incidência e da Severidade da Mela *R. solani* (AG1-IF) e (AG1-IA) no Mesmo Período

Com relação a avaliação dos 34 genótipos de soja à mela *R. solani* (AG1-IF) e (AG1-IA) conduzidos no mesmo período em casa de vegetação, verifica-se a incubação e a incidência da doença, além da severidade da mela utilizando as escalas de notas (Tabela 3). Acerca do período de incubação da doença, observou-se nas primeiras 24 horas após a pulverização dos isolados nas folhas. A incidência foi verificada nos 34 genótipos mais a testemunha que apresentaram 100% dos sintomas da mela.

Constata-se que a severidade do isolado de *R. solani* (AG1-IF) apresentou cinco genótipos (95S, 112S, 104S, 98S e 114S) com resultados significativos estatisticamente quando comparados com os demais tratamentos e a testemunha. Já a severidade do isolado de *R. solani* (AG1-IA) identificou 15 genótipos (96S, 95S, 118S, 107S, 117S, 115S, 113S, 103S, 127S, 126S, 125S, 120S, 119S, 116S e 112S) mais significativos estatisticamente em relação aos outros tratamentos e a testemunha.

Tabela 3 - Severidade dos 34 genótipos de soja à mela *R. solani* (AG1-IF) e (AG1-IA) em casa de vegetação no estado de Roraima.

Genótipos de Soja				Severidade da Mela (AG1-IF)			
125S	4,50 a	119S	4,00 a	107S	3,50 b	97S	3,00 c
127S	4,50 a	120S	4,00 a	117S	3,50 b	T	3,00 c
124S	4,25 a	121S	4,00 a	118S	3,50 b	114S	2,75 d
126S	4,25 a	122S	4,00 a	96S	3,50 b	98S	2,75 d
102S	4,00 a	123S	4,00 a	115S	3,25 c	104S	2,50 d
103S	4,00 a	99S	4,00 a	100S	3,00 c	112S	2,50 d
106S	4,00 a	108S	3,75 b	109S	3,00 c	95S	2,50 d
110S	4,00 a	101S	3,50 b	111S	3,00 c	CV (%)	11,00
116S	4,00 a	105S	3,50 b	113S	3,00 c		
Genótipos de Soja				Severidade da Mela (AG1-IA)			
109S	3,50 a	108S	3,00 a	99S	2,75 a	113S	2,25 b
111S	3,50 a	110S	3,00 a	112S	2,50 b	115S	2,25 b
122S	3,50 a	114S	3,00 a	116S	2,50 b	117S	2,25 b
98S	3,25 a	123S	3,00 a	119S	2,50 b	107S	2,00 b
T	3,25 a	101S	2,75 a	120S	2,50 b	118S	2,00 b
100S	3,00 a	105S	2,75 a	125S	2,50 b	95S	2,00 b
102S	3,00 a	121S	2,75 a	126S	2,50 b	96S	1,75 b
104S	3,00 a	124S	2,75 a	127S	2,50 b	CV (%)	24,27
106S	3,00 a	97S	2,75 a	103S	2,25 b		

Médias da severidade da doença seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. N°+S - genótipos de soja; T - testemunha; CV - coeficiente de variação.

Observa-se que os 95S e 112S foram eficientes aos dois isolados fúngicos na redução da porcentagem de área foliar infectada. O genótipo 95S pertence a cultivar de soja BRS-7980 que apresenta sanidade radicular, incluindo resistências múltiplas aos nematoides do cisto (raças 1, 3 e 5), aos nematoides causadores de galhas *Meloidogyne javanica* e *M. incognita*, além de tolerância ao nematoide *Pratylenchus* spp. A cultivar também é resistente à podridão radicular de fitóftora, causada pelo fungo *Phytophthora sojae* (EMBRAPA, 2016). O genótipo 112S pertence a soja BRRY67-5918 que possui resistência a podridão-parda da haste (*Cadophora gregata*) com a classificação da reação 0% de plantas com sintomas foliares (COSTAMILAN *et al.*, 2020).

9.4 Experimento II - Respostas de Resistência da Mela *R. solani* (AG1-IF) e (AG1-IA) no Mesmo Período

Na Tabela 4, identifica-se a classificação das respostas de resistência dos 34 genótipos de soja à mela *R. solani* (AG1-IF) e (AG1-IA) em casa de vegetação. Dentre os genótipos

testados para *R. solani* (AG1-IF), verifica-se cinco genótipos considerados moderadamente resistentes, 14 genótipos moderadamente suscetíveis incluindo a testemunha, 15 genótipos suscetíveis, não foram encontrados genótipos resistentes e altamente suscetíveis.

Os genótipos analisados para *R. solani* (AG1-IA), observa-se um genótipo foi classificado como resistente, 20 genótipos moderadamente resistente, 13 genótipos incluindo a testemunha moderadamente suscetíveis, não foram constatados genótipos suscetíveis e altamente suscetíveis.

Conforme as respostas de resistência a doença, constata-se entre os genótipos que o critério moderadamente resistente foi quatro vezes maior para *R. solani* (AG1-IA) em relação (AG1-IF). A respeito do critério resistente, nota-se o genótipo 96S referente a soja BRYC78-52744, contudo não foi possível encontrar na literatura informações sobre o mesmo.

Tabela 4 - Respostas de resistência dos 34 genótipos de soja à mela *R. solani* (AG1-IF) e (AG1-IA) em casa de vegetação no estado de Roraima.

Genótipos de Soja				Respostas de Resistência à Mela (AG1-IF)			
125S	S	119S	S	107S	MS	97S	MS
127S	S	120S	S	117S	MS	T	MS
124S	S	121S	S	118S	MS	114S	MR
126S	S	122S	S	96S	MS	98S	MR
102S	S	123S	S	115S	MS	104S	MR
103S	S	99S	S	100S	MS	112S	MR
106S	S	108S	MS	109S	MS	95S	MR
110S	S	101S	MS	111S	MS	CV (%)	11,00
116S	S	105S	MS	113S	MS		
Genótipos de Soja				Respostas de Resistência à Mela (AG1-IA)			
109S	MS	108S	MS	99S	MR	113S	MR
111S	MS	110S	MS	112S	MR	115S	MR
122S	MS	114S	MS	116S	MR	117S	MR
98S	MS	123S	MS	119S	MR	107S	MR
T	MS	101S	MR	120S	MR	118S	MR
100S	MS	105S	MR	125S	MR	95S	MR
102S	MS	121S	MR	126S	MR	96S	R
104S	MS	124S	MR	127S	MR	CV (%)	24,27
106S	MS	97S	MR	103S	MR		

Médias da classificação das respostas de resistência da doença seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. N°+S - genótipos de soja; T - testemunha; S - Suscetível (grau de severidade de 4,0 a 4,99); MS - moderadamente suscetível (3,0 a 3,99); MR - moderadamente resistente (2,0 a 2,99); R - resistente (0 a 1,99); CV - coeficiente de variação.

As avaliações do período de incubação, de incidência e, em especial, da severidade junto com as respostas de resistência dos genótipos de soja apresentaram resultados importantes que

indicaram comportamentos diferentes entre os genótipos nos seus respectivos períodos no controle da mela (AG1-IF) e (AG1-IA) em casa de vegetação.

Observou-se que em diferentes períodos a severidade da doença variou de <5 a 50% e 11 a >50% de área foliar infectada de *R. solani* (AG1-IF) e (AG1-IA), respectivamente. Já no mesmo período utilizando outros genótipos, a severidade correspondeu entre 6 a 50% e <5 a 30% de área foliar infectada de *R. solani* (AG1-IF) e (AG1-IA), respectivamente.

Nessa perspectiva, tais resultados acrescentam informações sobre a reação dos genótipos recomendados para o estado de Roraima, bem como as diferentes condições de temperatura e umidade entre os dois períodos, quanto à mela da soja. De acordo com Lopes *et al.* (2018), o genótipo da planta tem relevância nas populações de microrganismos que é influenciado pelo manejo da planta e pelo meio ambiente. Ajayi-Oyetunde e Bradley (2018), descrevem que ao contrário da maioria dos fitopatógenos da soja, a *R. solani* é capaz de causar infecções em uma ampla faixa de temperatura do solo e condições de umidade, onde os isolados AG-2-2IIIB são conhecidos por crescerem bem em altas temperaturas de 35°C. Em relação ao controle da doença, Youssef *et al.* (2012) relatam da dificuldade em controlar a *R. solani*, relacionada à não homogeneidade da espécie, grande diversidade genética na sua morfologia, patogenicidade e fisiologia.

A respeito da reação dos genótipos de soja aos isolados de *R. solani* (AG1-IF) e (AG1-IA), conforme Copley *et al.* (2017) depois da invasão e evasão dos mecanismos de defesa do hospedeiro, é indispensável que o fitopatógeno utilize os recursos energéticos de seu hospedeiro. Ainda os autores, verificaram na *R. solani* dois transcritos degradantes de carboidratos, a alfa-amilase (RsAMY) e betaglucosidase (RsBGLUC) que aumentaram em abundância quando *R. solani* infectou folhas de plantas de soja cultivadas em biocarvão em comparação com a testemunha. Segundo Ajayi-Oyetunde e Bradley (2018), relatam sobre a ação de enzimas que degradam a parede celular específica e a produção de metabólitos tóxicos com várias interações entre o hospedeiro e o fitopatógeno nos diferentes grupos de anastomose de *R. solani*, sendo necessário para melhor compreensão novos estudos sobre o papel dos metabólitos tóxicos não enzimáticos, especialmente o ácido fenilacético e as enzimas que degradam a parede celular específica como os únicos fatores de fitopatogenicidade da infecção do hospedeiro por *R. solani*.

Em estudos sobre o mecanismo molecular de fitopatogenicidade, genes putativos associados a *Rhizoctonia* e o hospedeiro foram identificados por Rioux *et al.* (2011), onde encontraram seis genes putativos relacionados à fitopatogênese mostrando padrões de expressão semelhantes nos fitopatossistemas AG-1/arroz e AG-3/batata durante os estágios

iniciais da infecção, sugerindo que os genes podem ser conservados em grupos de anastomose fitopatogênicos. Lakshman *et al.* (2012) ao identificarem pela análise de marcadores de sequência expressa um isolado de *R. solani* (AG-4), verificaram que os genes putativos associados a fitopatogênese incluíram aqueles envolvidos na formação do apressório, degradação da parede celular da planta, secreção de toxina, proteção da defesa da planta e a invasão de fitopatógenos; no qual foram semelhantes aos genes putativos identificados por Rioux *et al.* (2011).

Além disso, por meio de uma sequência do genoma da doença da bainha do arroz (*R. solani* AG1-IA), Zheng *et al.* (2013) identificaram um conjunto de enzimas ativas de carboidratos (CAZymes) conhecidas por estarem envolvidas na montagem e degradação de carboidratos complexos, incluindo pectinases, xilanases e lacases, bem como transportadores e vários citocromos P450s. No mesmo estudo, três efetores secretados, AG1IA_09161 (domínio da família 2 da glicosiltransferase), AG1IA_05310 (domínio CtaG/cox11 da proteína de montagem da citocromo C oxidase) e AG1IA_07795 (domínio I9 do inibidor de peptidase) foram identificados, representando o primeiro conjunto de efetores a ser relatado em *R. solani*. Hane *et al.* (2014) também identificaram os genes pertencentes à família CAZymes em *R. solani* (AG-8).

Em seus estudos, Zhao *et al.* (2005) identificaram marcadores de repetição de sequência simples associados a resistência moderada à raiz e a podridão do hipocótilo em plantas de soja, constataram que os três marcadores (Satt281, Satt177 e Sat245) foram associados a resistência a um isolado *R. solani* (AG-4).

Com relação a severidade da doença, Chavarro-Mesa *et al.* (2020) avaliando a diversidade de espécies de *Rhizoctonia* associadas a doenças foliares em hospedeiros fabáceos (feijão-caupi e soja) e poáceos (arroz e capim-braquiária [*Urochloa brizantha*]), verificaram que os isolados de *R. solani* (AG1-IF) foram altamente agressivos ao milho, soja e feijão-caupi, sendo a severidade observada entre 29,7 a 76,5% da área foliar infectada. Grandes perdas de produtividade devido queima foliar (31 a 60%) foram relatadas na soja quando as condições favorecem o desenvolvimento da *R. solani* (AG1-IA) (MEYER *et al.*, 2006).

Segundo Youssef *et al.* (2012), avaliando isolados de *Rhizoctonia* obtidos de plantas de soja com sintomas da doença no estado de Roraima, constataram grupamento de anastomose predominante de AG1 pertencentes ao subgrupo AG1-IA, indicando a importância e a presença do fungo na cultura da soja. Nechet *et al.* (2008) avaliando cultivares de soja (BRS Tracajá, BRS Pati, UFV-9, Embrapa 63 (Mirador), Jataí, FT-16, BRS Juçara, BRS Sambaíba, BRSMA Seridó RCH, Padre, Leflore, BRS 219 (Boa Vista), BR-36, IAC 8-2 e IAC-8) em relação à

mela, observaram que todas as cultivares testadas apresentaram incidência da mela nas folhas e vagens, sendo as cultivares com menor severidade da doença foram a Padre, BRS Sambaíba, BRS Seridó e BRS Tracajá, demonstrando a existência da reação diferenciada entre as cultivares, além do uso de genótipos promissores visando resistência à doença nas condições edafoclimáticas de Roraima.

Por outro lado, pouco se sabe sobre os componentes moleculares responsáveis pela suscetibilidade ou resistência da soja aos isolados de *R. solani*, sendo essa informação importante devido ao impacto da doença na agricultura (COPLEY *et al.*, 2017). Para Ajayi-Oyetunde e Bradley (2018), a compreensão dos mecanismos que promovem a infecção e outros aspectos da interação do patógeno-hospedeiro é limitada ao desenvolvimento de genótipos resistentes, pois faltam estudos que elucidem os mecanismos moleculares da fitopatogênese da *R. solani* e a soja, o que provavelmente dificulta as pesquisas direcionadas ao desenvolvimento de germoplasma de soja resistente e sua comercialização.

10. CONCLUSÕES

Não houve diferença no período de incubação da mela *R. solani* (AG1-IF) e (AG1-IA). Todas as plantas de soja apresentaram incidência de 100% dos sintomas da mela.

A severidade e as respostas de resistência dos genótipos de soja foram diferentes entre os dois períodos no controle da *R. solani* (AG1-IF) e (AG1-IA).

No experimento conduzido em diferentes períodos, a severidade da doença variou de <5 a 50% e 11 a >50% de área foliar infectada para *R. solani* (AG1-IF) e (AG1-IA), respectivamente. Nove genótipos (47S, 3S, 1S, 38S, 37S, 36S, 2S, 69S e 67S) de soja apresentaram resistência à mela *R. solani* (AG1-IF), mas nenhum genótipo para a *R. solani* (AG1-IA).

No experimento conduzido no mesmo período, a severidade da mela foi entre 6 a 50% e <5 a 30% de área foliar infectada para *R. solani* (AG1-IF) e (AG1-IA), respectivamente. Um genótipo (96S) de soja apresentou resistência à mela *R. solani* (AG1-IA), mas nenhum genótipo para a *R. solani* (AG1-IF).

11. REFERÊNCIAS

AJAYI-OYETUNDEA, O. O.; BRADLEY, C. A. *Rhizoctonia solani*: taxonomy, population biology and management of rhizoctonia seedling disease of soybean. **Plant Pathology**, v. 67, p. 3-17, 2018.

ARAÚJO, W. F. *et al.* Precipitação pluviométrica provável em Boa Vista, Estado de Roraima, Brasil. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 5, n. 3, p. 563-567, 2001.

BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. Doenças com período de incubação variável em função da fenologia do hospedeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, p. 561-565. 2002.

CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L.V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: John Wiley & Sons, 1990. 532p.

CHANG, K. F. *et al.* Disease reaction to *Rhizoctonia solani* and yield losses in soybean. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 98, n. 1, p. 115-124, 2018.

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. 1-12, 2020.

CHEN, H. *et al.* Differential expression of genes encoding the phenylpropanoid pathway upon infection of soybean seedlings by *Rhizoctonia solani*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 31, p. 356-367, 2009.

CONAB. **Companhia Nacional de Abastecimento Acompanhamento da safra brasileira de grãos - Safra 2021/22**. Disponível em <www.conab.gov.br> Acesso: 31/01. Brasília, v. 9, n. 4, p. 1-98, 2022.

COPLEY, T. *et al.* Biochar amendment modifies expression of soybean and *Rhizoctonia solani* genes leading to increased severity of rhizoctonia foliar blight. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 1-15, 2017.

COSTAMILAN, L. M. *et al.* Podridão-parda da haste da soja: reação de genótipos de soja, na safra 2019/2020. **Circular Técnica 51**, Passo Fundo, RS Maio, 2020, p.1-17.

EMBRAPA. **Cultivar de soja para o cerrado: BRS-7980 ampla resistência a nematoides.** 2016, p.1-2.

GODFRAY, H. C. J. *et al.* The future of the global food system. **Philosophical Transactions: Biological Sciences**, v. 365, n. 1554, p. 2769-2777, 2010.

HANE, J. K. *et al.* Genome sequencing and comparative genomics of the broad hostrange pathogen *Rhizoctonia solani* AG8. **PLoS Genetics**, v. 10, n. 5, p. 1-16, 2014.

HARVILLE, B. G. *et al.* *Rhizoctonia* foliar blight and seed yields in soybeans. **Crop Science**, v. 36, p. 563-566, 1996.

LAKSHMAN D. K. *et al.* Gene expression profiling of the plant pathogenic basidiomycetous fungus *Rhizoctonia solani* AG 4 reveals putative virulence factors. **Mycologia**, v. 104, n. 5, p. 1020-1035, 2012.

LAMICHHANE, J. R. *et al.* Toward a reduced reliance on conventional pesticides in European agriculture. **Plant Disease**, v. 100, n. 1, p. 10-24, 2016.

LOPES, K. B. A. *et al.* Screening of bacterial endophytes as potential biocontrol agentes against soybean diseases. **Journal of Applied Microbiology**, v. 125, p. 1466-1481, 2018.

MEDEIROS, A. C. *et al.* Métodos de inoculação de *Rhizoctonia solani* e *Macrophomina phaseolina* em meloeiro (*Cucumis melo*). **Summa Phytopathologica**, v. 41, n. 4, p. 281-286, 2015.

MEYER, M. C. *et al.* Effect of doses of fungicides and plant resistance activators on the control of *Rhizoctonia* foliar blight of soybean, and on *Rhizoctonia solani* AG1-IA *in vitro* development. **Crop Protection**, v. 25, p. 848-854, 2006.

MONTERO-TAVERA, V. *et al.* Genetic diversity of *Rhizoctonia solani* isolates (Kuhn) from pepper in Mexico. **Revista Mexicana de Ciências Agrícolas**, v. 4, n. 7, p. 1043-1054, 2013.

MUYOLO, N. G. *et al.* Reaction of dry bean, lima bean and soybean cultivars to *Rhizoctonia* root and hypocotyl rot and web blight. **Plant Disease**, v. 77, n. 3, p. 234-238, 1993b.

NECHET, K. L. *et al.* Reação de cultivares de soja à mela (*Thanatephorus cucumeris*) em campo em dois estádios de desenvolvimento das plantas. **Summa Phytopathologica**, v. 34, p. 277-279, 2008.

NECHET, K. L.; HALFELD-VIEIRA, B. A. Efeito do inóculo, período de molhamento foliar e do estágio fenológico do feijão-caupi no desenvolvimento da mela. **Tropical Plant Pathology**, v. 36, n. 2, p. 104-109, 2011.

NECHET, K.; HALFELD-VIEIRA, B. A. Caracterização de Isolados de *Rhizoctonia* spp., associados à Mela do Feijão-Caupi (*Vigna unguiculata*), coletados em Roraima. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 5, p. 505-508, 2006.

NOVAIS, R. F.; NEVES, J. C. L.; BARROS, N. F. **Ensaio em ambiente controlado**. In: OLIVEIRA, A. J.; GARRIDO, W. E.; ARAÚJO, J. D.; LOURENÇO, S., eds. Métodos de pesquisa em fertilidade do solo. Brasília, Embrapa-SEA, 1991. p.189-254.

RIOUX, R. *et al.* Comparative analysis of putative pathogenesis-related gene expression in two *Rhizoctonia solani* pathosystems. **Current Genetics**, v. 57, p. 391-408, 2011.

ROESE, A. D. *et al.* Agrosilvopastoral system enhances suppressiveness to soybean dampingoff caused by *Rhizoctonia solani* and alters *Fusarium* and *Trichoderma* population density. **Acta Scientiarum**, v. 40, p. 1-11, 2018.

SOARES, R. M. *et al.* Escala diagramática para avaliação da severidade da mancha alvo da soja. **Tropical Plant Pathology**, v. 34, n. 5, p. 333-338, 2009.

SONAKAR, V. K. *et al.* Screening of chemical fungicides in control of *Rhizoctonia solani* causing aerial or web blight of soybean. **Ecology, Environment and Conservation**, v. 20, p. 381-386, 2014.

WIBBERG, D. *et al.* Establishment and interpretation of the genome sequence of the phytopathogenic fungus *Rhizoctonia solani* AG1-IB isolate 7/3/14. **Journal of Biotechnology**, v.167, p. 142-155, 2013.

WOICIECKOSKI, C. P.; COSTA, M. L. N. Severidade da *Rhizoctonia solani* em cultivares de soja em relação ao potássio. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v. 10, n. 2, p. 22-27, 2016.

YANG, G.; LI, C. General description of *Rhizoctonia* species complex. **Plant Pathology**, v. 2, p. 41-52, 2012.

YOUSSEF, D. R. *et al.* Caracterização de isolados de *Rhizoctonia* associados à queima foliar em Roraima. **Revista Agro@mbiente On-line**, v. 6, n. 2, p. 158-165, 2012.

ZHAO, G. *et al.* Inheritance and genetic mapping of resistance to rhizoctonia root and hypocotyl rot in soybean. **Crop Science**, v. 45, n. 4, 1441-1447, 2005.

ZHENG, A. *et al.* The evolution and pathogenic mechanisms of the rice sheath blight pathogen. **Nature Communications**, v. 4, p. 1-10, 2013.

12. CAPÍTULO 2: BIOCONTROLE DE *Rhizoctonia solani* (AG1-IF e AG1-IA) NA SOJA POR ISOLADOS BACTERIANOS E A PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO

RESUMO

O fungo *Rhizoctonia solani* está presente nos diferentes tipos de solos, causando danos a uma ampla gama de culturas economicamente importantes. O biocontrole do fungo utilizando bactérias é uma prática alternativa ao controle químico. Nesse contexto, objetivou-se analisar bactérias isoladas de plantas de soja e arroz obtidas no estado de Roraima para o biocontrole da *R. solani* (AG1-IF e AG1-IA) *in vitro* e *in vivo* na cultura da soja e verificar a promoção de crescimento da soja pelos isolados bacterianos. Para o controle biológico da doença foram utilizados 171 bactérias, no qual efetuados o teste de antibiose e a produção de compostos voláteis *in vitro*. De posse dos melhores isolados bacterianos foi verificado a capacidade de solubilização de fosfato, a produção de quitinase e a produção de ácido indol acético *in vitro*. Em seguida, foi analisado a produção de metabólicos termoestáveis *in vitro*, depois foi realizado a microbiolização das sementes de soja e, observado a promoção de crescimento de plantas de soja em casa de vegetação. Posteriormente, investigado o período de incubação, incidência e severidade das plantas de soja pulverizadas com os isolados bacterianos e analisado área abaixo da curva do progresso da doença na capacidade de biocontrole da em casa de vegetação. Por fim, a identificação molecular dos melhores isolados bacterianos. Assim, foi possível selecionar isolados bacterianos de plantas de soja com potencial para o biocontrole da *R. solani*. No teste de antibiose, produção de compostos voláteis e produção de metabólicos termoestáveis *in vitro*, os isolados bacterianos foram responsáveis por inibir o crescimento micelial de *R. solani* (AG1-IF e AG1-IA) superior a 50%. Isolados bacterianos, testaram positivos para capacidade de solubilização de fosfato e a produção de ácido indol acético, exceto a produção de quitinase. Na microbiolização das sementes de soja, foram observados incrementos percentuais da massa fresca das sementes a partir de 130%. Na capacidade de promoção de crescimento da soja, foi influenciada na variável do diâmetro do caule. Nos componentes da massa seca da planta, foram observados incrementos percentuais a partir de 120%. Na capacidade de biocontrole da mela da soja, o período de incubação foi nas primeiras 48 h, no qual todas as plantas apresentaram incidência de 100% dos sintomas da mela. A área abaixo da curva do progresso da doença apresentou uma redução na severidade da mela (*R. solani* AG1-IF e AG1-IA) a partir de 44%.

Palavra-chave: Antibiose. Compostos voláteis. Microbiolização. Promoção de Crescimento.

ABSTRACT

The fungus *Rhizoctonia solani* is present in different types of soils, causing damage to a wide range of economically important crops. Biocontrol of the fungus using bacteria is an alternative practice to chemical control. In this context, the objective was to analyze bacteria isolated from soybean and rice plants obtained in the state of Roraima for the biocontrol of *R. solani* (AG1-IF and AG1-IA) *in vitro* and *in vivo* in soybean culture and to verify the promotion of soybean growth by bacterial isolates. For the biological control of the disease, 171 bacteria were used, in which the antibiosis test and the production of volatile compounds *in vitro* were performed. In possession of the best bacterial isolates, the ability to solubilize phosphate, the production of chitinase and the production of indole acetic acid *in vitro* was verified. Then, the production of thermostable metabolites *in vitro* was analyzed, after which the microbialization of soybean seeds was carried out, and the growth promotion of soybean plants was observed in a greenhouse. Subsequently, the incubation period, incidence and severity of soybean plants sprayed with bacterial isolates were investigated and the area under the curve of disease progress was analyzed in terms of biocontrol capacity in the greenhouse. Finally, the molecular identification of the best bacterial isolates. Thus, it was possible to select bacterial isolates from soybean plants with potential for biocontrol of *R. solani*. In the antibiosis test, production of volatile compounds and production of thermostable metabolites *in vitro*, the bacterial isolates were responsible for inhibiting the mycelial growth of *R. solani* (AG1-IF and AG1-IA) by more than 50%. Bacterial isolates tested positive for phosphate solubilization capacity and indole acetic acid production, except for chitinase production. In the microbialization of soybean seeds, percentage increments of seed fresh mass were observed from 130%. In soybean growth promotion capacity, it was influenced by the stem diameter variable. In the components of the dry mass of the plant, percentage increments were observed from 120%. In the soybean blight biocontrol capacity, the incubation period was the first 48 h, in which all plants showed a 100% incidence of blight symptoms. The area under the disease progress curve showed a reduction in mela severity (*R. solani* AG1-IF and AG1-IA) from 44%.

Keywords: Antibiosis. Growth Promotion. Microbialization. Volatile compounds.

13. INTRODUÇÃO

O fungo *Rhizoctonia solani* Kühn [teleomorfo: *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk] pertence ao filo Basidiomycota, está presente no solo provocando danos a uma ampla gama de culturas economicamente importantes (AJAYI-OYETUNDE; BRADLEY, 2018). A morfologia do fungo consiste em longas ramificações septadas com formação de ângulos retos em suas hifas principais, sendo o fungo incolor na juventude e marrom quando desenvolvido (MONTERO-TAVERA *et al.*, 2013). As espécies de *Rhizoctonia* podem ser diferenciadas pela cor dos micélios, número de núcleos por célula hifálica vegetativa e a morfologia do seu teleomorfo (YANG; LI, 2012).

O fungo compreende 14 grupos de anastomose (AGs) que são caracterizados com base na fusão entre as hifas que engloba AG1 a AG13, AGBI e subgrupos adicionais no grupo intraespecífico (RAZALI *et al.*, 2019). O AG1 foi dividido nos seguintes subgrupos intraespecíficos: IA, IB, IC, ID, IE e IF (YANG; LI, 2012; WIBBERG *et al.*, 2013). Essa caracterização baseia-se no sequenciamento da região ITS-5.8S rDNA dos isolados ou na detecção molecular utilizando conjuntos de iniciadores específicos da espécie (CHAVARRO-MESA *et al.*, 2020).

No entanto, os controles químicos e culturais não são completamente eficazes para controlar a *R. solani* (SAMSATLY *et al.*, 2018). Diante dessa problemática, o controle biológico mostra-se como uma das alternativas aos produtos químicos, sendo livres de resíduos com uso de bactérias antagonistas (BERIC *et al.*, 2013).

Assim, um caso especial de bactérias antagonistas são as endofíticas, pois vivem entre células vegetais vivas, mas não causam sintomas de uma doença (NABRDALIK *et al.*, 2018). Existem as bactérias do filoplano que tem demonstrado resultados promissores no controle de doenças fúngicas (LANNA FILHO *et al.*, 2010). Além disso, existem as rizobactérias que são capazes de induzir efeitos positivos sobre o crescimento e a aptidão das plantas (PII *et al.*, 2015).

A estreita relação estabelecida entre bactérias endofíticas com as plantas permite que elas sejam utilizadas no processo de controle biológico, sendo algumas bactérias endofíticas pertencentes ao: filo *Proteobacteria* gênero *Aeromonas*, *Azospirillum*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Pantoea* e *Pseudomonas*; filo *Bacteroidetes* gênero *Flavobacterium*; filo *Actinobacteria* gênero *Curtobacterium* e *Microbacterium* e filo *Firmicutes* gênero *Bacillus* (DASTAGER *et al.*, 2009; SANTOYO *et al.*, 2016).

Dentre os mecanismos de antagonismo, as espécies de bactérias endofíticas são capazes de excretar substâncias como enzimas líticas, antibióticos e vários metabólitos que podem inibir o crescimento de diferentes microrganismos fitopatogênicos (GUERRERO *et al.*, 2011). Lopes *et al.* (2018) observaram que os isolados do gênero *Bacillus* e *Burkholderia* foram eficazes no controle de *R. solani* na cultura da soja.

Diante do exposto, objetivou-se analisar bactérias isoladas de plantas de soja e arroz obtidas no estado de Roraima para o biocontrole da *R. solani* (AG1-IF e AG1-IA) *in vitro* e *in vivo* na cultura da soja e verificar a promoção de crescimento da soja pelos isolados bacterianos.

14. MATERIAL E MÉTODOS

14.1 Localização da Área de Estudo

Os experimentos foram conduzidos no período de novembro de 2019 a agosto de 2021 no laboratório de fitopatologia e em casa de vegetação, localizados na Embrapa Roraima, município de Boa Vista-RR.

14.2 Coletas de plantas de soja

As plantas sadias de soja foram coletadas de lavouras comerciais de produtores no estado de Roraima e do campo experimental Água Boa da Embrapa Roraima, recolhendo-se em média quatro plantas por área cultivada. Após a coleta, as plantas foram encaminhadas ao Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Roraima, onde foi realizada a separação da parte aérea da planta e a retirada do excesso de solo das raízes por meio de agitação manual. Em seguida, foi realizado o corte e a pesagem de um grama da folha, vagem, semente e raiz de cada uma das plantas coletadas, para o isolamento de bactérias do filoplano e das rizobactérias.

14.3 Controle biológico *in vitro* de *R. solani*

14.3.1 Isolamento de Bactérias do Filoplano e do Rizoplano

As amostras de folha, vagem, semente e raiz foram colocadas separadamente em Erlenmeyers de 125 mL de capacidade, contendo 75 mL de solução salina (0,85% de NaCl) estéril (Figura 3) e submetida a agitação por 30 min em agitador para a obtenção da suspensão.

Figura 3 - Amostras de diferentes partes vegetativas de soja colocadas separadamente em Erlenmeyers contendo solução salina na câmara de fluxo.



Fonte: SILVA, M. R. (2019).

Ao término da agitação, uma alíquota de 1 mL de cada uma das suspensões foi pipetada em tubos de ensaio, contendo 9 mL de solução salina, até a diluição em série 10^{-6} , sendo depositados 100 μ L das amostras obtidas na diluição em placas de Petri, contendo meio de cultura 523 (KADO; HESKETT, 1970), espalhando-se com alça de Drigalski sobre a superfície do meio (Figura 4).

Figura 4 - Diluição seriada das amostras de soja na câmara de fluxo.



Fonte: SILVA, M. R. (2019).

Posteriormente, as placas foram mantidas em incubadora BOD a 27 ± 2 °C, em fotoperíodo de 12 h até o desenvolvimento das colônias, e após 24 horas foi observado o aparecimento de colônias bacterianas. As colônias de formato diferente, coloração e textura foram transferidas para tubos de ensaio contendo meio de cultura 523 e armazenadas em geladeira.

As bactérias isoladas do arroz compõem a coleção de microrganismos do laboratório de fitopatologia da Embrapa Roraima, os isolados bacterianos estão preservados em grãos de trigo, em tubo inclinado e por liofilização.

14.4 Mecanismos de Biocontrole de *Rhizoctonia solani* (AG1-IF e AG1-IA)

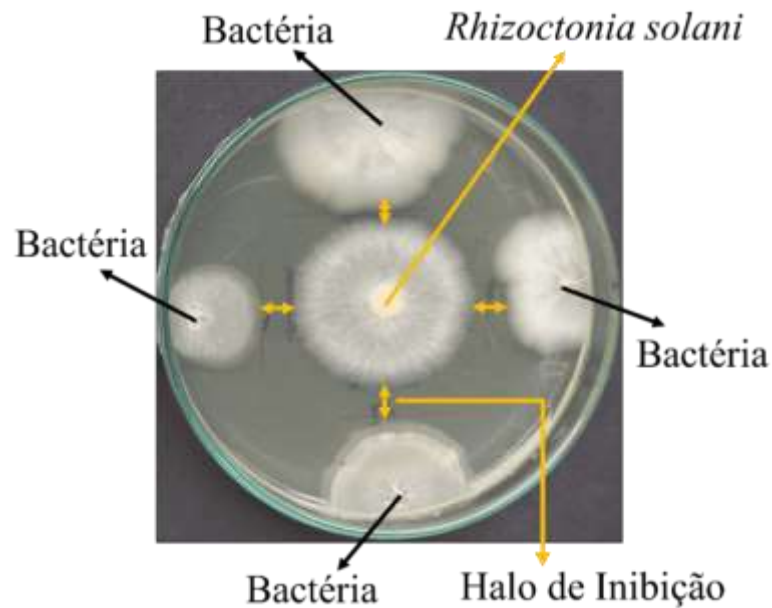
14.4.1 Teste de Antibiose

Após o isolamento, foi efetuado o teste de antagonismo *in vitro* para determinar a eficiência de cada isolado no biocontrole de *R. solani* (AG1-IF e AG1-IA). Os isolados foram testados em meio de cultura BDA, semeando-se quatro bactérias diferentes nas extremidades da placa de Petri e um disco de micélio de *R. solani* de 0,5 cm no centro (ROMEIRO, 2007). Esses discos foram retirados da borda da colônia do fungo. O ensaio experimental foi conduzido em delineamento inteiramente casualizados (DIC), com 171 tratamentos (bactérias) e quatro repetições para cada isolado, como testemunha as placas de Petri foram semeadas apenas com *R. solani* (AG1-IF) e (AG1-IA).

Em seguida, todas as placas foram mantidas a temperatura de 27 ± 2 °C. As avaliações foram realizadas a cada 12 h, medindo-se o crescimento micelial de *R. solani* com o auxílio de um paquímetro digital até o momento em que o fungo presente na placa controle alcançasse o crescimento nas bordas da placa de Petri. Após, foi observado a capacidade antagonista das bactérias em reduzir o crescimento micelial do fungo por meio da presença ou ausência da zona de inibição (ROMEIRO, 2007) (Figura 5). Para calcular a Inibição do Crescimento Micelial (ICM), utilizou-se a seguinte fórmula (EDGINTON *et al.*, 1971):

$$\text{ICM} = \frac{(\text{Crescimento da Testemunha} - \text{Crescimento do Tratamento})}{\text{Crescimento da Testemunha}} \cdot 100$$

Figura 5 - Teste de antibiose *in vitro* em meio de cultura BDA formando uma zona de inibição com diferentes bactérias nas extremidades da placa de Petri e *R. solani* no centro.



Fonte: SILVA, M. R. (2020).

14.4.2 Produção de Compostos Voláteis

As melhores bactérias selecionadas dentre os isolados para o controle de *R. solani* (AG1-IF e AG1-IA) deram continuidade quanto os seus mecanismos de biocontrole.

Para avaliar a produção de compostos voláteis, foram utilizadas placas de Petri de plástico com dois compartimentos. O primeiro compartimento de todas as placas foi preenchido com meio 523 (KADO; HESKETT, 1970) e semeada as diferentes culturas bacterianas, selecionadas no experimento anterior. Já no segundo compartimento foi acrescentado o meio BDA, onde se depositou um disco de micélio de *R. solani* com 5 mm de diâmetro. Como testemunha foi utilizada placas contendo somente o disco de micélio de *R. solani* em meio BDA em um dos compartimentos. As placas foram lacradas com Parafilm “M” (*Pechiney Plastic Packaging*) para isolar a atmosfera interna e evitar a perda de voláteis formados.

Logo após, as placas foram mantidas em BOD a uma temperatura de 27 ± 2 °C, com fotoperíodo de 12 h. O ensaio foi conduzido em DIC contendo quatro repetições para cada tratamento. A produção de compostos voláteis foi verificada medindo a inibição do crescimento micelial (ICM) a cada 12 h durante um dia e comparando-as com as placas controle (Figura 6). Para calcular a ICM, utilizou-se a fórmula proposta por Edginton *et al.* (1971).

Figura 6 - Produção de compostos voláteis *in vitro* por bactéria em meio de cultura 523 formando uma zona de inibição do micélio de *R. solani* em meio BDA.



Fonte: SILVA, M. R. (2020).

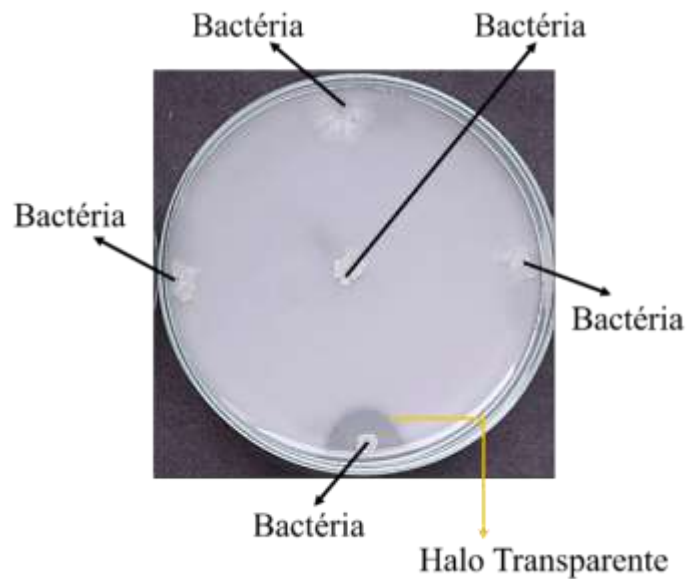
14.4.3 Análise Estatística

Para cada isolado bacteriano, realizou-se um teste de comparação de médias de inibição de crescimento de *R. solani* (AG1-IF e AG1-IA) *in vitro* por meio do teste de Scott-Knott, considerando o nível de 5% de significância. Para as análises adotou-se o programa de linguagem estatística RStudio versão 3.5.1, livre para download no site <http://www.r-project.org/>. Utilizou-se o pacote ExpDes para obtenção dos resultados.

14.5 Capacidade de Solubilização de Fósforo (CSF)

A CSF foi determinada a partir do cultivo dos isolados em meio NBRIP sólido (NAUTIYAL, 1999). Cada bactéria foi semeada em pontos distintos na superfície do meio de cultura e incubada por 10 dias a 27 ± 2 °C, utilizando-se quatro repetições. Após este período foi verificado a formação de halo transparente em torno das colônias indicando a ocorrência da capacidade de solubilização de fósforo de cálcio (Figura 7). A avaliação ocorreu medindo-se a formação de halo transparente com auxílio de um paquímetro digital, definindo-se uma média para cada isolado bacteriano.

Figura 7 - Capacidade de solubilização de fosfato *in vitro* em meio NBRIP com diferentes bactérias nas extremidades e no centro da placa de Petri com formação de halo transparente.

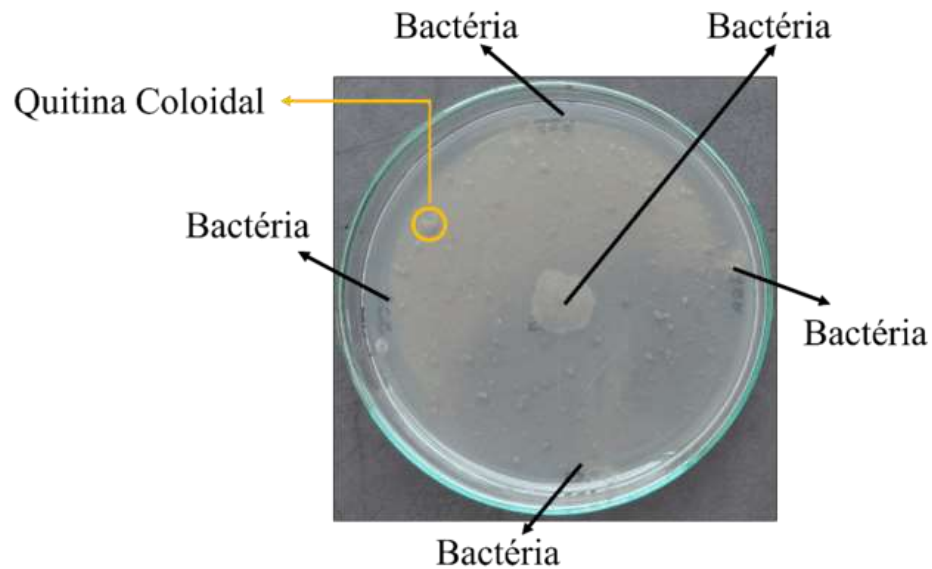


Fonte: SILVA, M. R. (2021).

14.6 Produção de Quitinase (PQ)

A capacidade dos isolados em produzir quitinase foi determinada por meio da utilização do meio mineral de Renwick *et al.* (1991), contendo quitina coloidal a 0,08%, sendo esta a única fonte de carbono. O semeio dos isolados foi realizado em pontos distintos da superfície do meio, adotando-se quatro repetições para cada bactéria e logo em seguida as placas foram incubadas a 27 ± 2 °C durante 10 dias (Figura 8). Após este período, a presença do halo transparente ao redor das colônias indica o resultado positivo da produção de quitinase.

Figura 8 - Produção de quitinase *in vitro* em meio mineral de Renwick contendo quitina coloidal com diferentes bactérias nas extremidades e no centro da placa de Petri.

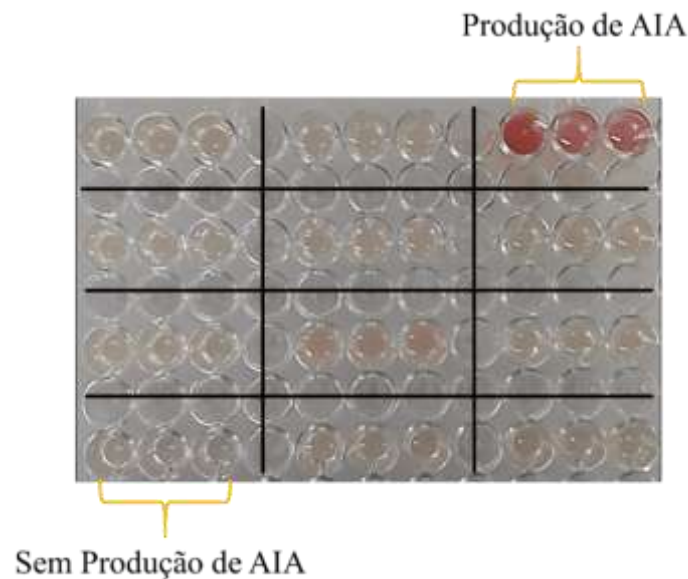


Fonte: SILVA, M. R. (2021).

14.7 Produção de Ácido Indol Acético (AIA)

Foi realizada conforme a metodologia descrita por Sarwar e Kremer (1995). Cada isolado bacteriano foi cultivado em 5 mL de meio de cultura DYGS líquido com $0,050 \text{ g mL}^{-1}$ de triptofano por 48 h a $27 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, sob agitação constante a 150 rpm. Depois do período de incubação, uma alíquota de 1 mL da suspensão bacteriana foi centrifugada por 5 min a 520 g e 75 μL do sobrenadante foram colocados em cavidades contidas em microplacas com capacidade para 150 μL , com três repetições para cada bactéria. Posteriormente, foram adicionados sobre as amostras 50 μL do reagente de Salkowsk (1 mL de $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$ 0,5 M em 50 mL de HClO_4 a 35%) e as placas foram mantidas no escuro por 30 min. Como testemunha negativa e positiva as microplacas foram preenchidas sem bactéria e com bactéria produtora de AIA (ERR-680), respectivamente. A produção de AIA foi identificada por meio da leitura visual das placas ELISA com a presença da coloração rosa (Figura 9).

Figura 9 - Produção de Ácido Indol Acético em meio de cultura DYGS com diferentes bactérias em cavidades da placa ELISA com a presença da coloração rosa.



Fonte: SILVA, M. R. (2021).

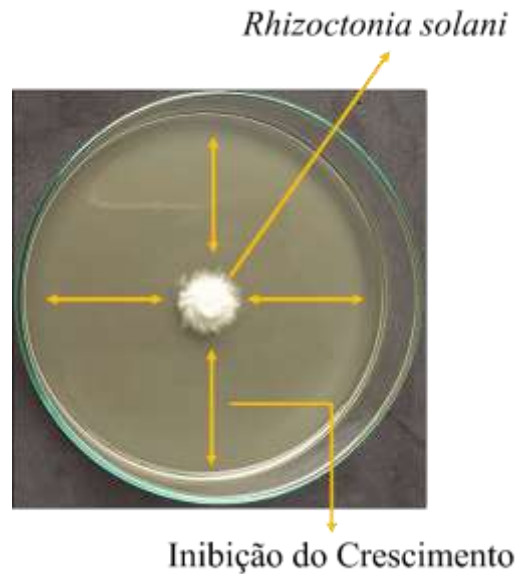
14.8 Produção de Metabólitos Termoestáveis (MT)

Para avaliar a produção de metabólitos termoestáveis, foi utilizado o método de detecção qualitativa de antibióticos, adaptado de Lima *et al.* (2014). Foram preparadas alíquotas de 50 mL de meio 523 em frascos de Erlenmeyer e adicionados os isolados bacterianos, com dois dias de crescimento. Os frascos permaneceram durante dois dias, sob agitação. Após esse período, cada frasco foi autoclavado por 20 minutos a 120 °C, uma alíquota de 10 mL foi retirada e adicionada em frascos de Erlenmeyer contendo 100 mL de meio BDA, em seguida, o caldo agarizado foi vertido em placas de Petri de 9 cm de diâmetro.

No centro das placas foram colocados discos de 5 mm de *R. solani* (AG1-IF) e (AG1-IA), após incubadas em câmara de crescimento BOD sob fotoperíodo de 12 h à temperatura de 27±2 °C. O ensaio experimental foi conduzido em DIC com quatro repetições para cada tratamento, como testemunha a placa de Petri foi vertida com meio BDA, sem a presença do caldo agarizado autoclavado.

A avaliação ocorreu no segundo dia, medindo-se em quatro sentidos diametralmente opostos com auxílio de um paquímetro digital, definindo-se uma média para cada isolado fúngico (Figura 10). Para calcular a ICM, utilizou-se a fórmula proposta por Edginton *et al.* (1971).

Figura 10 - Produção de metabólitos termoestáveis *in vitro* em meio BDA com a inibição do crescimento micelial de *R. solani* no centro da placa de Petri.



Fonte: SILVA, M. R. (2021).

14.9 Microbiolização das Sementes de Soja em Caixa Gerbox

Os isolados bacterianos foram cultivados por 48 h em tubos de ensaio contendo meio 523 (KADO e HESKETT, 1970). Para obtenção da suspensão bacteriana foram adicionados aos tubos solução salina estéril (0,85% de NaCl), seguido por agitação e a concentração ajustada em espectrofotômetro a $Abs_{540} = 0,5$. No dia 10 de julho de 2021, as sementes de soja BRS-Tracajá foram previamente desinfestadas em álcool a 70% por 30 s, seguido de hipoclorito de sódio por 30 s, sendo lavadas por três vezes em água estéril.

Em seguida, 10 sementes foram embebidas em 10 mL da suspensão bacteriana por 60 min e depois transferidas para caixas gerbox contendo papel germitest, previamente umedecido em água utilizando-se 2,5 vezes a massa do papel seco (BRASIL, 2009). Como testemunha negativa e positiva as sementes foram embebidas respectivamente em água destilada estéril e água destilada estéril contendo 20 μ L do fertilizante líquido MASTERMINS[®] (3-15-8).

As caixas gerbox foram mantidas em temperatura ambiente a 25 ± 2 °C com fotoperíodo de 12 h. O delineamento experimental foi em DIC com 25 tratamentos e 10 repetições para as análises de germinação completa (GER) (%) e o desenvolvimento da radícula (RAD) (%). Para massa fresca das sementes (MFS) (g) utilizou-se quatro repetições (Figura 11).

Figura 11 - Microbiolização das sementes de soja por isolados bacterianos da soja e arroz após três dias da sementeira. A - Início da germinação e da radícula; B - Germinação completa e o desenvolvimento da radícula; C - Massa fresca da semente.



Fonte: SILVA, M. R. (2021).

As avaliações foram efetuadas conforme as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009). Os resultados da massa fresca das sementes foi analisado estatisticamente pelo programa computacional software RStudio versão 3.5.1, utilizando-se o teste de Skott-knott a 5% de probabilidade. Utilizou-se o pacote ExpDes para obtenção das análises.

14.9.1 Capacidade de Promoção de Crescimento de Plantas em Condições de Casa de Vegetação

As sementes de soja microbiolizadas nas caixas gerbox foram encaminhadas para casa de vegetação e plantadas em vasos plásticos (300 mL), contendo solo esterilizado em autoclave que foi calcariado e fertilizado com macro e micronutrientes, conforme Novais (1991). Para as condições do experimento, em casa de vegetação, foi utilizado o equipamento Termohigrometro Digital (Jprolab) para leitura das máximas e mínimas da umidade relativa do ar e da temperatura referente ao período do experimento.

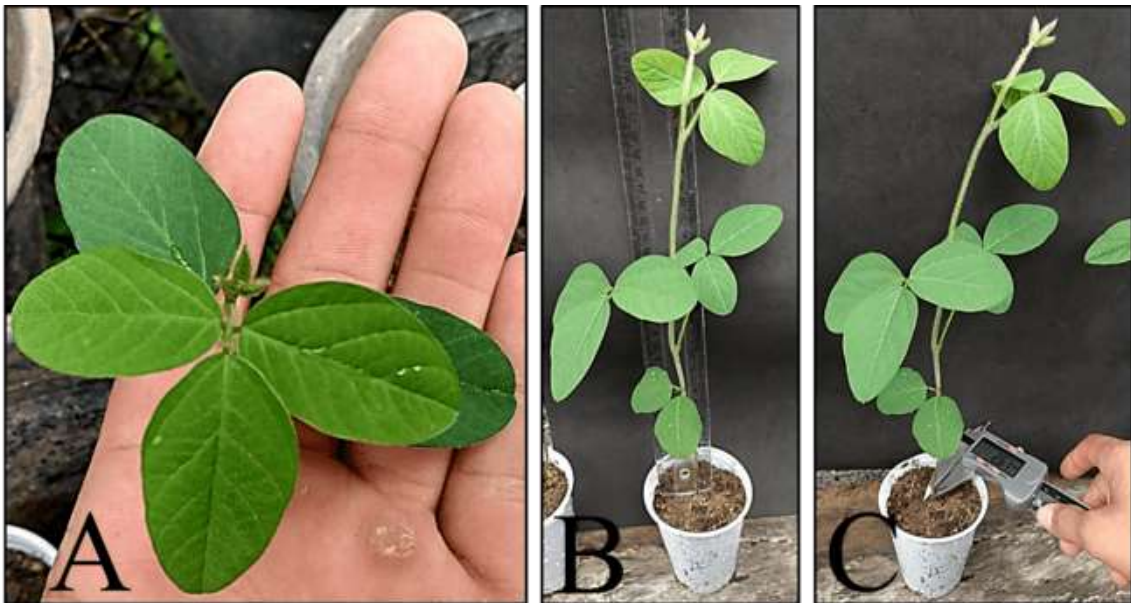
O delineamento experimental utilizado foi em DIC, com 25 tratamentos, contendo quatro repetições, sendo cada repetição constituída por um vaso com uma planta de soja.

Aos 10, 20 e 30 dias após o plantio (DAP), foram avaliadas as variáveis relacionadas às características morfológicas das plantas, mensurando-se: número de folhas (NF), altura da parte aérea (ALT), medida com uma régua (cm), do nível do solo ao meristema apical da

planta, diâmetro do caule (DIA), medido por meio do paquímetro digital (mm) no colo da planta (Figura 12). A umidade relativa do ar permaneceu entre 70 a 60% e a temperatura entre 31,1 a 29,6 °C, respectivamente para as máximas e mínimas.

Os resultados foram analisados estatisticamente pelo programa computacional software RStudio versão 3.5.1, utilizando-se o teste de Tukey a 5% de probabilidade. Utilizou-se o pacote ExpDes para obtenção das análises.

Figura 12 - Promoção de crescimento de plantas de soja por isolados bacterianos da soja e arroz em condições de casa de vegetação. **A** - Contagem do número de folhas; **B** - Altura da parte aérea; **C** - Diâmetro do caule.



Fonte: SILVA, M. R. (2021).

Aos 30 DAP fez-se a colheita das quatro plantas representativas de cada tratamento no estágio VN (enésimo nó), as raízes foram lavadas em água corrente e colocadas em sacos de papel juntamente com a parte aérea. Em seguida, foram encaminhadas ao laboratório de fitopatologia, deixando-se secar em estufa com circulação forçada de ar 60 °C por 72 h para determinação de massa seca da parte aérea (MSPA) (g), massa seca do sistema radicular (MSSR) (g) e massa seca total (MST) (g) (Figura 13).

Os resultados foram analisados estatisticamente pelo programa computacional software RStudio versão 3.5.1, utilizando-se o teste de Skott-knott a 5% de probabilidade. Utilizou-se o pacote ExpDes para obtenção das análises.

Figura 13 - Plantas de soja representativas dos tratamentos com 30 dias após o plantio. **A** - Colheita da parte aérea e do sistema radicular; **B** - Massa seca da parte aérea; **C** - Massa seca do sistema radicular.



Fonte: SILVA, M. R. (2021).

14.10 Capacidade de Biocontrole *in vivo* da Mela da Soja (*R. solani* AG1-IF e AG1-IA) em Casa de Vegetação

As sementes de soja BRS-Tracajá foram cultivadas em tubetes de plástico (200 mL) contendo solo não estéril previamente adubado, conforme a recomendação da cultura (NOVAIS, 1991). Para as condições do experimento, em casa de vegetação, foi utilizado o equipamento Termohigrometro Digital (Jprolab) para leitura das máximas e mínimas da umidade relativa do ar e da temperatura referente ao período do experimento.

14.10.1 Produção dos Isolados Bacterianos

Os isolados bacterianos selecionados foram semeados em meio 523 sólido e incubados a 27 ± 2 °C por 48 h em incubadora BOD e fotoperíodo de 12 h. Posteriormente, foram preparadas alíquotas de 10 mL de meio 523 líquido em frascos de Erlenmeyer e adicionados os isolados bacterianos. Os frascos permaneceram em incubadora com agitação orbital (Shaker) a 180 rpm, a 28 ± 2 °C por 48 h.

14.10.2 Produção do Inóculo de *R. solani* (AG1-IF) e (AG1-IA)

Para a obtenção de fragmentos de micélio de *R. solani* (AG1-IF) e (AG1-IA), os isolados foram semeados em placas de Petri contendo meio BDA e mantido por 48 horas em incubadora a 27 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 h para obtenção das colônias. Após esse período, cinco discos de

micélio foram retirados da periferia das colônias e transferidos para Erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL do meio BD. Os Erlenmeyers foram mantidos em incubadora com agitação orbital (Shaker) a 180 rpm, a 28 ± 2 °C por sete dias.

14.10.3 Delineamento Experimental

O ensaio experimental foi conduzido em DIC com 25 tratamentos com *R. solani* (AG1-IF) e (AG1-IA) e quatro repetições, cada repetição foi constituída por uma planta de soja. Os tratamentos consistiram em 23 isolados bacterianos selecionados no teste de antibiose, um tratamento com fungicida Derosal e a testemunha (sem isolados bacterianos e Derosal).

14.10.4 Condução Experimental em Casa de Vegetação

Aos 20 dias após o plantio (DAP), quando as plantas de soja atingiram o estágio V5 (quinto nó com a quarta folha trifoliolada completamente desenvolvida) as plantas foram pulverizadas com auxílio de um pulverizador manual debaixo para cima com os isolados bacterianos em suspensão ajustada na absorbância a $A_{540}=0,2$, aproximadamente 10^2 células mL^{-1} (Figura 14).

Figura 14 - Pulverização das plantas de soja com os isolados bacterianos após 20 dias do plantio.



Fonte: SILVA, M. R. (2021).

A pulverização com Derosal ocorreu utilizando 2,5 mL do produto. A testemunha foi pulverizada com 10 mL de água estéril. Em seguida, cada tratamento foi protegido com sacos plásticos para evitar possíveis contaminações no período de 24 h.

Após 24 h, retirou-se os sacos plásticos e as plantas de soja foram pulverizadas com a suspensão de fragmentos de micélio na ordem 1×10^8 fgm.mL⁻¹ dos isolados fúngicos de *R. solani* (NECHET; HALFELD-VIEIRA, 2011) (Figura 15). Logo depois, foi colocado em cada tratamento os sacos plásticos por 24 h.

Figura 15 - Inoculação das plantas de soja com os isolados de *R. solani*.



Fonte: SILVA, M. R. (2021).

Posteriormente, removeram-se os sacos plásticos dos tratamentos e as plantas foram mantidas em câmara úmida e borrifadas com água três a quatro vezes ao dia para garantir a saturação da umidade do ar e a presença de água livre nas folhas, no intuito de manter o máximo de umidade por 24 horas para favorecer o aparecimento dos sintomas da doença nas folhas das plantas. Na inoculação com *R. solani* (AG1-IF) e (AG1-IA), a umidade relativa do ar permaneceu entre 87 a 79 % e a temperatura entre 29,1 a 26,6 °C, respectivamente para as máximas e mínimas.

14.10.5 Avaliação da Incubação no Biocontrole *in vivo* da Mela

A avaliação do período de incubação foi realizada após a deposição dos fragmentos de micélio dos isolados de *R. solani* sobre os genótipos de soja e o aparecimento dos sintomas nas folhas, por meio, da visualização da doença observável a olho nu (BERGAMIN FILHO; AMORIM, 2002).

14.10.6 Avaliação da incidência no Biocontrole *in vivo* da Mela

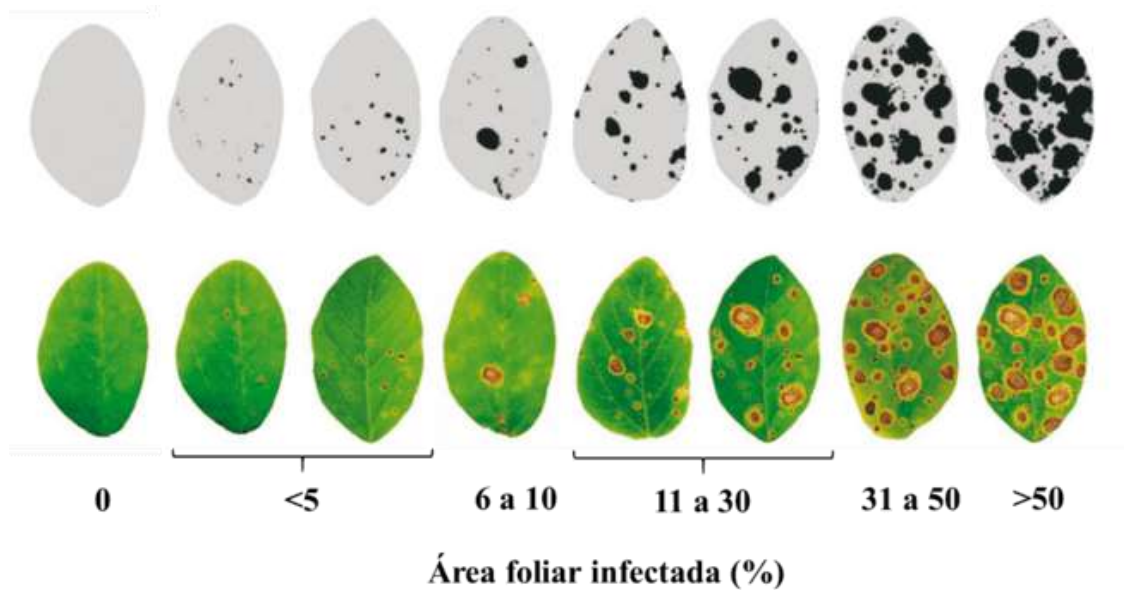
Para a avaliação da incidência, observou-se após a inoculação dos isolados de *R. solani* as folhas dos genótipos de soja com sintomas da doença, durante sete dias. Foram quantificados o número de plantas sintomáticas e número de plantas totais. Assim, a incidência da doença (ID) foi calculada utilizando a seguinte fórmula (CAMPBELL; MADDEN, 1990):

$$\text{ID (\%)} = (\text{Número de Plantas Doentes} / \text{Número Total de Plantas Avaliadas}) \times 100$$

14.10.7 Avaliação da Severidade e as Respostas de Resistência no Biocontrole *in vivo* da Mela

A avaliação da severidade da doença foi realizada após 48 h da inoculação durante quatro dias (48, 72, 96 e 120 h) consecutivos, utilizando-se uma escala de notas de 0 a 5, onde 0 = sem sintomas; 1 = <5% de área foliar infectada (AFI); 2 = 6% a 10% de AFI; 3 = 11% a 30% de AFI; 4 = 31% a 50% de AFI; 5 = >50% de AFI (HARVILLE *et al.*, 1996) (Figura 16).

Figura 16 - Avaliação da severidade da mela da soja pela porcentagem da área foliar infectada.



Fonte: Adptado de Soares *et al.* (2009).

14.10.8 Área Abaixo da Curva do Progresso da Doença (AACPD)

A avaliação da AACPD foi feita em função da severidade da mela, por meio, das escala de notas de 0 a 5. Os dados obtidos foram utilizados para calcular a AACPD, utilizando a fórmula:

$$AACPD = \sum [(y1 + y2)/2] * (t2 - t1)$$

Onde y1 e y2 refere-se a duas avaliações sucessivas da intensidade da doença realizadas nos tempos t1 e t2, respectivamente (SHANER, FINNEY, 1977).

14.10.9 Análise Estatística

Os resultados foram analisados estatisticamente pelo programa computacional software RStudio versão 3.5.1, utilizando-se o teste de Scott-knott a 5% de probabilidade. Utilizou-se o pacote ExpDes para obtenção das análises.

14.11 Extração do DNA dos Isolados Bacterianos

Os 14 melhores isolados bacterianos selecionados nos testes anteriores, foram identificados por técnicas moleculares. Para isso, os isolados foram crescidos no meio de cultura 523 por 24 h a 37 ± 2 °C. Após esse período, foi retirada uma alíquota de 2,5 mL para a extração de DNA com o kit E.Z.N.A.® Bacterial DNA (OMEGA Bio-tek), seguindo as recomendações estabelecidas pelo fabricante. Após a extração de DNA, o mesmo foi quantificado pelo método de fluorometria (Qubit™ 4 Fluorometer) utilizando o Qubit dsDNA BR assay kit (Thermo Fisher scientific). Cerca de 50 a 100 ng de DNA foi utilizado para amplificação do gene a reação em cadeia da polimerase (PCR).

14.11.1 Amplificação do Gene 16S rDNA

Para identificação molecular dos isolados bacterianos, foi realizado à amplificação do gene 16S rDNA utilizando os *primers* universais fD1/rD1 (WEISBURG *et al.*, 1991). As reações de PCR foram conduzidas sob as seguintes condições: 0,2 mM de cada dNTP, tampão contendo 20 mM Tris-HCL e 50 mM KCl, 1,5 mM de MgCl₂, 10 pmol de cada *primer*, 30 ng de DNA, 0,5U da enzima taq DNA polimerase em um volume final de 20 µL. A amplificação foi realizada usando os seguintes ciclos: 95 °C, por 1 minuto; 39 ciclos de 95 °C por 2 minutos, 46 °C por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto; seguidos de uma extensão final por 5 minutos, a 72 °C.

Para confirmar a amplificação dos fragmentos de DNA, os produtos da PCR foram separados por eletroforese. Nessa etapa, 5 µL de cada reação de PCR foram corados com GelRed e essa mistura foi aplicada em poços de gel de agarose (1,5%), que em seguida foi submetido à eletroforese a 80 V por 40 min. Ao fim desse período, o gel foi visualizado sob luz UV por meio de um fotodocumentador Molecular Imaging (*Loccus Biotecnologic L-Pix Chemi*).

Os fragmentos de DNA amplificados dos isolados foram enviados para o sequenciamento na empresa Macrogen Inc. (Seoul, Coréia). As sequências consenso da região 16S rDNA foram submetidas ao programa MEGA, versão 7, para construção de um dendrograma de similaridade.

15. RESULTADOS E DISCUSSÃO

15.1 Isolamento de Bactérias do Filoplano e do Rizoplano

A partir do isolamento de bactérias do filoplano e do rizoplano, foram selecionados 141 isolados bacterianos de genótipos de soja e 30 isolados do arroz (Tabela 5). Observa-se que as raízes da soja foram responsáveis pela maior quantidade de isolados bacterianos, seguidas das folhas e vagens. O genótipo da soja FT4388 obteve a maior quantidade desses isolados, sendo o único a apresentar bactérias nas vagens. Não foram encontrados isolados bacterianos em sementes da soja.

Tabela 5 - Isolados bacterianos de genótipos de soja e arroz em Roraima.

Regiões	Genótipos de Soja	Bactérias da Soja			Total
		Folhas	Raízes	Vagens	
Mucajaí	FT4388	21	30	7	58
Água Boa	8980RR	10	11	0	21
Água Boa	9180RR	10	8	0	18
Água Boa	9280RR	8	7	0	15
Água Boa	9383RR	7	6	0	13
Água Boa	BRS -Tracajá	10	6	0	16
Regiões	Genótipos de Arroz	Bactérias do Arroz			Total
		Folhas	Raízes	Sementes	
Cantá	BRS - Pampera	9	3	0	12
Cantá	IRGA - 424	2	2	2	6
Água Boa	BRS - Catiana	1	0	0	1
Boa Vista	BGA 002712	1	0	0	1
Boa Vista	BGA 005566	1	0	0	1
Boa Vista	BGA 005571	1	0	0	1
Boa Vista	BGA 014194	5	0	2	7
Boa Vista	BGA 014258	1	0	0	1

Total de Isolados Bacterianos 171

15.2 Teste de Antibiose

Dos 171 isolados bacterianos testados, 13 isolados (36S, 148A, 76A, 193A, 124A, 126A, 132A, 147A, 35S, 128A, 134A, 175A e 123A) demonstraram resultados significativos ($p < 0,05$) na redução do crescimento micelial de *R. solani* (AG1-IF) em relação a testemunha (Tabela 6). Dentre os melhores isolados, observa-se que dois foram provenientes de genótipo de soja e 11 de genótipo de arroz.

Os testes foram novamente repetidos com os melhores isolados dos ensaios experimentais, totalizando em 71 isolados, dos quais 20 isolados bacterianos (148A, 98A, 175A, 78S, 126A, 147A, 182A, 53S, 124A, 128A, 123A, 76A, 134A, 52S, 144A, 127S, 95S, 326A, 132A e 84A) apresentaram diferenças ($p < 0,05$) na redução do crescimento micelial de *R. solani* (AG1-IA). Dentre os isolados mais eficientes, verifica-se que cinco isolados foram oriundos de genótipo de soja e 15 de genótipo de arroz.

Verifica-se no presente estudo diferenças na quantidade de isolados bacterianos selecionados entre os isolados fúngicos, possivelmente devido as condições de alta variabilidade e divergência genética entre os grupos de anastomose de *R. solani* (AG1-IF) e (AG1-IA).

Constata-se que dos melhores isolados bacterianos selecionados nos ensaios experimentais encontrou-se 10 isolados (76A, 123A, 124A, 126A, 128A, 132A, 134A, 147A, 148A e 175A) que foram eficientes tanto no controle da *R. solani* AG1-IF quanto da AG1-IA.

Tabela 6 - Teste de antibiose (mm) *in vitro* de *R. solani* (AG1-IF) e (AG1-IA) por isolados bacterianos da soja e arroz.

Isolados Bacterianos / Crescimento Micelial (AG1-IF)										Isolados Bacterianos / Crescimento Micelial (AG1-IA)							
60S	40,992 a	74S	39,218 a	138S	37,610 b	15S	33,803 c	46S	25,513 e	84A	20,115 g	T	39,269 a	128S	23.375 d	128A	16,873 e
105S	40,845 a	68S	39,198 a	70S	37,528 b	130S	33,758 c	49S	25,508 e	87A	19,010 g	32113A	35,728 a	24S	22.910 d	124A	16,793 e
19S	40,725 a	71S	39,150 a	2S	37,500 b	80S	33,723 c	226A	25,285 e	34S	18,605 g	32114A	33,848 b	111S	22.838 d	53S	16,595 e
75S	40,725 a	61S	39,093 a	115S	37,413 b	13S	33,603 c	42S	25,240 e	182A	18,463 g	119S	33,508 b	125S	22.825 d	182A	16,593 e
87S	40,608 a	88S	39,088 a	113S	37,385 b	28S	33,453 c	51S	25,115 e	144A	18,370 g	124S	33,165 b	1S	22.700 d	147A	16,590 e
137S	40,433 a	63S	39,073 a	9S	37,030 b	98S	33,365 c	347A	24,960 e	92A	18,315 g	123S	31,890 b	14S	22.423 d	126A	16,355 e
T	40,428 a	5S	39,048 a	77S	36,818 b	125S	33,145 c	45S	24,930 e	37S	18,148 g	122S	31,480 b	25S	22.273 d	78S	16,310 e
21S	40,358 a	133S	39,035 a	129S	36,758 b	122S	33,015 c	32S	24,448 e	98A	18,108 g	43S	29,935 c	22S	22.220 d	175A	15,668 e
64S	40,203 a	92S	39,020 a	116S	36,690 b	141S	32,988 c	50S	24,170 e	191A	18,098 g	48S	29,665 c	327A	22.208 d	98A	15,213 e
65S	40,168 a	29S	38,980 a	89S	36,550 b	25S	32,965 c	43S	23,865 f	123A	17,788 h	41S	29,618 c	23S	22.133 d	148A	14,980 e
62S	40,153 a	91S	38,935 a	117S	36,373 b	139S	32,820 c	33S	23,863 f	175A	17,695 h	47S	29,538 c	224A	21.493 d		
6S	40,150 a	121S	38,905 a	119S	36,325 b	27S	32,775 c	53S	23,835 f	134A	17,615 h	38S	28,278 c	329A	21.273 d		
104S	40,115 a	94S	38,840 a	18S	36,320 b	22S	32,695 c	327A	23,740 f	128A	17,363 h	37S	28,098 c	325A	21.115 d		
136S	40,060 a	107S	38,665 a	73S	36,228 b	96S	32,273 d	224A	23,390 f	35S	16,853 h	33S	28,080 c	16S	21.020 d		
72S	40,038 a	132S	38,535 a	127S	36,153 b	17S	32,100 d	52S	23,338 f	147A	16,835 h	34S	27,790 c	17S	20.998 d		
84S	39,893 a	134S	38,378 b	69S	36,093 b	14S	31,993 d	44S	23,030 f	132A	16,618 h	141S	27,605 c	191A	20.810 d		
86S	39,888 a	131S	38,245 b	124S	36,055 b	23S	31,915 d	31S	22,670 f	126A	16,263 h	112S	27,383 c	193A	20.623 d		
20S	39,698 a	82S	38,245 b	128S	35,980 b	16S	31,670 d	329A	22,480 f	124A	16,240 h	139S	27,323 c	225A	20.455 d		
59S	39,670 a	85S	38,208 b	97S	35,410 c	24S	31,418 d	32114A	22,215 f	193A	16,213 h	31S	27,213 c	87A	20.373 d		
66S	39,645 a	109S	38,153 b	12S	35,365 c	78S	31,328 d	325A	22,095 f	76A	16,185 h	117S	27,190 c	92A	20.053 d		
76S	39,643 a	110S	38,120 b	79S	35,300 c	354A	31,273 d	225A	21,853 f	148A	16,183 h	44S	27,135 c	84A	19.180 e		
102S	39,613 a	114S	38,115 b	67S	35,185 c	56S	31,168 d	41S	21,833 f	36S	15,918 h	140S	26,830 c	132A	18.953 e		
100S	39,608 a	118S	38,013 b	123S	35,150 c	57S	31,078 d	47S	21,705 f			108S	26,820 c	326A	18.520 e		
103S	39,515 a	101S	37,975 b	11S	35,120 c	1S	30,945 d	30S	21,490 f			40S	25,926 c	95S	18.408 e		
4S	39,503 a	83S	37,925 b	10S	35,018 c	140S	30,930 d	326A	21,255 f			39S	25,793 c	127S	18.053 e		
106S	39,465 a	126S	37,875 b	112S	34,803 c	55S	30,383 d	38S	21,120 f			27S	25,603 c	144A	17.630 e		
3S	39,390 a	90S	37,820 b	8S	34,678 c	58S	29,390 d	32113A	21,118 f			30S	24,843 c	52S	17.553 e		
99S	39,310 a	81S	37,780 b	111S	34,055 c	95S	27,635 e	40S	20,710 g			35S	24,130 d	134A	17.310 e		
135S	39,303 a	120S	37,753 b	108S	34,023 c	388A	27,403 e	48S	20,448 g			36S	23,620 d	76A	17.258 e		
7S	39,290 a	26S	37,670 b	93S	33,970 c	54S	26,780 e	39S	20,225 g	CV (%)	6,86	130S	23,603 d	123A	16.893 e	CV (%)	11,18

Médias do crescimento micelial seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. S - Bactérias da Soja; A - Bactérias do Arroz; T - Testemunha; CV - Coeficiente de variação.

De acordo com a Tabela 7, observa-se os genótipos de soja e arroz com seus respectivos isolados bacterianos selecionados nos testes de antagonismo *in vitro* e o percentual de inibição de *R. solani* (AG1-IF) e (AG1-IA). Verifica-se que o isolado bacteriano da rizosfera proveniente do genótipo da soja FT4388 foi o único responsável por inibir o *R. solani* (AG1-IF), que também apresentou resultados significativos com bactérias do filoplano no controle de *R. solani* (AG1-IA). Outros genótipos da soja como 9180RR, BRS-Tracajá e 8980RR também apresentaram resultados satisfatórios, sendo encontrada uma bactéria do filoplano e duas da rizosfera.

Tabela 7 - Inibição do crescimento micelial de *R. solani* (AG1-IF) e (AG1-IA) com os melhores isolados bacterianos.

<i>R. solani</i> (AG1-IF)			<i>R. solani</i> (AG1-IA)		
Genótipos	Isolados Bacterianos	% ICM	Genótipos	Isolados Bacterianos	% ICM
BRS Pampera	123A Filoplano	56,0	BGA 005566	84A Filoplano	51,2
BRS Pampera	175A Rizosfera	56,2	BRS Pampera	132A Filoplano	51,7
BRS Pampera	134A Filoplano	56,4	BGA 014194	326A Filoplano	52,8
BRS Pampera	128A Filoplano	57,1	9180RR	95S Rizosfera	53,1
FT4388	35S Rizosfera	58,3	BRS Tracajá	127S Filoplano	54,0
BRS Pampera	147A Filoplano	58,4	BRS Pampera	144A Filoplano	55,1
BRS Pampera	132A Filoplano	58,9	FT4388	52S Filoplano	55,3
BRS Pampera	126A Filoplano	59,8	BRS Pampera	134A Filoplano	55,9
BRS Pampera	124A Filoplano	59,8	BGA 002712	76A Filoplano	56,1
IRGA 424	193A Filoplano	59,9	BRS Pampera	123A Filoplano	57,0
BGA 002712	76A Filoplano	60,0	BRS Pampera	128A Filoplano	57,0
BRS Pampera	148A Filoplano	60,0	BRS Pampera	124A Filoplano	57,2
FT4388	36S Rizosfera	60,6	FT4388	53S Filoplano	57,7
			BRS Pampera	182A Rizosfera	57,7
			BRS Pampera	147A Filoplano	57,8
			BRS Pampera	126A Filoplano	58,4
			8980RR	78S Rizosfera	58,5
			BRS Pampera	175A Rizosfera	60,1
			BGA 005571	98A Semente	61,3
			BRS Pampera	148A Filoplano	61,9

S - Bactérias da Soja; A - Bactérias do Arroz; ICM - Inibição do crescimento micelial.

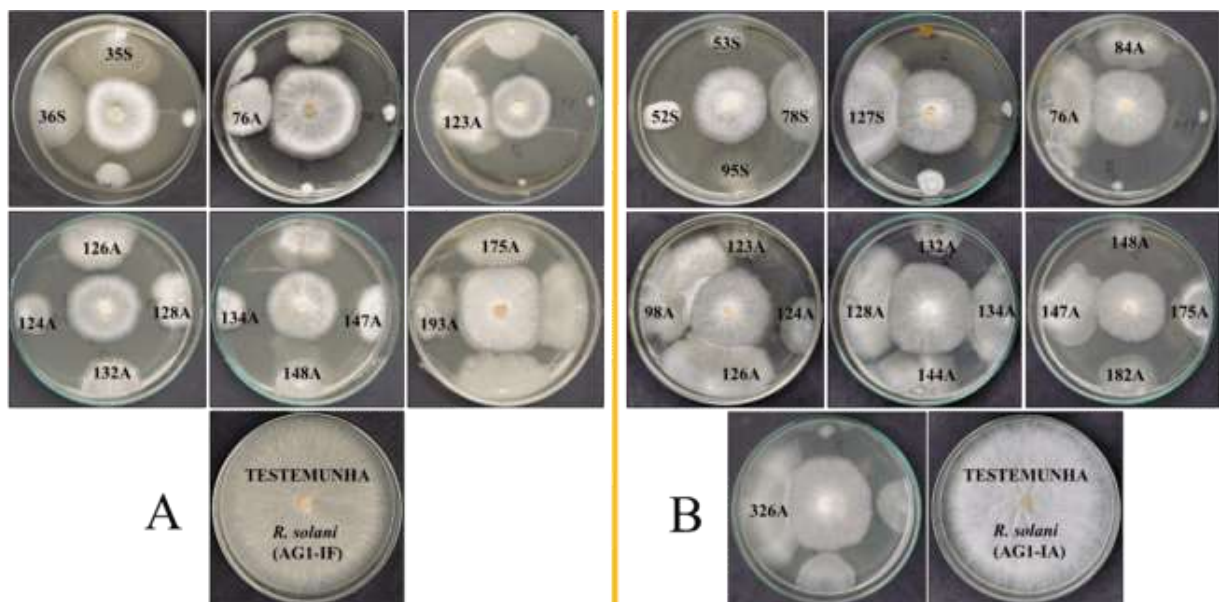
A porcentagem de inibição do crescimento micelial de *R. solani* (AG1-IF) ficou entre 56,0 a 60,6% e para *R. solani* (AG1-IA) variou entre 51,2 a 61,9%. Segundo Guerrero *et al.* (2011), os isolados bacterianos são capazes de produzir várias substâncias como enzimas líticas, antibióticos e vários metabólitos que podem inibir o crescimento de microrganismos fitopatogênicos.

Com relação a inibição do crescimento micelial, resultados similares foram encontrados por Raj *et al.* (2019) ao avaliarem bactérias contra *R. solani in vitro*, observaram que os isolados de *Bacillus subtilis* e *B. amyloliquefaciens* foram eficientes na inibição com 68,8 e 68,6%, respectivamente. Li *et al.* (2011a) ao utilizarem o isolado *Burkholderia* sp. procedente da rizosfera de plantas de arroz, constataram efeitos significativos na atividade antagonista contra o *R. solani in vitro*.

Em seus estudos, Yi-Yang *et al.* (2017) alcançaram o controle da *R. solani* de 32,3 a 78,8% utilizando a *Pseudomonas fluorescens*, além da promoção de crescimento de 18,4% na cultura do arroz. Adesina *et al.* (2009), descrevem que a bactéria *Pseudomonas jessenii* associada à raiz da alface tem potencial antagonístico *in vitro* contra a *R. solani*.

Na Figura 17, observa-se a inibição do crescimento micelial *in vitro* de *R. solani* (AG1-IF) e (AG1-IA) pelos isolados bacterianos da soja e arroz, por meio da formação de halo de inibição confirmando a ocorrência da antibiose. A formação de halo de inibição, ocorre quando o crescimento da *R. solani* é interrompida ou acontece um atraso ao se aproximar dos isolados bacterianos.

Figura 17 - Inibição do crescimento micelial *in vitro* por isolados bacterianos da soja (S) e arroz (A). **A** - Inibição de *R. solani* (AG1-IF) pelos 13 isolados bacterianos; **B** - Inibição de *R. solani* (AG1-IA) pelos 20 isolados bacterianos.



Fonte: SILVA, M. R. (2020).

Tais resultados podem ser atribuídos devido a produção de metabólitos que pode resultar na completa lise e dissolução da estrutura celular que independe do contato físico entre os microrganismos (REMUSKA; PRIA, 2007). Assim, a inibição do fungo *in vitro* não se correlaciona necessariamente com o desempenho *in vivo*, sendo indispensável novos estudos com testes realizados em casa de vegetação e no campo para comprovar a eficiência dos isolados bacterianos na inibição da *R. solani* (AG1-IF) e (AG1-IA).

15.3 Produção de Compostos Voláteis

Com base nos resultados da antibiose, realizou-se ensaios experimentais com *R. solani* (AG1-IF) e (AG1-IA) para verificação da produção de compostos voláteis *in vitro* com os melhores isolados bacterianos (Tabela 8). Observa-se que dos 13 isolados analisados para *R. solani* (AG1-IF), os isolados 147A e 193A foram mais significativos ($p < 0,05$) em relação aos demais tratamentos, apresentando redução do crescimento micelial de 57,5 a 56,3%, respectivamente.

Tabela 8 - Produção de compostos voláteis *in vitro* por isolados bacterianos da soja e arroz e a inibição do crescimento micelial de *R. solani* (AG1-IF) e (AG1-IA).

Isolados Bacterianos / Compostos Voláteis (AG1-IF)			Isolados Bacterianos / Compostos Voláteis (AG1-IA)		
		% ICM			% ICM
T	35,434 a	-	T	41,378 a	-
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 126A	24,458 b	31,0	<i>Pseudomonas tohonis</i> 95S	29,005 b	29,9
124A	22,936 b	35,3	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 126A	27,408 b	33,8
<i>Bacillus paralicheniformis</i> 35S	22,908 b	35,4	84A	26,094 c	36,9
36S	22,641 b	36,1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 132A	25,790 c	37,7
148A	22,480 b	36,6	144A	24,950 c	39,7
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 76A	22,199 b	37,4	128A	24,624 c	40,5
175A	21,476 b	39,4	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 127S	24,372 c	41,1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 132A	20,453 b	42,3	<i>Bacillus stercoris</i> 123A	23,054 d	44,3
128A	20,441 b	42,3	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 98A	21,660 d	47,7
<i>Bacillus stercoris</i> 123A	19,043 c	46,3	<i>Enterobacter chengduensis</i> 52S	21,620 d	47,8
<i>Bacillus stercoris</i> 134A	17,693 c	50,1	182A	20,020 e	51,6
<i>Bacillus stercoris</i> 193A	15,469 d	56,3	124A	19,935 e	51,8
<i>Bacillus stercoris</i> 147A	15,066 d	57,5	<i>Bacillus subtilis</i> 53S	19,733 e	52,3
CV(%)	10,92		<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 76A	19,591 e	52,7
			326A	19,417 e	53,1
			<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 78S	18,935 e	54,2
			175A	17,515 f	57,7
			<i>Bacillus stercoris</i> 134A	17,426 f	57,9
			148A	16,063 f	61,2
			<i>Bacillus stercoris</i> 147A	15,848 f	61,7
			CV(%)	7,48	

Médias do crescimento micelial seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. S - Bactérias da Soja; A - Bactérias do Arroz; C - Placa Controle; CV - Coeficiente de variação; ICM - inibição do crescimento micelial.

A respeito da redução do crescimento micelial de *R. solani* (AG1-IA) foram analisados 20 isolados bacterianos, dos quais quatro isolados (147A, 148A, 134A, 175A) apresentaram efeitos significativos ($p < 0,05$) em comparação aos outros tratamentos, demonstrando inibição de 61,7; 61,2; 57,9; e 57,7%, respectivamente.

A produção dos compostos voláteis é uma informação importante para explicar o mecanismo de biocontrole do fungo pelos isolados bacterianos em condições *in vitro*, no qual observa-se que os melhores isolados apresentaram resultados significativos superiores a 50% na inibição dos fungos. Verifica-se entre essas bactérias a presença do isolado 147A, sendo eficiente no controle da *R. solani* (AG1-IF) e (AG1-IA).

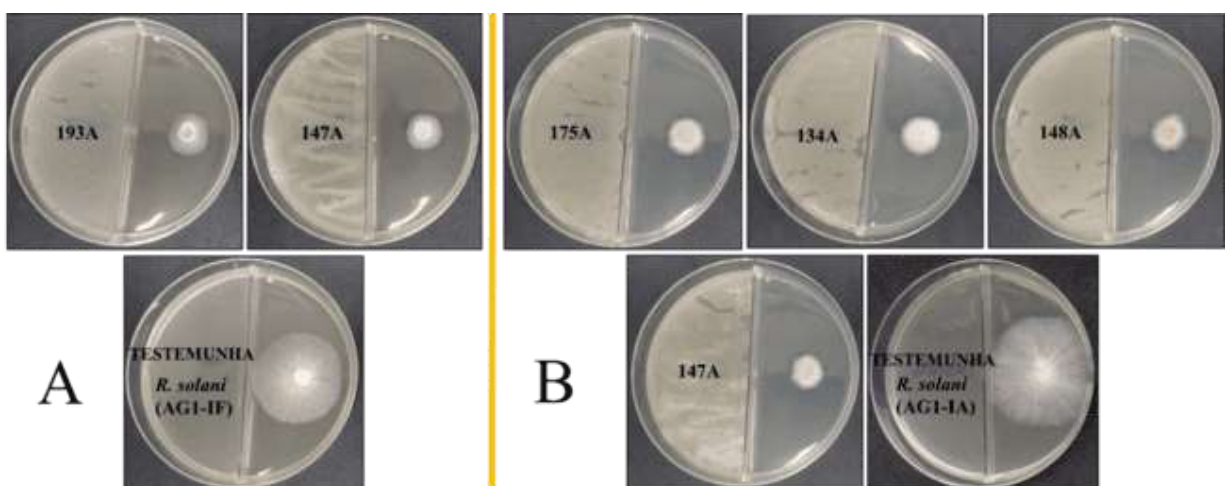
Segundo Lanna Filho *et al.* (2010), alguns estudos demonstram que microrganismos capazes de inibir o crescimento micelial acima de 40% são considerados eventuais agentes de biocontrole.

Nessa perspectiva, resultados parciais foram relatados por Tamreihao *et al.* (2016) que confirmaram o potencial significativo dos compostos voláteis produzidos *in vitro* por *Streptomyces corchorusii* na inibição de *R. solani* entre 37,9 a 56,4%. Em seus estudos, Abdeljalil *et al.* (2016) observaram metabólitos voláteis de isolados de rizobactérias (*Bacillus thuringiensis*, *B. subtilis* e *Enterobacter cloacae*) que apresentaram atividade antifúngica contra *R. solani in vitro*.

Resultados superiores foram relatados por Lopes *et al.* (2018) ao analisarem que os isolados do gênero *Bacillus* sp. e *Burkholderia* sp. foram eficientes no controle de *R. solani in vitro*, por meio da presença de compostos voláteis que impediram o crescimento entre 71,4 a 100%. Em seus relatos, Elkahoui *et al.* (2014) verificaram que o isolado de *Pseudomonas* sp. apresentou elevada atividade antifúngica de 86% contra *R. solani in vitro*, por meio da produção de compostos voláteis à base de enxofre.

Observa-se na Figura 18, o mecanismo de inibição do crescimento micelial *in vitro* de *R. solani* (AG1- IF) e (AG1 - IA) pelos melhores isolados bacterianos do arroz, por meio da produção de compostos voláteis. Os isolados bacterianos são capazes de produzir variados grupos de compostos, como os alcenos, hidrocarbonetos aromáticos, álcoois, terpenos, ésteres, cetonas e compostos de enxofre (LI *et al.*, 2010).

Figura 18 - Inibição do crescimento micelial *in vitro* por isolados bacterianos do arroz (A). **A** - Inibição do crescimento de *R. solani* (AG1-IF) por dois isolados bacterianos; **B** - Inibição do crescimento de *R. solani* (AG1-IA) por quatro isolados bacterianos.



Fonte: SILVA, M. R. (2020).

A ação dos compostos voláteis foi descrita por Elkahoui *et al.* (2014) ao observarem que o isolado de *Pseudomonas* sp. induziu várias mudanças na morfologia das hifas de *R. solani*

como o surgimento de uma coloração marrom na periferia do micélio. Ainda os autores, por meio da análise de microscopia de luz do micélio de *R. solani* encontraram grandes alterações das células como aumento da vesiculação do citoplasma, desorganização do protoplasma e espessamento da parede celular.

15.4 Avaliação da Solubilização de Fosfato, Produção de Quitinase e de Ácido Indol acético

De acordo com a Tabela 9, verifica-se os mecanismos de ação pelas melhores bactérias selecionadas nos testes anteriores. Das 23 bactérias isoladas das plantas de soja e arroz, foram analisados a capacidade de solubilização de fosfato (CSF), a produção de quitinase (PQ) e a produção de ácido indol acético (AIA).

Tabela 9 - Avaliação dos mecanismos de ação de bactérias isoladas de plantas de soja e arroz.

Isolados Bacterianos	Mecanismos de Ação		
	CSF	PQ	AIA
<i>Bacillus paralicheniformis</i> 35S	-	-	+
36S	-	-	+
<i>Enterobacter chengduensis</i> 52S	+	-	+
<i>Bacillus subtilis</i> 53S	-	-	+
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 76A	-	-	+
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 78S	-	-	+
84A	-	-	-
<i>Pseudomonas tohonis</i> 95S	-	-	+
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 98A	-	-	-
<i>Bacillus stercoris</i> 123A	+	-	-
124A	-	-	+
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 126A	-	-	+
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 127S	-	-	+
128A	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 132A	+	-	-
<i>Bacillus stercoris</i> 134A	-	-	-
144A	-	-	-
<i>Bacillus stercoris</i> 147A	-	-	+
148A	-	-	+
175A	-	-	+
182A	-	-	+
<i>Bacillus stercoris</i> 193A	-	-	+
326A	-	-	+

Testes com resultados positivos (+) e resultados negativos (-). CSF - Capacidade de Solubilização de Fosfato; PQ - Produção de Quitinase; AIA - Produção de Ácido Indol Acético.

A CSF foi observada em três bactérias, sendo o isolado 52S proveniente do filoplano do genótipo da soja FT4388 e os isolados 123A e 132A referentes ao filoplano do genótipo de arroz BRS-Pampera. Com relação a PQ, não foi verificado entre as bactérias.

Já a produção de AIA foi observada em 16 bactérias, sendo sete isolados (35S, 36S, 52S, 53S, 78S, 95S e 127S) provenientes de diferentes genótipos de soja e nove isolados (76A, 124A, 126A, 147A, 148A, 175A, 182A, 193A e 326A) referentes aos diferentes genótipos de arroz.

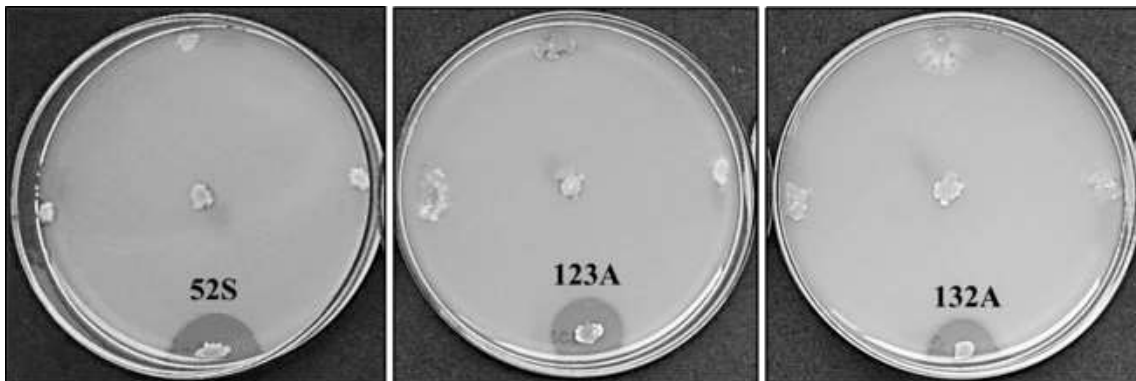
Conforme Chen *et al.* (2017), destacam que o fósforo é o segundo macronutriente mais importante, elemento limitante ao crescimento das plantas, além do nitrogênio. Entretanto, os autores esclarecem que a maior parte do fósforo no solo está na forma insolúvel, como fosfato de alumínio ($AlPO_4$) ou fosfato férrico ($FePO_4$), que não pode ser assimilado pelas culturas. Segundo Ribeiro *et al.* (2018), as bactérias possuem a CSF no solo e também a capacidade de produzir metabólitos, como AIA, importante na absorção de nutrientes e na promoção de crescimento de plantas.

Em seus estudos, Verma *et al.* (2010) avaliando os isolados de *Rhizobium* spp, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus megaterium* e *Azotobacter chroococcum*, constataram que as bactérias foram consideradas positivas para a CFS e a produção de AIA, indispensável para a promoção de crescimento de plantas. Observa-se também o *Bacillus thuringiensis* relatado como promotor de crescimento de plantas por produzir AIA e a CFS (BABU *et al.*, 2013; CHERIF-SILINI *et al.*, 2016).

15.5 Capacidade de Solubilização de Fosfato

Na Figura 19, observa-se a CSF *in vitro* pelas bactérias da soja e arroz, por meio da formação do halo transparente ao redor dos isolados 52S, 123A e 132A. A média do diâmetro da formação do halo transparente foram de 5,89, 6,32 e 5,17 mm, respectivamente.

Figura 19 - Capacidade de solubilização de fosfato *in vitro* em meio NBRIP com diferentes bactérias nas extremidades e no centro da placa de Petri com formação de halo transparente.



Fonte: SILVA, M. R. (2021).

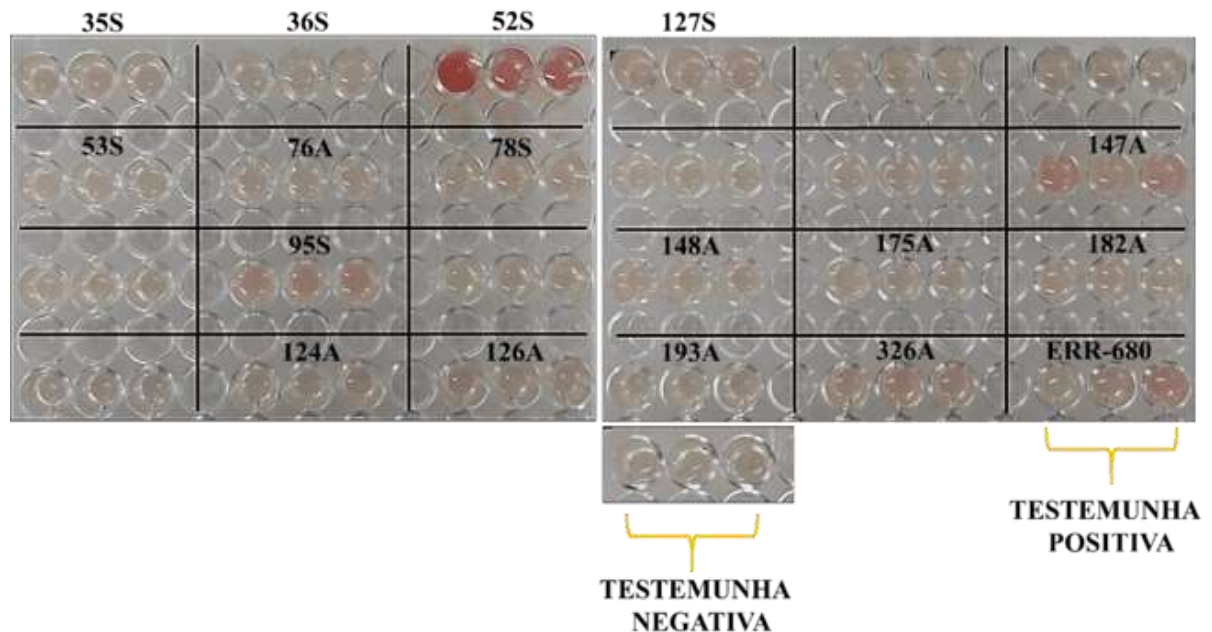
Resultados similares foram encontrados por Tensingh e Jemeema (2015), que identificaram os isolados de *Bacillus* e *Pseudomonas* com a CSF de 2 a 5 mm, onde a maior solubilização encontrada foi de *Pseudomonas putida* (5 mm) seguida por *P. flourescens* (4 mm) e a menor solubilização foi de *Bacillus megaterium* (2 mm), em condições *in vitro*. Destaca-se também as espécies de *Bacillus* sp. incluindo *B. amyloliquefaciens*, *B. megaterium* e *B. subtilis*, isoladas de plantas de milho, arroz e soja, eficientes por solubilizar fosfatos insolúveis (BABU *et al.*, 2017; BORAH *et al.*, 2017; KIM *et al.*, 2017).

Wei *et al.* (2018) destacam que as bactérias com a CFS são definidas como verdadeiras ao formarem um halo transparente, além da participação da enzima fosfatase que é frequentemente relatada no processo de solubilização de fosfato inorgânico. Nesse sentido, as bactérias solubilizam o fosfato insolúvel pela produção de ácidos orgânicos, cuja ação é atribuída às suas propriedades quelantes, possibilitando a formação de complexos estáveis com os íons Ca^{+2} , Fe^{+3} e Al^{+3} (VENIERAKI *et al.*, 2010).

15.6 Produção de Ácido Indol Acético

Conforme a Figura 20, verifica-se que 69,57 % das bactérias da soja e arroz foram responsáveis pela produção de AIA nas cavidades da placa ELISA, identificando sua produção por meio da coloração rosa.

Figura 20 - Produção de Ácido Indol Acético em meio de cultura DYGS com diferentes bactérias em cavidades da placa ELISA com a presença da coloração rosa.



Fonte: SILVA, M. R. (2021).

Resultados semelhantes foram descrito por Hussain e Srinivas (2013), ao isolarem espécies de *Pseudomonas* spp e *Azotobacter* spp da rizosfera de *Cacia nilotica* e *Albizia lebbek*, observaram que 70% dos isolados produziram AIA. Outros estudos relataram que espécies de *Bacillus* spp. são bons produtores de AIA (WALPOLA; YOON, 2013), como exemplo, o *B. safensis* excelente produtor de AIA (MUKHTAR *et al.*, 2017).

15.7 Produção de Metabólitos Termoestáveis

Na Tabela 10, observa-se a produção de metabólitos termoestáveis (MT) e a inibição do crescimento micelial (ICM) de *R. solani* (AG1-IF e AG1-IA) *in vitro* pelas bactérias da soja e arroz. Foram analisados 13 e 20 isolados bacterianos para *R. solani* (AG1-IF) e (AG1-IA), respectivamente, conforme a seleção no teste de antibiose.

Tabela 10 - Produção de metabólitos termoestáveis *in vitro* por bactérias da soja e arroz e a inibição do crescimento micelial de *R. solani* (AG1-IF) e (AG1-IA).

Isolado Bacteriano / Metabólitos Termoestáveis (AG1-IF)		% ICM	Isolado Bacteriano / Metabólitos Termoestáveis (AG1-IA)		% ICM
T	38,557 a	-	T	41,249 a	-
148A	36,334 b	5,8	<i>Pseudomonas tohonis</i> 95S	39,996 b	3,0
<i>Bacillus paralicheniformis</i> 35S	34,469 c	10,6	148A	38,951 b	5,6
175A	31,228 d	19,0	<i>Enterobacter chengduensis</i> 52S	38,884 b	5,7
<i>Bacillus stercoris</i> 193A	30,570 d	20,7	<i>Bacillus stercoris</i> 123A	33,177 c	19,6
36S	28,948 e	24,9	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 132A	32,124 c	22,1
124A	28,867 e	25,1	124A	31,181 c	24,4
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 76A	28,103 e	27,1	<i>Bacillus stercoris</i> 134A	29,833 d	27,7
<i>Bacillus stercoris</i> 134A	27,946 e	27,5	144A	29,831 d	27,7
<i>Bacillus stercoris</i> 123A	26,239 f	31,9	<i>Bacillus subtilis</i> 53S	29,691 d	28,0
<i>Bacillus stercoris</i> 147A	25,639 f	33,5	128A	29,567 d	28,3
128A	23,356 g	39,4	175A	28,924 d	29,9
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 132A	21,893 g	43,2	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 76A	28,923 d	29,9
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 126	4,099 h	89,4	182A	28,718 d	30,4
A					
CV (%)	4,21		<i>Bacillus stercoris</i> 147A	27,792 d	32,6
			<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 78S	22,294 e	46,0
			<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 126A	14,012 f	66,0
			84A	12,955 f	68,6
			326A	11,856 f	71,3
			<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 127S	10,928 g	73,5
			<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 98A	9,452 g	77,1
			CV (%)	4,68	

Médias do crescimento micelial seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. N°+S - Bactérias da Soja; N°+A - Bactérias do Arroz; T - Testemunha; CV - Coeficiente de variação; ICM - inibição do crescimento micelial.

Dentre os 13 isolados bacterianos, verifica-se que o isolado 126A foi mais significativo ($p \leq 0,05$) na produção de MT com relação aos demais tratamentos, apresentou redução do crescimento micelial de *R. solani* (AG1-IF) de 4,099 mm. Com relação a ICM, observa-se que o isolado 126A referente ao filoplano do genótipo de arroz BRS-Pampera foi responsável pela inibição de 89,4%.

Já os 20 isolados bacterianos, constata-se que os isolados 98A e 127S foram mais significativos ($p < 0,05$) na produção de MT em comparação aos outros tratamentos, observa-se uma redução no crescimento micelial de *R. solani* (AG1-IA) de 9,452 e 10,928 mm, respectivamente. Sobre a ICM, o isolado 98A pertencente a semente do genótipo de arroz BGA - 005571 apresentou inibição de 77,1% e o isolado 127S originário do filoplano do genótipo de soja BRS - Tracajá com redução de 73,5%.

De acordo com os resultados encontrados, os MT produzidos pelos isolados bacterianos apresentaram estabilidade térmica depois de serem expostos a 120 °C por 20 minutos, permanecendo suas características antifúngicas. Outros estudos demonstram ao relatarem que os MT com atividade antifúngica que apresentam caldo agarizado autoclavado são termoestáveis, pois resistem a altas temperaturas com suas características inalteradas e que seu modo de antagonismo a outros microrganismos é principalmente a antibiose (LIMA *et al.*, 2014; BRAGA JUNIOR *et al.*, 2017).

Assim, a estabilidade térmica dos produtos liberados pelos isolados bacterianos dão indícios que possam ser utilizados no biocontrole da mela da soja em condições de campo, devido à suas propriedades antifúngicas já observadas contra os isolados de *R. solani*. Segundo Amaro *et al.* (2018), bactérias do gênero *Bacillus* apresentam potencial no biocontrole de fungos fitopatogênicos e vantagens para utilização comercial na agricultura. Outros autores confirmam que as espécies de *Bacillus* produzem compostos termoestáveis que inibem o crescimento do patógeno, como *Fusarium circinatum* (SORIA *et al.*, 2012).

Fuga *et al.* (2016) avaliando o efeito de 46 isolados de *Bacillus* spp. na inibição do crescimento micelial da podridão branca (*Sclerotium cepivorum*), constataram a produção de MT por quatro isolados que limitaram o crescimento do fungo entre 42 a 50% ao serem adicionados em meio BDA. Já Amaro *et al.* (2018) analisando 23 isolados de *Bacillus subtilis* que inibiram o crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*, observaram que 10 dos 23 isolados bacterianos foram mais promissores, reduzindo o crescimento micelial fúngico entre 48,75 a 72,01%.

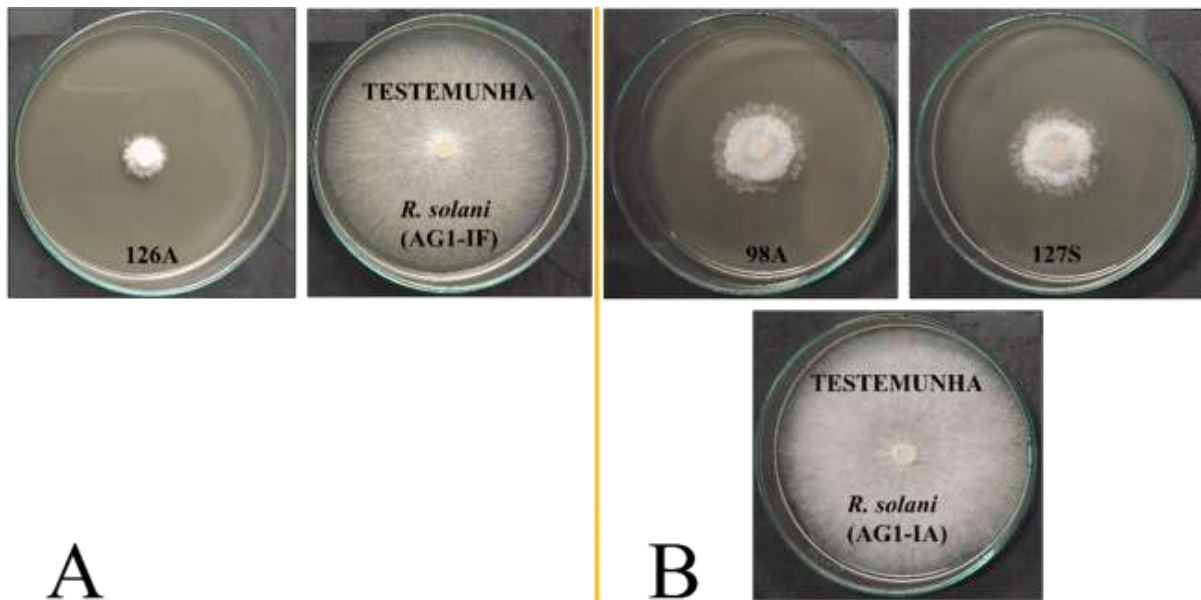
No estudo da inibição do crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* pelos antibióticos secretados em caldo agarizado por 10 isolados de *Bacillus* spp., identificaram que dois isolados apresentaram inibição do crescimento micelial entre 57,66 a 67,88% (LIMA *et al.*, 2014). Braga junior *et al.* (2017) verificando a inibição do crescimento micelial de *Fusarium subglutinans*, *Curvularia lunata* e *Bipolaris* spp., pelos MT secretados em caldo agarizado por sete isolados de *Bacillus subtilis*, constataram que o isolado UFTBs 06 proporcionou a maior inibição entre os patógenos em 53,4, 78,5 e 82,7%, respectivamente.

Conforme Amaro *et al.* (2018), é provável que a inibição do crescimento micelial seja decorrente da liberação de MT pelos isolados de *B. subtilis* que produzem uma grande variedade de metabólitos antifúngicos, entre os quais estão lipopeptídeos de famílias de surfactina, iturina e fengicina. Os autores ainda descrevem que apesar de estruturalmente semelhantes, as surfactinas, iturinas e fengicinas diferem em alguns aspectos biológicos em relação à sua

atividade, pois as iturinas e fengicinas exibem forte atividade antifúngica e são inibidoras do crescimento de uma ampla gama de patógenos.

De acordo com a Figura 21, observa-se a produção de MT *in vitro* pelos isolados 126A, 98A e 127S com a inibição do crescimento micelial de *R. solani* (AG1-IF) e (AG1-IA). A média do diâmetro da inibição do crescimento micelial foram de 4,10, 9,45 e 10,93 mm, respectivamente. Em seus estudos, Lima *et al.* (2014) observaram que isolados de *Bacillus* spp. apresentaram menores diâmetros da inibição do crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* de 28,90 e 38,10 mm.

Figura 21 - Produção de metabólitos termoestáveis *in vitro* por bactérias da soja (S) e arroz (A). **A** - Inibição do crescimento micelial de *R. solani* (AG1-IF) pelo isolado 126A. **B** - Inibição do crescimento micelial de *R. solani* (AG1-IA) pelos isolados 98A e 127S.



Fonte: SILVA, M. R. (2021).

Na figura, pode-se notar que a produção dos MT modificaram a estrutura do micélio de *R. solani* (AG1-IF) e (AG1-IA) em comparação a testemunha. De modo geral, a maioria dos isolados bacterianos envolvidos no biocontrole atua por antibiose, podendo ter contato físico ou não entre esses microrganismos, em relação a produção desses MT pode resultar na lise e dissolução da estrutura celular (BRAGA JUNIOR *et al.*, 2017). Provavelmente, as alterações celulares estão relacionadas ao mecanismo de defesa do patógeno (FUGA *et al.*, 2016).

15.8 Microbiolização das Sementes de Soja em Caixa Gerbox

Na Tabela 11, verifica-se a microbiolização das sementes de soja pelos melhores isolados bacterianos da soja e arroz selecionados nos testes *in vitro*. Observa-se os dados percentuais da germinação completa (GER), o desenvolvimento da radícula (RAD) e a massa fresca das sementes (MFS).

Tabela 11 - Microbiolização das sementes de soja por isolados bacterianos da soja e arroz em caixa gerbox.

TRATAMENTOS	GER	RAD	MFS
	(%)		(g)
<i>Pseudomonas tohonis</i> 95S	100	100	0,415 a
326A	100	100	0,383 a
MASTERMINS®	100	100	0,430 a
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 76A	100	90	0,330 b
84A	100	90	0,385 a
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 98A	100	90	0,393 a
148A	100	90	0,360 b
<i>Bacillus subtilis</i> 53S	100	80	0,380 a
<i>Enterobacter chengduensis</i> 52S	100	70	0,403 a
36S	90	90	0,430 a
TESTEMUNHA	90	90	0,280 b
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 127S	90	80	0,393 a
128A	90	80	0,440 a
<i>Bacillus stercoris</i> 134A	90	80	0,350 b
144A	90	80	0,360 b
182A	90	80	0,345 b
<i>Bacillus stercoris</i> 193A	90	70	0,290 b
124A	90	30	0,318 b
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 126A	80	80	0,358 b
<i>Bacillus stercoris</i> 147A	80	80	0,318 b
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 78S	80	70	0,323 b
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 132A	80	60	0,390 a
<i>Bacillus paralicheniformis</i> 35S	70	70	0,333 b
<i>Bacillus stercoris</i> 123A	70	30	0,330 b
175A	60	60	0,350 b
CV (%)	-	-	18,3

Médias da microbiolização das sementes de soja seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. GER - Germinação Completa; RAD - Desenvolvimento da Radícula; MFS - Massa Fresca da Semente; N°+S - Bactérias da Soja; N°+A - Bactérias do Arroz; CV - Coeficiente de variação.

Por meio dos dados da GER, constata-se que oito isolados (52S, 53S, 76A, 84A, 95S, 98A, 148A, 326A) apresentaram 100% de GER, incluindo o fertilizante líquido (MASTERMINS[®]). A testemunha apresentou 90% de GER incluindo sete isolados (124A, 127S, 128A, 134A, 144A, 182A, 193A). O restante dos isolados apresentaram entre 60 a 80% da GER.

Sobre os dados do RAD, nota-se que dois isolados (95S, 326A) e o MASTERMINS[®] obtiveram 100% do RAD. A testemunha mostrou 90% do RAD e também o isolado 36S. Os demais isolados exibiram entre 30 a 80% do RAD.

Ao analisar em conjunto os dados da GER e do RAD, identifica-se que dois isolados (95S, 326A) e o MASTERMINS[®] alcançaram 100% de eficiência. Além disso, observa-se que cinco isolados (35S, 36S, 126A, 147A, 175A) e a testemunha foram proporcionais aos resultados da GER e do RAD. Os outros isolados não apresentaram proporcionalidade, especialmente a respeito do RAD.

Em relação a MFS, identifica-se 10 isolados (c) e o MASTERMINS[®] foram mais significativos ($p < 0,05$) com incrementos percentuais de 153,6; 143,9; 135,7; 137,5; 148,2; 140,4; 140,4; 157,1; 139,3; 136,8 e 153,6%, respectivamente em comparação a testemunha e os demais tratamentos. Os isolados 95S e 326A incluindo o MASTERMINS[®] apresentaram resultados satisfatórios desde a GER, o RAD e a MFS. Apesar da testemunha ter obtido 90% da GER e do RAD, verifica-se que não foi eficiente estatisticamente acerca da MFS.

A microbiolização de sementes tem apresentado resultados satisfatórios e uma estratégia viável para a diminuição do uso de produtos sintéticos, possibilitando benefícios econômicos e ambientais (JUNGES *et al.*, 2014). Além disso, existe o biocontrole por meio da microbiolização de sementes, método de fácil aplicação, baixo custo e sem resíduos ao ambiente (MOURA *et al.*, 2018).

Nessa perspectiva, segundo Junges *et al.* (2017) entre os microrganismos que se destacam na microbiolização de sementes estão os fungos do gênero *Trichoderma* e as bactérias do gênero *Bacillus*. Com relação aos efeitos do gênero *Bacillus* spp., Cerqueira *et al.* (2015) relatam sobre o potencial na germinação e na emergência de plântulas, auxiliam na fixação de nitrogênio e a produção de hormônios importantes para o crescimento vegetal.

Em estudos desenvolvidos por Sá *et al.* (2019), avaliando os isolados bacterianos de *Bacillus* sp. (BMH), *B. subtilis* (LCB 30), *B. subtilis* (LCB 45) e *Trichoderma* sp., observaram um aumento na germinação das sementes de feijão-caupi (98, 100, 99,5 e 99%), respectivamente em relação a testemunha (93%). Resultados semelhantes foram encontrados por Rocha *et al.* (2017), onde verificaram que os isolados de *T. asperellum* e *B. subtilis*

aumentaram o potencial da germinação e a velocidade de emergência de sementes de feijão-caupi. Já Junges *et al.* (2017) analisaram a germinação de nabo forrageiro e constataram que a microbiolização com *B. subtilis* teve melhores resultados do que com *Trichoderma* spp.

Em seus relatos, Soares *et al.* (2012) observaram que a microbiolização de sementes de arroz com rizobactérias aumentaram o potencial fisiológico e o tratamento DFs185 foi promissor no estímulo da germinação e na emergência de mudas.

A promoção da germinação de sementes de soja proporcionada por isolados bacterianos pode estar relacionada à produção de hormônios, maior eficiência no uso de nutrientes e aumento da disponibilidade e absorção de nutrientes pela planta. Conforme Santos *et al.* (2012), a variável MFS apresenta-se como um indicativo da qualidade fisiológica, pois sementes de maior massa geralmente demonstram maior desempenho em relação as mais leves, seja na germinação ou no crescimento inicial das plantas. Ainda de acordo com os autores, as sementes caracterizadas com maior massa fresca são as que foram mais bem nutridas durante seu desenvolvimento, além da maior qualidade e reservas, embriões bem formados e melhor estabelecimento da plântula no campo.

15.9 Capacidade de Promoção de Crescimento de Plantas em Condições de Casa de Vegetação

Conforme a Tabela 12, observa-se a capacidade de promoção de crescimento das plantas de soja aos 10, 20 e 30 dias por 14 isolados bacterianos da soja e arroz em condições de casa de vegetação. Verificou-se que houve efeito significativo ($p < 0,05$) dos tratamentos para as variáveis diâmetro do caule (DIA) e altura da parte aérea (ALT) aos 30 dias. As variáveis número de folhas (NF), ALT aos 10 e 20 dias não houve efeito significativo ($p > 0,05$), as quais apresentaram médias de 5,458; 12,406 e 30,117 cm, respectivamente.

Tabela 12 - Promoção de crescimento de plantas de soja aos 10, 20 e 30 dias por intermédio de isolados bacterianos da soja e arroz em condições de casa de vegetação em Boa Vista - Roraima.

TRAT	Diâmetro (mm)			Altura da Parte Aérea (cm)		
	10 DIAS	20 DIAS	30 DIAS	10 DIAS	20 DIAS	30 DIAS
76A	1,570±0,03 aC	1,773±0,12 abcB	2,178±0,08 abcA	12,750±1,71 C	30,125±7,89 B	81,500±10,75 abcA
MAST®	1,528±0,23 aC	1,728±0,20 bcdB	2,148±0,20 abcA	14,375±0,95 C	37,125±9,02 B	94,750±9,22 aA
35S	1,523±0,07 aC	2,065±0,09 aB	2,405±0,10 aA	13,125±0,63 C	32,250±3,71 B	81,500±9,68 abcA
95A	1,480±0,07 abB	1,613±0,12 bcdeB	1,790±0,08 deA	13,500±1,00 C	38,125±5,07 B	88,250±9,11 abcA
127S	1,383±0,06 abcB	1,470±0,07 cdefB	2,015±0,17 bcdA	12,375±1,89 C	26,875±1,44 B	71,500±10,60 bcdA
126A	1,375±0,15 abcC	1,663±0,28 bcdB	2,068±0,16 bcdA	11,375±1,80 C	25,000±6,79 B	69,500±18,65 bcdA
53S	1,355±0,06 abcC	1,613±0,19 bcdeB	2,060±0,07 bcdA	13,750±0,65 C	29,250±3,52 B	82,750±11,30 abcA
98A	1,338±0,17 abcC	1,735±0,14 abcdB	2,080±0,14 abcdA	12,750±1,94 C	35,875±9,90 B	91,250±9,54 abA
52S	1,338±0,12 abcB	1,483±0,13 cdefB	1,895±0,12 cdeA	11,875±0,85 B	23,500±1,22 B	67,750±11,09 cdA
128A	1,328±0,06 abcC	1,815±0,14 abB	2,243±0,10 abA	10,625±4,39 C	33,125±4,99 B	85,250±13,72 abcA
326A	1,320±0,09 abcB	1,485±0,06 bcdefB	1,963±0,12 bcdA	14,250±1,19 C	33,000±7,05 B	85,750±17,17 abcA
144A	1,268±0,04 abcC	1,758±0,09 abcB	2,018±0,10 bcdA	11,000±2,35 C	27,875±2,93 B	87,250±10,01 abcA
TEST	1,255±0,16 abcB	1,405±0,08 defB	1,903±0,19 cdeA	11,625±1,65 C	27,250±4,41 B	80,000±4,24 abcA
36S	1,165±0,16 bcC	1,520±0,02 bcdefB	1,968±0,15 bcdA	13,500±0,41 C	31,750±7,58 B	78,500±10,25 abcA
132A	1,115±0,12 cB	1,255±0,15 fB	1,858±0,11 cdeA	11,250±1,71 C	31,000±8,57 B	85,750±12,55 abcA
84A	1,083±0,08 cC	1,310±0,11 efB	1,623±0,26 eA	10,375±4,89 B	19,750±9,74 B	54,500±9,68 dA
CV1 (%)	10,70			28,84		
CV2 (%)	6,36			16,99		

Médias seguidas da mesma letra minúscula, na coluna, e maiúscula, na linha, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. N°+S - Bactérias da Soja; N°+A - Bactérias do Arroz; 35S - *Bacillus paralicheniformis*; 52S - *Enterobacter chengduensis*; 53S - *Bacillus subtilis*; 76A - *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*; 78S - *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*; 95S - *Pseudomonas tohonis*; 98A - *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*; 123A - *Bacillus stercoris*; 126A - *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*; 127S - *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*; 132A - *Pseudomonas aeruginosa*; 134A - *Bacillus stercoris*; 147A - *Bacillus stercoris*; 193A - *Bacillus stercoris*; CV - Coeficiente de variação.

Em relação ao DIA, nota-se aos 10 dias que 11 bactérias (35S, 52S, 53S, 76A, 95A, 98A, 126A, 127S, 128A, 144A, 326A), a testemunha e o fertilizante líquido (MASTERMINS®)

apresentaram efeito significativo ($p < 0,05$) em comparação aos demais tratamentos. Aos 20 dias, cinco bactérias (35S, 76A, 98A, 128A, 144A) foram mais significativas ($p < 0,05$) em relação à testemunha, o MASTERMINS® e os outros tratamentos. Já aos 30 dias, quatro bactérias (35S, 76A, 98A, 128A) e o MASTERMINS® foram mais eficientes ($p < 0,05$) em relação à testemunha e o restante dos tratamentos.

A respeito da ALT, observa-se aos 10 e 20 dias que os tratamentos não foram significativos ($p > 0,05$), apenas ao longo do tempo ($p < 0,05$). Aos 30 dias, 10 bactérias (35S, 36S, 53S, 76A, 95A, 98A, 128A, 132A, 144A, 326A), a testemunha e o MASTERMINS® tiveram efeito significativo ($p < 0,05$) com relação aos demais tratamentos.

Constata-se aos 10, 20 e 30 dias que os tratamentos apresentaram uma evolução do DIA e ALT ao longo do tempo ($p < 0,05$).

A partir da microbiolização das sementes de soja, segundo Galdiano Junior (2011) as bactérias podem se localizar na superfície ou em associação com as raízes, e promoverem o crescimento direto da planta. Essa influência direta deve ser associada ao estímulo das bactérias benéficas na produção de fitohormônios como a auxina (SÁ *et al.*, 2019).

A produção de auxina pode desempenhar um papel fundamental na promoção do crescimento de plantas, particularmente nos estágios iniciais de desenvolvimento e no processo de enraizamento (INUI-KISHI *et al.*, 2012). O AIA é responsável por processos de divisão e expansão celular e pode expandir o diâmetro do caule e, como consequência, afetar a altura final das plantas de soja.

Em seus estudos, Dos Santos *et al.* (2014) observaram que a microbiolização de sementes de girassol com *Bacillus* sp. promoveu maior crescimento das plantas e uma maior expansão do diâmetro do caule. Resultados semelhantes foram relatados por Castillo *et al.* (2013), verificaram que a inoculação de *Bacillus* sp. no melão favoreceu o crescimento de várias partes da planta, tais como caule e área foliar.

Segundo Bulegon *et al.* (2016), o diâmetro do caule é uma variável importante, principalmente em relação ao tombamento das plantas, que pode acarretar em perdas de flores e, em decorrência, reduzir o enchimento de grãos, além da dificuldade durante a colheita mecanizada das plantas acamadas. Porto *et al.* (2020) analisando a eficiência da aplicação de microrganismos eficazes e de *Azospirillum brasilense* em sementes de milho, observaram que aos 60 dias após a semeadura ocorreu um aumento no diâmetro do caule de 2,32 e 2,46 mm, respectivamente em comparação à testemunha de 1,94 mm.

Para a variável ALT, Bulegon *et al.* (2016) ao avaliar a inoculação de bactérias diazotróficas em genótipos de soja em casa de vegetação, constataram que *Bradyrhizobium*

japonicum, *Azospirillum brasilense* e *B. japonicum* + *A. brasilense* não elevaram a altura de plantas da cultivar Coodetec 250, apresentando médias de 54,67, 55,13 e 60,50 cm, respectivamente e a testemunha 55,08 cm. Ratz *et al.* (2017) constataram que a inoculação de *B. subtilis* não promoveu um aumento significativo na altura em plantas de soja.

Lana *et al.* (2012) afirmam que apesar dos benefícios atribuídos ao uso do *A. brasilense* no crescimento de plantas de milho, o efeito positivo também depende das características genéticas. Nesse cenário, pode-se explicar o fato de que em alguns estudos as bactérias não tenham apresentado efeito favorável para algumas características como a ALT (PORTO *et al.*, 2020).

Em seus relatos, Junges *et al.* (2017) não observaram no nabo forrageiro efeito dos tratamentos (*B. subtilis* e *Trichoderma* spp.) sobre a ALT e do NF. Com base na análise da ALT e do NF, tais resultados ratificam aos encontrados no presente estudo quando se compara a testemunha. Em relação a variável NF, conforme Dartora *et al.* (2013) a ausência de diferença significativa entre os tratamentos pode ser devido ao NF ser mais influenciada em razão do genótipo da planta e, que pouco dependente dos fatores externos.

A respeito da redução dos tratamentos de 23 para 14 isolados bacterianos após a semeadura em casa de vegetação, o presente resultado indica que o mecanismo de promoção de germinação/emergência pelos isolados bacterianos pode ser específica (MACHADO *et al.*, 2015), e, ocasionalmente, podem afetar negativamente algum desses processos fisiológicos, utilizando a semente com substrato, colonizando-a e a inviabilizando (ETHUR *et al.*, 2012).

Observa-se na Tabela 13, a capacidade de promoção de crescimento das plantas de soja promovidas por 14 bactérias isoladas da soja e arroz nas condições de casa de vegetação. Dentre as informações coletadas das plantas, verifica-se a massa seca da parte aérea (MSPA), a massa seca do sistema radicular (MSSR) e a massa seca total (MST).

Tabela 13 - Capacidade de promoção de crescimento de plantas de soja por intermédio de isolados bacterianos da soja e arroz em condições de casa de vegetação em Boa Vista - Roraima.

TRATAMENTOS	MSPA	MSSR	MST
	(g)		
MASTERMINS®	1,128 a	0,240 a	1,368 a
128A	1,108 a	0,223 a	1,330 a
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 132A	1,095 a	0,255 a	1,350 a
<i>Pseudomonas tohonis</i> 95S	1,095 a	0,278 a	1,373 a
326A	1,028 a	0,225 a	1,253 a
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 98A	1,018 a	0,215 a	1,233 a
144A	1,010 a	0,200 b	1,210 a
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 76A	0,963 a	0,275 a	1,238 a
<i>Bacillus subtilis</i> 53S	0,890 b	0,228 a	1,118 b
<i>Bacillus paralicheniformis</i> 35S	0,858 b	0,233 a	1,090 b
84A	0,850 b	0,238 a	1,088 b
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 127S	0,833 b	0,173 b	1,005 b
TESTEMUNHA	0,780 b	0,128 b	0,908 b
36S	0,773 b	0,185 b	0,958 b
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 126A	0,715 b	0,198 b	0,913 b
<i>Enterobacter chengduensis</i> 52S	0,705 b	0,170 b	0,875 b
CV (%)	19,67	23,61	19,20

Médias da capacidade de promoção de crescimento de plantas seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. MSPA - Massa Seca da Parte Aérea; MSSR - Massa Seca do Sistema Radicular; MST - Massa Seca Total; N°+S - Bactérias da Soja; N°+A - Bactérias do Arroz; CV - Coeficiente de variação.

Com relação a MSPA, constata-se que sete isolados bacterianos (76A, 95S, 98A, 128A, 132A, 144A, 326A) e o fertilizante líquido (MASTERMINS®) apresentaram resultados significativos ($p < 0,05$) com incrementos percentuais de 123,5; 140,4; 130,5; 142,1; 140,1; 129,5; 131,8 e 144,6%, respectivamente em relação a testemunha e aos demais tratamentos. Dos quais, um isolado 95S foi proveniente do genótipo da soja e seis oriundos dos genótipos do arroz.

Conforme a MSSR, identifica-se que nove isolados bacterianos (35S, 53S, 76A, 84A, 95S, 98A, 128A, 132A, 326A) e o MASTERMINS® foram mais significativos ($p < 0,05$) com ganhos percentuais de 182,0; 178,1; 214,8; 185,9; 217,2; 168,0; 174,2; 199,2; 175,8 e 187,5%, respectivamente em comparação a testemunha e os outros tratamentos. Nota-se um aumento na quantidade dos isolados, sendo três isolados resultantes dos genótipos da soja e seis procedentes dos genótipos do arroz.

Na análise da MST, observa-se sete isolados bacterianos (76A, 95S, 98A, 128A, 132A, 144A, 326A) e o MASTERMINS® que foram mais eficientes ($p < 0,05$) com rendimentos percentuais de 136,3; 151,2; 135,8; 146,5; 148,7; 133,5; 138,0 e 150,7%, respectivamente em

relação a testemunha e aos demais tratamentos. Constata-se que os mesmos isolados bacterianos evidenciados na MSPA foram identificados na MST.

Segundo Nascente *et al.* (2017) a promoção de crescimento por bactérias melhoram as características fisiológicas das plantas, especialmente a taxa fotossintética. Canellas *et al.* (2015) descrevem que as bactérias têm a capacidade em produzir hormônios vegetais e aumentar a absorção vegetal de macronutrientes. Nesse sentido, o fitohormônio AIA estimula a formação da raiz lateral, o alongamento celular, na divisão e diferenciação celular em células vegetais (GOSWAMI *et al.*, 2016).

Em seus estudos, Saharan e Nehra (2011) observaram que espécies de *Bacillus* sp. contribuem para melhoria de diferentes parâmetros do sistema radicular (enraizamento, comprimento de raízes e teor de matéria seca), onde a inoculação com isolados produtores de AIA, aumentou a absorção de N, P, K, Ca e Mg, promovendo o enraizamento de batata doce e a matéria seca de mudas de eucalipto.

Além disso, existem os biofertilizantes que contêm bactérias solubilizadoras de fosfato que são extremamente promissores para reduzir o uso de fertilizantes químicos, pois combinam as vantagens de reciclar resíduos orgânicos, introduzir microrganismos benéficos e fornecer matéria orgânica (QIU *et al.*, 2012; FU *et al.*, 2017). Os biofertilizantes são mais baratos e podem ser de particular interesse em solos deficientes em nutrientes (SHEN *et al.*, 2011). Contudo, é possível que a associação de bactérias solubilizadoras de fosfato e a raiz da planta seja limitada em solos com altos níveis de fosfato disponível (IBARRA-GALEANA *et al.*, 2017).

Diante do exposto, Chagas Junior *et al.* (2021) avaliando diferentes doses do inoculante à base de *Bacillus* sp., verificaram aos 30 dias após a semeadura na dose 300 mL um incremento percentual de 131,8% para MSPA, 115,8% para MSSR e 124,8% para MST, comprovam com o presente estudo. Resultados semelhantes foram encontrados por Braga Junior *et al.* (2018), analisando a eficiência da inoculação de *Bacillus subtilis* na cultura da soja cultivar M 9144 RR em duas regiões, constataram na primeira região aos 56 dias após a semeadura ganhos percentuais de 174,1% MSPA, 146,8% MSSR e 170,1% MST, observaram na segunda região aos 60 dias após a semeadura incrementos percentuais de 123,2% MSPA, 110,4% MSSR e 121,0% MST.

Resultados similares foram identificados por Porto *et al.* (2020), analisando a eficiência da aplicação de *Azospirillum brasilense* e de microrganismos eficazes em sementes milho, observaram que aos 125 dias após a semeadura foi observado um incremento percentual após a aplicação de 178% e 18% para MSPA, respectivamente. Já a MSSR do milho inoculado com

A. brasillense apresentou a média de 76% e de microrganismos eficazes 51% em relação a testemunha. Costa *et al.* (2015) verificaram que a aplicação de *A. brasilense* na semente e pulverizado via foliar no estágio V4, proporcionaram ganhos percentuais na biomassa seca da raiz 123 e 97 %, respectivamente.

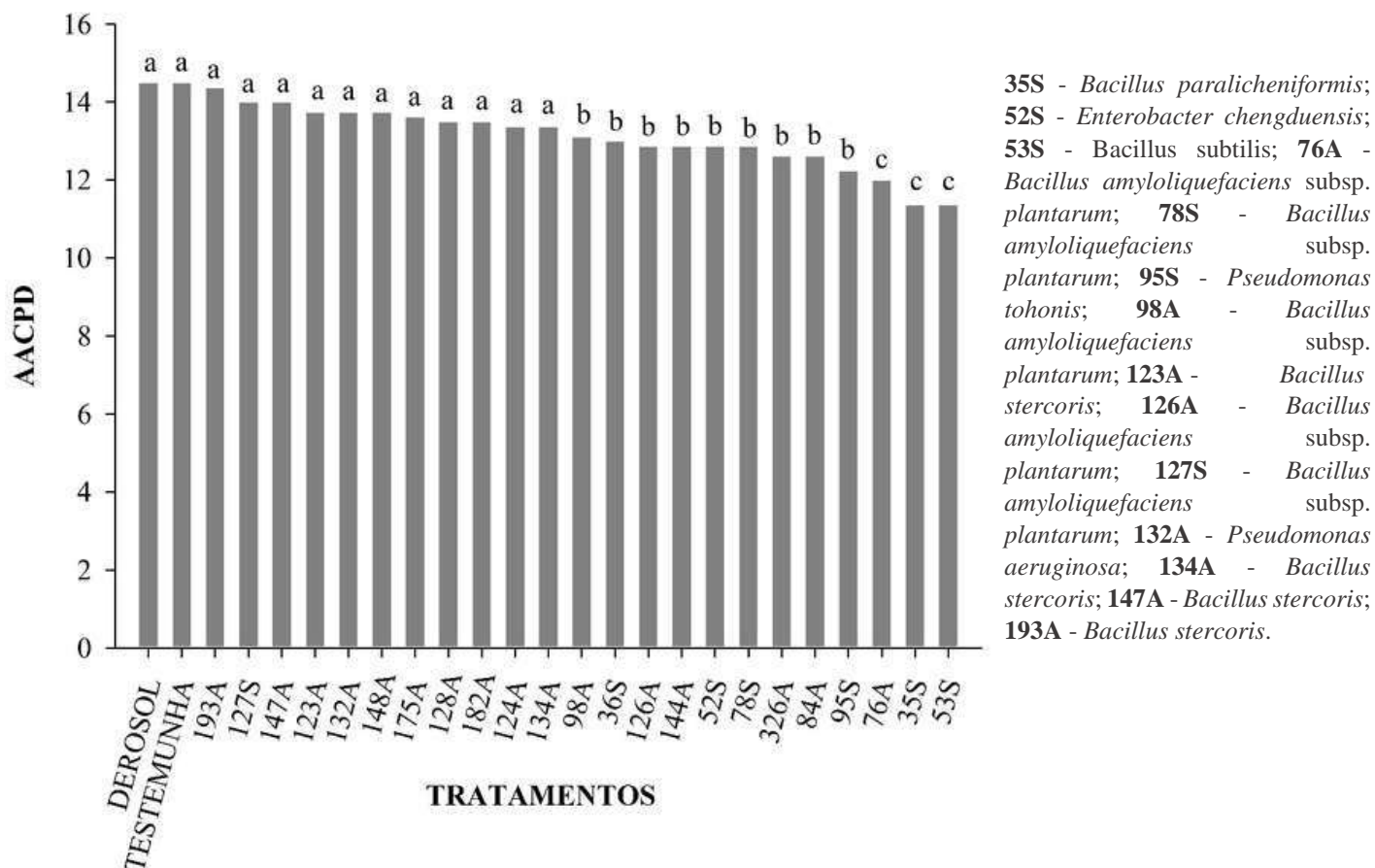
Em seus relatos, Bulegon *et al.* (2016) analisando a inoculação de *Azospirillum brasilense* e *Bradyrhizobium japonicum* + *A. brasilense*, constataram na soja um aumento da MSPA da cultivar Turbo, apresentando ganhos percentuais de 118,3 e 151,8%, respectivamente em relação a testemunha. Lana *et al.* (2012) também verificaram ganhos percentuais de 7,2% na MSPA quando o milho foi inoculado com *Azospirillum*. Ganhos percentuais também foram obtidos em plantas de girassóis inoculadas com as bactérias *Bacillus* sp. e *Enterobacter cloacae* que apresentaram um aumento de 33% na MSPA e de 450% na MSSR, em relação as plantas não inoculadas (DOS SANTOS *et al.*, 2014).

15.10 Avaliação da Incubação, da Incidência, da Severidade da Mela *R. solani* (AG1-IF e AG1-IA) e a Área Abaixo da Curva do Progresso da Doença

A respeito da avaliação do período de incubação da mela *R. solani* (AG1-IF) e (AG1-IA), foi verificado nas primeiras 48 horas após a pulverização do isolado sobre as folhas. A incidência foi constatada nos 25 tratamentos que apresentaram 100% da doença.

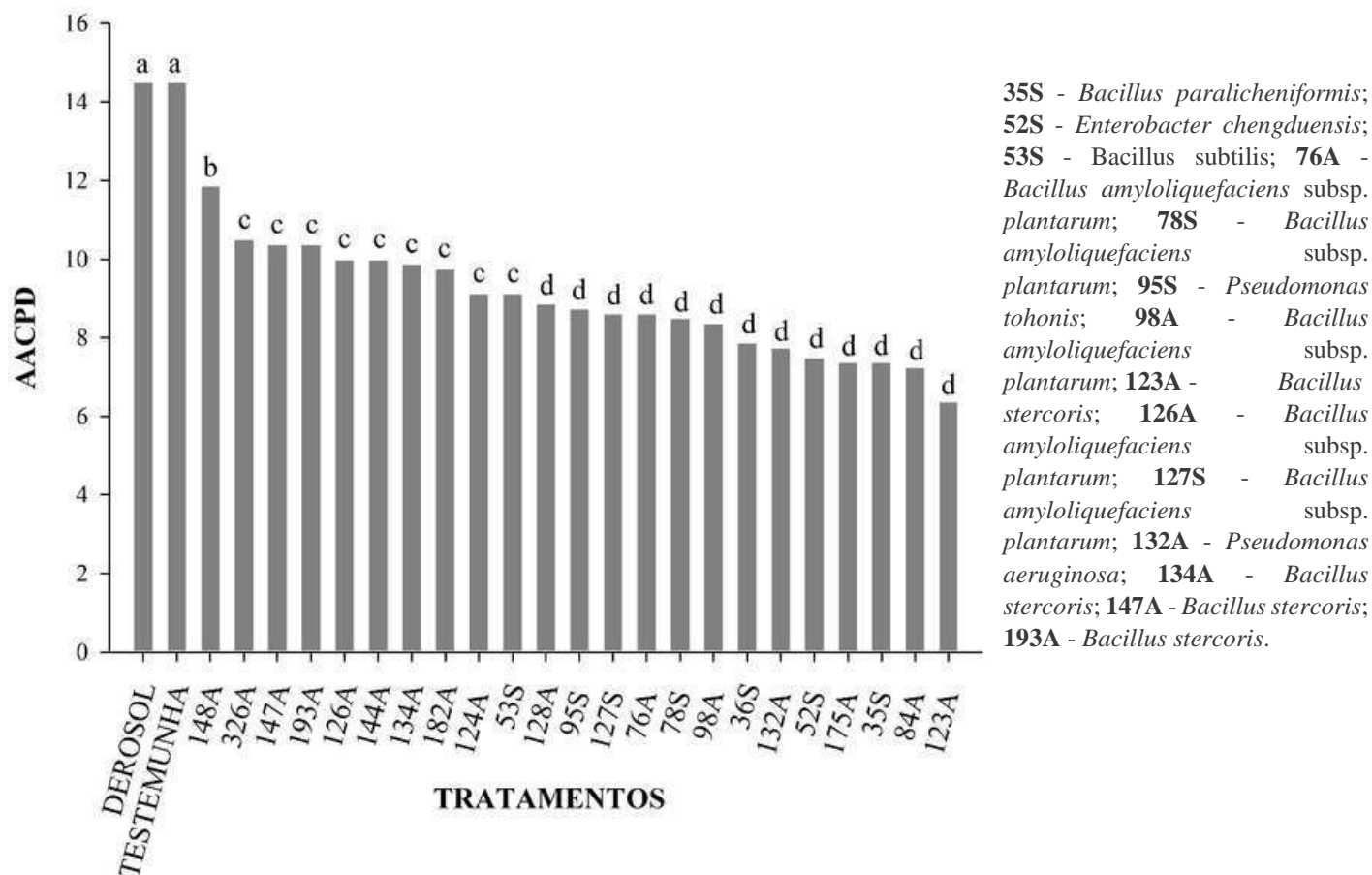
Na Figura 22, observa-se a área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD) e a severidade da mela (*R. solani* AG1-IF) em relação aos tratamentos. Identifica-se que três isolados bacterianos (76A, 35S, 53S) foram mais eficientes ($p < 0,05$) em relação a testemunha e o fungicida (DEROSAL), no qual apresentaram redução da severidade da mela entre 82,8; 78,5 e 78,5%, respectivamente.

Figura 22 - Área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD) após a inoculação com *R. solani* (AG1-IF) em plantas de soja pulverizadas com isolados bacterianos em casa de vegetação. Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.



Já na Figura 23, verifica-se que 13 isolados bacterianos (128A, 95S, 127S, 76A, 78S, 98A, 36S, 132A, 52A, 175A, 35S, 84A, 123A) foram mais significativos ($p < 0,05$) em comparação a testemunha e o DEROSAL, no qual mostraram redução da severidade da mela (*R. solani* AG1-IA) de 61,2; 60,3; 59,5; 59,5; 58,6; 57,8; 54,3; 53,5; 51,7; 50,9; 50,9; 50,0 e 44,0%, respectivamente.

Figura 23 - Área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD) após a inoculação com *R. solani* (AG1-IA) em plantas de soja pulverizadas com isolados bacterianos em casa de vegetação. Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.



Com base nos resultados encontrados, observa-se que os isolados bacterianos responsáveis pela capacidade de promoção de crescimento das plantas de soja, dos quais alguns desses isolados também foram eficientes no biocontrole de *R. solani* (AG1-IF) e (AG1-IA). De acordo com Lopes *et al.* (2018), descrevem que as plantas interagem com os microrganismos endofíticos, simbióticos e exógenos que influencia as plantas devido a associação nas raízes, caules e folhas da soja, além da produção e liberação de reguladores de crescimento de plantas, possibilitando vantagens à planta hospedeira, cuja resistência a doenças é minimizada. Assim, os microrganismos podem atuar por meio de mecanismos de biocontrole, como induzindo a resistência sistêmica em plantas, por competição, produzindo sideróforos, por meio da produção de antibióticos e enzimas associadas ao parasitismo de fitopatógenos (AHEMAD; KIBRET, 2014).

Em relação ao biocontrole, resultados similares com o presente estudo foram encontrados por Abdeljalil *et al.* (2016), ao analisar 25 isolados bacterianos no biocontrole da podridão radicular do tomate (*R. solani*) em casa de vegetação, verificaram que a incidência da doença variou de 0 a 100% e que 21 dos 25 isolados testados ocorreu uma redução de mais de 70% na severidade da doença, para os quatro isolados restantes a severidade variou entre 47 e 53%. Resultados inferiores foram relatados por Matloob e Juber (2013), ao avaliar a atividade de *Azotobacter chroococcum* no biocontrole de *R. solani* (AG-4) em casa de vegetação, observaram uma redução na incidência (37,5%) e na severidade (20,0%) da podridão radicular do feijão. Já Hussein *et al.* (2018), verificaram a capacidade do *Bacillus pumilus* no biocontrole da podridão caulinar e radicular do feijão (*R. solani* AG2-2) em casa de vegetação, onde notaram uma redução da severidade em 41%.

Em seus estudos, Raj *et al.* (2019) constataram o potencial do *Bacillus subtilis* no biocontrole da queima da bainha do arroz (*R. solani*) em condições de campo, verificaram que o tratamento de sementes com *B. subtilis* e, posterior aplicação profilática do mesmo aos 20, 40 e 60 dias após a semeadura foi responsável por reduzir a incidência da doença em 88% aos 70 dias após a semeadura. De acordo com Lopes *et al.* (2018), as bactérias secretam muitas proteínas, lipopeptídeos ou outras moléculas que são sintetizadas por diferentes vias metabólicas, que podem ser fundamentais no biocontrole de doenças de plantas. O *B. subtilis* é responsável por produzir a iturina e fengicina da família dos lipopeptídeos (ZHAO *et al.*, 2017).

Em seus relatos, Yu *et al.* (2017) observaram em casa de vegetação o biocontrole da queima da bainha do arroz (*R. solani*) de uma única bactéria (*Pseudomonas fluorescens*) contra vários isolados de *Rhizoctonia*, alcançando uma eficácia no controle de 32,3 a 78,8%. Nabrdalik *et al.* (2018) ao avaliar as propriedades antagônicas de cepas endofíticas de *Pantoea agglomerans* (BC17 e BC45) no biocontrole de *R. solani* (AG2-2 IIIB) no cultivo da beterraba em vasos, identificaram que a cepa BC17 diminuiu o número de plantas doentes em mais de 23%, enquanto a cepa BC45 foi de apenas 7,5%.

Conforme Matsumura *et al.* (2015), diferentes respostas à inoculação de microrganismos podem ser obtidas de acordo com o genótipo da planta, o isolado bacteriano e a metodologia aplicada, bem como a quantidade e qualidade das células inoculadas. Moura *et al.* (2018) explica que a interação do biocontrole e patógeno varia de acordo com seus isolados e, a resposta encontrada é dose dependente em relação ao patógeno e a população do biocontrole, assim como seus mecanismos de ação. Desse modo, isso justifica os diferentes resultados descritos nos estudos desenvolvidos anteriormente.

Além disso, existem a possibilidade do uso de combinações de biocontrole que podem intensificar o efeito e ampliar o espectro de fitopatógenos biocontrolados, ainda oferecer estabilidade sob diferentes condições edafoclimáticas (LIU *et al.*, 2018). No processo de desenvolvimento de novas preparações biológicas, são adotadas interações antagônicas entre diferentes microrganismos, além das reações antagônicas entre os metabólitos produzidos e os fitopatógenos (NABRDALIK *et al.*, 2018). Experimentos adicionais do uso de combinações para o biocontrole da *R. solani* (AG1-IF) e (AG1-IA) precisam ser realizados para avaliar essa possibilidade.

Nessa perspectiva, Omara *et al.* (2017) ao analisar a eficiência da inoculação combinada com cepas de *Methylobacterium* (*M. aminovorans* e *M. rhodinum*); *Bradyrhizobium japonicum*; *Bacillus megaterium* e *Trichoderma viride* no biocontrole de *R. solani* em mudas de soja no campo, descobriram que todos os tratamentos reduziram a porcentagem de tombamento e aumentaram o número de plantas saudáveis em relação a testemunha. Já Rajendraprasad *et al.* (2017), ao testar alguns agentes fúngicos e bacterianos no biocontrole de *R. solani* em casa de vegetação, observaram entre os tratamentos com menor incidência (43,75 e 48,33%) no tombamento pós-emergência, foi registrada no tratamento de sementes com *Pseudomonas fluorescência* mais aplicação no solo com *Trichoderma harzianum* aos 30 e 50 dias após a semeadura.

Por outro lado, outra alternativa no biocontrole de *R. solani* identificada na literatura é a combinação entre isolados bacterianos e fungicidas. Nessa circunstância, Martins *et al.* (2018) verificaram o tratamento de sementes de feijoeiro (cultivar Perola e BRS Agreste) com os isolados de *Bacillus amyloliquefaciens* (ALB629 e UFLA285), combinados ou não com metalaxil + fludioxonil para o controle de *R. solani* (AG4-141), observaram tanto o ALB629 quanto o UFLA285 sozinhos ou combinados com fungicida aumentaram o período de incubação da doença, a incidência na cultivar Pérola foi menor com os isolados bacterianos combinado com fungicida ou UFLA285 sozinho e a severidade da doença diminuiu em até 60% usando apenas *B. amyloliquefaciens* (ALB629), ou até 89% usando a combinação de ALB629 com fungicida. De fato, essa combinação é uma possibilidade interessante no biocontrole da *R. solani* (AG1-IF) e (AG1-IA) que precisa ser investigada em experimentos futuros.

15.11 Identificação Molecular dos Melhores Isolados Bacterianos

Na Tabela 14, observa-se as 14 bactérias que tiveram os seus genomas sequenciados e identificados geneticamente. Verifica-se que foram encontrados três gêneros de bactérias,

como: *Bacillus*, *Enterobacter* e *Pseudomas*, dos quais encontrou-se sete espécies de bactérias, como: *Bacillus paralicheniformis*, *Enterobacter chengduensis* WCHECI-C4, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42, *Pseudomonas tohonis* TUM18999, *Bacillus stercoris* D7XPN1 e *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071.

Tabela 14 - Identificação Genética das melhores bactérias isoladas da soja e do arroz.

GENOMAS SEQUENCIADOS	ISOLADOS BACTERIANOS	SIMILARIDADE (%)	NÚMERO DE ACESSO
35S	<i>Bacillus paralicheniformis</i>	90.4	-
52S	<i>Enterobacter chengduensis</i>	62.8	WCHECI-C4
53S	<i>Bacillus subtilis</i>	86.3	-
76A	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i>	80.1	FZB42
78S	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i>	80.1	FZB42
95S	<i>Pseudomonas tohonis</i>	81.9	TUM18999
98A	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i>	80.0	FZB42
123A	<i>Bacillus stercoris</i>	88.7	D7XPN1
126A	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i>	80.0	FZB42
127S	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i>	91.4	FZB42
132A	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	94.8	DSM 50071
134A	<i>Bacillus stercoris</i>	88.7	D7XPN1
147A	<i>Bacillus stercoris</i>	88.7	D7XPN1
193A	<i>Bacillus stercoris</i>	88.7	D7XPN1

N°+S - Bactérias da Soja; N°+A - Bactérias do Arroz.

16. CONCLUSÃO

Foi possível selecionar isolados bacterianos de plantas de soja com potencial para o biocontrole da *R. solani* (AG1-IF) e (AG1-IA).

No teste de antibiose *in vitro*, 13 isolados bacterianos (36S, 148A, 76A, 193A, 124A, 126A, 132A, 147A, 35S, 128A, 134A, 175A e 123A) inibiram o crescimento micelial de *R. solani* (AG1-IF) entre 56,0 a 60,6% e 20 isolados (148A, 98A, 175A, 78S, 126A, 147A, 182A, 53S, 124A, 128A, 123A, 76A, 134A, 52S, 144A, 127S, 95S, 326A, 132A e 84A) inibiram o crescimento micelial de *R. solani* (AG1-IA) entre 51,2 a 61,9%.

Na produção de compostos voláteis *in vitro*, os isolados 147A e 193A inibiram o crescimento micelial de *R. solani* (AG1-IF) entre 57,5 a 56,3%, respectivamente; e quatro isolados (147A, 148A, 134A, 175A) inibiram o crescimento micelial de *R. solani* (AG1-IA) entre 57,7 a 61,7%.

Para capacidade de solubilização de fosfato, três isolados (52S, 123A e 132A) testaram positivos e 16 isolados (35S, 36S, 52S, 53S, 76A, 78S, 95S, 124A, 126A, 127S, 147A, 148A, 175A, 182A, 193A, 326A) para produção de ácido indol acético. Nenhum isolado bacteriano foi responsável pela produção de quitinase.

Na produção de metabólicos termoestáveis *in vitro*, o isolado bacteriano 126A inibiu o crescimento micelial de *R. solani* (AG1-IF) em 89,4% e os isolados 98A e 127S inibiram o crescimento micelial de *R. solani* (AG1-IA) em 77,1 e 73,5%, respectivamente.

Na microbiolização das sementes de soja, oito isolados (52S, 53S, 76A, 84A, 95S, 98A, 148A, 326A) apresentaram 100% da germinação completa, dois isolados (95S, 326A) obtiveram 100% do desenvolvimento da radícula e 10 isolados (36S, 52S, 53S, 84A, 95S, 98A, 127S, 128A, 132A, 326A) foram responsáveis pelos maiores incrementos percentuais da massa fresca das sementes variando de 135,7 a 153,6%.

Na capacidade de promoção de crescimento da soja, foi influenciada positivamente para a variável do diâmetro do caule com resposta positiva aos 10, 20 e 30 dias após o plantio, com exceção das variáveis de altura da parte da aérea e número de folhas.

Para os componentes da massa seca das plantas de soja, sete isolados (76A, 95S, 98A, 128A, 132A, 144A, 326A) apresentaram incrementos na massa seca da parte aérea entre 123,5 a 142,1%, nove isolados (35S, 53S, 76A, 84A, 95S, 98A, 128A, 132A, 326A) foram responsáveis pelos ganhos na massa seca do sistema radicular entre 168,0 a 217,2% e sete isolados (76A, 95S, 98A, 128A, 132A, 144A, 326A) com rendimentos na massa seca total entre 133,5 a 151,2%.

Na capacidade de biocontrole *in vivo* da mela da soja, o período de incubação de *R. solani* (AG1-IF) e (AG1-IA) foi nas primeiras 48 h, no qual todas as plantas de soja apresentaram incidência de 100% dos sintomas da mela. A área abaixo da curva do progresso da doença apresentou uma redução na severidade da mela (*R. solani* AG1-IF) por três isolados (76A, 35S, 53S) com resultados entre 78,5 a 82,8%. Na severidade da mela (*R. solani* AG1-IA) foram 13 isolados (128A, 95S, 127S, 76A, 78S, 98A, 36S, 132A, 52A, 175A, 35S, 84A, 123A) responsáveis pela redução entre 44,0 a 61,2%.

17. REFERÊNCIAS

ABDELJALIL, N. O-B. *et al.* Biocontrol of rhizoctonia root rot in tomato and enhancement of plant growth using *Rhizobacteria* naturally associated to tomato. **Journal of Plant Pathol Microbiol**, v. 7, n. 6, p. 1-8, 2016.

ADESINA, M. F. *et al.* In vitro antagonists of *Rhizoctonia solani* tested on lettuce: rhizosphere competence, biocontrol efficiency and rhizosphere microbial community response. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 69, p. 62-74, 2009.

AHEMAD, M., KIBRET, M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. **Journal of King Saud University - Science**, v. 26, p. 1-20, 2014.

AJAYI-OYETUNDEA, O. O.; BRADLEY, C. A. *Rhizoctonia solani*: taxonomy, population biology and management of rhizoctonia seedling disease of soybean. **Plant Pathology**, v. 67, p. 3-17, 2018.

BABU, A. G. *et al.* Enhancement of heavy metal phytoremediation by *Alnus firma* with endophytic *Bacillus thuringiensis* GDB-1. **Journal of Hazardous Materials**, v. 250, p. 477-483, 2013.

BABU, S. V. *et al.* Screening of maize rhizospheric phosphate solubilizing isolates for plant growth promoting characteristics. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 6, n.10, p. 2090-210, 2017.

BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. Doenças com período de incubação variável em função da fenologia do hospedeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, p. 561-565. 2002.

BERIC, T. *et al.* Novel antilisterial bacteriocin licheniocin 50.2 from *Bacillus licheniformis* VPS50.2 isolated from soil sample. **Journal of Applied Microbiology**, v. 116, p. 502-510, 2013.

BORAH, M., *et al.* Phosphate solubilization by endophytic bacteria isolated from *Oryza sativa*. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 6, p. 2713-2721, 2017.

BRAGA JUNIOR, G. M. *et al.* Controle biológico de fitopatógenos por *Bacillus subtilis* *in vitro*. **Biota Amazônia**, v. 7, n. 3, p. 45-51, 2017.

BRAGA JUNIOR, G. M. *et al.* Efficiency of inoculation by *Bacillus subtilis* on soybean biomass and productivity. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.13, n.4, p. 1-6, 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. 2009. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV. 398 p.

BULEGON, L. G. *et al.* Components of production and yield of soybean inoculated with *Bradyrhizobium* and *Azospirillum*. **Terra Latinoamericana**, v. 34, n. 2, p. 169-176, 2016.

CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L.V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: John Wiley & Sons, 1990. 532p.

CANELLAS, L. P. *et al.* Foliar application of plant growth-promoting bacteria and humic acid increase maize yields. **Journal of Food Agriculture Environment**, v. 13, p. 131-138, 2015.

CASTILLO, H. F. D. *et al.* **Biological Control of Root Pathogens by Plant-Growth Promoting *Bacillus* spp.** Weed and Pest Control - Conventional and New Challenges, 2013.

CERQUEIRA, W. F. *et al.* Influência de bactérias do gênero *Bacillus* sobre o crescimento de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.). **Enciclopédia Biosfera**, v. 11, n. 20, p. 1-12, 2015.

CHAGAS JUNIOR, A. F. *et al.* Efficiency of *Bacillus subtilis* Bs10 as a plant growth promoting inoculant in soybean crop under field conditions. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 14, p. 1-14, 2021.

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. 1-12, 2020.

CHEN, M. *et al.* Mechanochemical transformation of apatite to phosphoric slowrelease fertilizer and soluble phosphate. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 114, p. 91-96, 2017.

CHERIF-SILINI, H. *et al.* Phylogenetic and plant-growth-promoting characteristics of *Bacillus* isolated from the wheat rhizosphere. **Ann Microbiol**, v. 66, p. 1087-1097, 2016.

COSTA, R. R. G. F. *et al.* Efficiency of inoculant with *Azospirillum brasilense* on the growth and yield of second-harvest maize. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 45, p. 304-311, 2015.

DARTORA, J. *et al.* Adubação nitrogenada associada à inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* na cultura do milho. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 17, n. 10, p. 1023-1029, 2013.

DASTAGER, S. G. *et al.* Isolation and characterization of plant growth-promoting strain *Pantoea* NII-186. From Western Ghat Forest soil, India. **Letters in Applied Microbiology**, v. 49, p. 20-25, 2009.

DOS SANTOS, J. F. *et al.* Crescimento de girassol em função da inoculação de sementes com bactérias endofíticas. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 2, n. 1, p. 10-1590, 2014.

EDGINTON, L. V. *et al.* Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. **Phytopathology**, v. 62, n. 7, p. 42-44, 1971.

ELKAHOUI, S. *et al.* Antifungal activity of volatile compounds-producing *Pseudomonas* P2 strain against *Rhizoctonia solani*. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 31, p. 175-185, 2014.

ETHUR, L. Z. *et al.* *Trichoderma asperellum* na produção de mudas contra a fusariose do pepineiro. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 11, n. 4, p. 73-84, 2012.

FU, L. *et al.* Inducing the rhizosphere microbiome by biofertilizer application to suppress banana *Fusarium* wilt disease. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 104, p. 39-48, 2017.

FUGA, C. A. G. *et al.* Efficiency and compatibility of *Trichoderma* spp. and *Bacillus* spp. isolates on the inhibition of *Sclerotium cepivorum*. **Científica**, v. 44, n. 4, p. 526-531, 2016.

GALDIANO JÚNIOR, R. F. *et al.* Uxin-producing bacteria isolated from the roots of *Cattleya walkeriana*, an endangered brazilian orchid, and their role in acclimatization. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 35, p. 729-737, 2011.

GOSWAMI, D. *et al.* Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. **Cogent Food & Agriculture**, v. 19, n. 1, p. 1-19, 2016.

GUERRERO, Y. *et al.* Perspectivas del uso de bacterias rizosféricas en el control de *Pyricularia grisea* (Cooke Sacc.) em el cultivo de arroz (*Oryza sativa* L.). **Revista Colombiana de Biotecnología**, v. 13, n. 1, p. 16-22, 2011.

HARVILLE, B. G. *et al.* Rhizoctonia foliar blight and seed yields in soybeans. **Crop Science**, v. 36, p. 563-566, 1996.

HUSSAIN, A. S. K., SRINIVAS, P. Evaluation of plant growth promoting traits by *Pseudomonas* and *Azotobacter* isolated from rhizotic soils of two selected agroforestry tree species of Godavari Belt region, India. **Asian Journal of Experimental Biological Sciences**, v. 4, n. 3, p. 431-436, 2013.

IBARRA-GALEANA, J. A. *et al.* Characterization of phosphate-solubilizing bacteria exhibiting the potential for growth promotion and phosphorus nutrition improvement in maize (*Zea mays* L.) in calcareous soils of Sinaloa, Mexico. **Ann Microbiol**, v. 67, p. 801-811, 2017.

INUI-KISHI, R. N. *et al.* Phosphorus solubilizing and iaa production activities in plant growth promoting rhizobacteria from brazilian soils under sugarcane cultivation. **ARPN Journal of Engineering and Applied Sciences**, v. 7, n. 11, 2012.

JUNGES, E. *et al.* Restrição hídrica e peliculização na microbiolização de sementes de milho com *Trichoderma* spp. **Comunicata Scientiae**, v. 5, n. 1, p. 18-25, 2014.

JUNGES, E. *et al.* Techniques microbiolization seed forage radish with *Trichoderma* spp. and *Bacillus subtilis*. **Agrária**, v. 12, n. 2, p. 135-141, 2017.

KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v. 60, p. 969-979, 1970.

KIM, S. Y. *et al.* The complete genome sequence of *Bacillus velezensis* strain GH1-13 reveals agriculturally beneficial properties and a unique plasmid. **Journal of Biotechnology**, v. 259, p. 221-227, 2017.

LANA, M. C. *et al.* Inoculation with *Azospirillum*, associated with nitrogen fertilization in maize. **Revista Ceres**, v. 59, p. 399-405, 2012.

LANNA FILHO, R. *et al.* Bacterial spot and early blight biocontrol by epiphytic bacteria in tomato plants. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n. 12, p. 1381-1387, 2010.

LI, B. *et al.* Phenotypic and molecular characterization of *rhizobacterium Burkholderia* sp. strain R456 antagonistic to *Rhizoctonia solani*, sheath blight of rice. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 27, p. 2305-2313, 2011a.

LI, Q. *et al.* Fumigant activity of volatiles of *Streptomyces globisporus* JK-1 against *Penicillium italicum* on *Citrus microcarpa*. **Postharvest Biol Technol**, v. 58, p. 157-165, 2010.

LIMA, O. D. R. *et al.* Ação antifúngica *in vitro* de isolados de *Bacillus* ssp. sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Revista Caatinga**, v. 27, n. 4, p. 57-64, 2014.

LOPES, K. B. A. *et al.* Screening of bacterial endophytes as potential biocontrol agents against soybean diseases. **Journal of Applied Microbiology**, v. 125, p. 1466-1481, 2018.

MACHADO, D. F. M. *et al.* *Trichoderma* spp. in emergence and growth of cambará seedlings (*Gochnatia polymorpha* (Less.) Cabrera). **Revista Árvore**, v. 39, n. 1, p. 167-176, 2015.

MARTINS, S. A. *et al.* Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) growth promotion and biocontrol by rhizobacteria under *Rhizoctonia solani* suppressive and conducive soils. **Applied Soil Ecology**, v. 127, p. 129-135, 2018.

MATLOOB, A. H., JUBER, K. S. Biological control of bean root rot disease caused by *Rhizoctonia solani* under green house and field conditions. **Agriculture and Biology Journal of North America**, v. 4, n. 5, p. 512-519, 2013.

MATSUMURA, E. E. *et al.* Composition and activity of endophytic bacterial communities in field-grown maize plants inoculated with *Azospirillum brasilense*. **Ann Microbiol**, v. 65, p. 2187-2200, 2015.

MONTERO-TAVERA, V. *et al.* Genetic diversity of *Rhizoctonia solani* isolates (Kuhn) from pepper in Mexico. **Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas**, v. 4, n. 7, p. 1043-1054, 2013.

MOURA, A. B. *et al.* Combination of biocontrol bacteria for rice seeds microbiolization: incidence and transmission of *Bipolaris oryzae*, and plant growth. **Journal of Seed Science**, v. 40, n. 4, p. 378-387, 2018.

MUKHTAR, S. *et al.* Assessment of two carrier materials for phosphate solubilizing biofertilizers and their effect on growth of wheat (*Triticum aestivum* L.). **Microbiological Research**, v. 205, p. 107-117, 2017.

LIU, K. *et al.* Mixtures of plant-growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple plant diseases and plant-growth promotion in the presence of pathogens. **Plant Disease**, v. 102, n. 1, p. 67-72, 2018.

NABRDALIK, M. *et al.* Importance of endophytic strains *Pantoea agglomerans* in the biological control of *Rhizoctonia solani*. **Ecological Chemistry and Engineering**, v. 25, n. 2, p. 331-342, 2018.

NASCENTE, A. S. *et al.* Biomass, gas exchange, and nutrient contents in upland rice plants affected by application forms of microorganism growth promoters. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, p. 2956-2965, 2017.

NAUTIYAL, C. S. Na efficient microbiological growth médium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, v. 170, n. 1, p. 265-270, 1999.

NECHET, K. L.; HALFELD-VIEIRA, B. A. Efeito do inóculo, período de molhamento foliar e do estágio fenológico do feijão-caupi no desenvolvimento da mela. **Tropical Plant Pathology**, v. 36, n. 2, p. 104-109, 2011.

NOVAIS, R. F.; NEVES, J. C. L.; BARROS, N. F. **Ensaio em ambiente controlado**. In: OLIVEIRA, A. J.; GARRIDO, W. E.; ARAÚJO, J. D.; LOURENÇO, S., eds. Métodos de pesquisa em fertilidade do solo. Brasília, Embrapa-SEA, 1991. p.189-254.

OMARA, A. *et al.* The role of some PGPR strains to biocontrol *Rhizoctonia Solani* in soybean and enhancement the growth dynamics and seed yield. **The Environment, Biodiversity & Soil Security**, v. 1, p. 47-59, 2017.

PII, YOURY. *et al.* Microbial interactions in the rhizosphere: beneficial influences of plant growth-promoting rhizobacteria on nutrient acquisition process. A review. **Biology and Fertility of Soils**, v. 51, p. 403-415, 2015.

PORTO, L. S. *et al.* Effective microorganisms and *Azospirillum brasilense*: effects on corn yield. **Revista de Biotecnologia & Ciência**, v. 9, n. 2, p. 11-21, 2020.

QIU, M. *et al.* Application of bioorganic fertilizer can control Fusarium wilt of cucumber plants by regulating microbial community of rhizosphere soil. **Biology and Fertility of Soils**, v. 48, p. 807-816, 2012.

RAJ, T. S. *et al.* Biological control of sheath blight of rice caused by *Rhizoctonia solani* Kuhn using marine associated *Bacillus subtilis*. **International Archive of Applied Sciences and Technology**, v. 10, n. 4, p. 148-153, 2019.

RAJENDRAPRASAD, M. *et al.* Biological control of tomato damping off caused by *Rhizoctonia solani*. **International Journal of Chemical Studies**, v. 5, n. 4, p. 1426-1432, 2017.

RATZ, R. J. *et al.* Potencial biotecnológico de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas no cultivo de milho e soja. **Engevista**, v. 19, n. 4, p. 890-905, 2017.

RAZALI, N. M. *et al.* Characterizations of Transposable Element (TE) Landscape in *Rhizoctonia solani*. **AIP Conference Proceedings**, v. 2111, p. 060017, 2019.

REMUSKA, A. C.; PRIA, M. D. Efeito de *Bacillus thuringiensis* e *Trichoderma* sp. no crescimento de fungos fitopatogênicos. **Ciências Exatas e da Terra, Ciências Agrárias e Engenharias**. v. 3, n. 13, p. 31-36, 2007.

RENWICK, A. *et al.* Assessment of in vitro screening systems for potential biocontrol agents of *Gaeumannomyces graminis*. **Plant Pathology**, v. 40, p. 524-532, 1991.

RIBEIRO, V. P. *et al.* Endophytic *Bacillus* strains enhance pearl millet growth and nutrient uptake under low-P. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 40-46, 2018.

ROCHA, W. S. *et al.* Efeito da microbiolização na germinação e crescimento inicial de feijão caupi no Estado do Tocantins. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v. 11, n. 6, p. 41-47, 2017.

ROMEIRO, R. S. Prospecção da potencialidade antagonística de possíveis agentes de biocontrole. In: ROMEIRO, R. S. (Ed.). **Controle biológico de doenças de plantas: procedimentos**. Viçosa: UFV, 2007. p. 95-122.

SÁ, M. N. F. *et al.* Microbiolização na qualidade de sementes e crescimento inicial de plantas de *Vigna unguiculata* L. Walp. **Acta Brasiliensis**, v. 3, n. 3, p. 111-115, 2019.

SAHARAN, B. S., NEHRA, V. Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Critical Review. **Life Sciences and Medicine Research**, v. 2011, n.1, p. 1-30, 2011.

SAMSATLY, J. *et al.* Antioxidant genes of plants and fungal pathogens are distinctly regulated during disease development in different *Rhizoctonia solani* pathosystems. **Plos One**, v. 13, n. 2, p. 1-24, 2018.

SANTOS, H. R. B. *et al.* Morfometria de sementes de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.). **Scientia Plena**, v. 8, n. 4, p. 1-4, 2012.

SANTOYO, G. *et al.* Plant growth-promoting bacterial endophytes. **Microbiological Research**, v. 183, p. 92–99, 2016.

SARWA, M.; KREMER, R. Determination of bacterially derived auxins using a microplate method. **Letters in Applied Microbiology**, v. 20, p. 282-285, 1995.

SHANER, G.; FINNEY, R. E. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slowmildewing resistance in Knox wheat. **Phytopathology**, v. 67, p. 1051-1056, 1977.

SHEN, J. *et al.* Phosphorus dynamics: from soil to plant. **Plant Physiol**, v. 156, p. 997-1005, 2011.

SOARES, R. M. *et al.* Escala diagramática para avaliação da severidade da mancha alva da soja. **Tropical Plant Pathology**, v. 34, n. 5, p. 333-338, 2009.

SOARES, V.N. *et al.* Physiological potential of rice seeds treated with rhizobacteria or the insecticide thiamethoxam. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 34, n. 4, p. 563-572, 2012.

SORIA S. *et al.* Endophytic bacteria from *Pinus taeda* L. as biocontrol agents of *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 72, n. 2, p. 281-284, 2012.

TAMREIHAO, K. *et al.* Biocontrol and plant growth promoting activities of a *Streptomyces corchorusii* strain UCR3-16 and preparation of powder formulation for application as biofertilizer agents for rice plant. **Microbiological Research**, v. 192, p. 260–270, 2016.

TENSINGH, B. N., JEMEEMA, B. P. Isolation, identification and characterization of phosphate solubilizing bacteria (PSB) isolated from economically important crop plants. **International Journal of Current Microbiology and Applied Science**, v. 4, n. 3, p. 915-924, 2015.

VENIERAKI, A. *et al.* The genetic diversity of culturable nitrogen-fixing bacteria in the rhizosphere of wheat. **Microbial Ecology**, v. 61, n. 2, p. 277-285, 2010.

WALPOLA, B. C., YOON, M. H. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria and their co-inoculation efficiency on tomato plant growth and phosphorous uptake. **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, p. 266-275, 2013.

WEI, Y. *et al.* Effect of organic acids production and bacterial community on the possible mechanism of phosphorus solubilization during composting with enriched phosphate-solubilizing bacteria inoculation. **Bioresource Technology**, v. 247, p. 190-199, 2018.

WIBBERG, D. *et al.* Establishment and interpretation of the genome sequence of the phytopathogenic fungus *Rhizoctonia solani* AG1-IB isolate 7/3/14. **Journal of Biotechnology**, v. 167, p. 142–55, 2013.

YANG, G.; LI, C. General description of *Rhizoctonia* species complex. **Plant Pathology**, v. 2, p. 41-52, 2012.

YI-YANG, Y. *et al.* An improved strategy for stable biocontrol agents selecting to control rice sheath blight caused by *Rhizoctonia solani*. **Microbiological Research**, v. 203, p. 1-9, 2017.

YU, Y-Y. *et al.* An improved strategy for stable biocontrol agents selecting to control rice sheath blight caused by *Rhizoctonia solani*. **Microbiological Research**, v. 203, p. 1-9, 2017.

ZHAO, H. *et al.* Biological activity of lipopeptides from *Bacillus*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.101, p. 5951–5960, 2017.