

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA - MESTRADO

HAMILTON EDEMUNDO TULLIO

POTENCIAL DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DO CACAU PARA O
CONTROLE DE FUNGOS DE SOLO E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO
RADICULAR NA CULTURA DA SOJA

PONTA GROSSA
2017

HAMILTON EDEMUNDO TULLIO

POTENCIAL DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DO CACAU PARA O
CONTROLE DE FUNGOS DE SOLO E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO
RADICULAR NA CULTURA DA SOJA

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Ponta Grossa para a obtenção do título de Mestre em Agronomia. Área de concentração em Fitopatologia.

Orientador: Prof. Dr. David de Souza Jaccoud Filho

PONTA GROSSA
2017

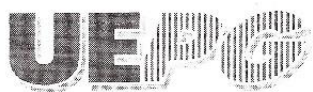
Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

T918 Tullio, Hamilton Edemundo
Potencial de bactérias endofíticas do
cacau para o controle de fungos de solo e
promoção de crescimento radicular na
cultura da soja/ Hamilton Edemundo Tullio.
Ponta Grossa, 2017.
79f.

Dissertação (Mestrado em Agronomia -
Área de Concentração: Agricultura),
Universidade Estadual de Ponta Grossa.
Orientador: Prof. Dr. David de Souza
Jaccoud Filho.

1.Antagonismo. 2.Controle biológico.
3.Fusarium solani. 4.Rhizoctonia solani.
5.Sclerotinia sclerotiorum. I.Jaccoud
Filho, David de Souza. II. Universidade
Estadual de Ponta Grossa. Mestrado em
Agronomia. III. T.

CDD: 632.96



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título da Dissertação: “Potencial de bactérias endofíticas do cacau para o controle de fungos de solo e promoção de crescimento radicular na cultura da soja”.

Nome: Hamilton Edemundo Tullio

Orientador: David de Souza Jaccoud Filho

Aprovado pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. David de Souza Jaccoud Filho

Profª. Drª Edilaine Maurícia Gelinski Grabicoski

Profª Drª Luciane Henneberg

Data da Realização: 06 de setembro de 2017.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que em seu amor, carinho e cuidado, me concedeu o dom da vida e a oportunidade de partilha-la com todos, para sua glória e para o bem comum.

A CAPES pela concessão da bolsa.

A Universidade Estadual de Ponta Grossa por todo o auxílio.

Ao meu orientador, professor Dr. David de Souza Jaccoud Filho, pela amizade que me foi a grande motivação para a realização deste curso, pela paciência e confiança.

A todos os professores do programa de Pós-graduação em Agronomia, que foram tão importantes, devido aos conhecimentos transmitidos.

Ao coordenador do mestrado e doutorado (Prof. Dr. Neyde Fabíola Balarezo Giarola), por todos os auxílios prestados.

A Professora Msc. Milena Pupo Raimam, pela amizade e conhecimentos transmitidos e pelo fornecimento da coleção de bactérias estudadas.

Aos membros do grupo de fitopatologia aplicada da UEPG, professor David, Luciane, Zima, Carlos, Edilaine, Nathaly, Felipe Manfrom, Guilherme, Marciely, Victor, César, Rubiane, Ana Paula, Valter, Vinícius, André, Bruna, Ariane, Guilherme, Ivan, Marcelo, Pedro, Danilo, Adriano, Renam, Diogo, Raul e Simão. Querida família F-12, obrigada pela amizade, ajuda e companheirismo.

Aos meus pais, Liamar da Costa Muniz Tullio e José Eduardo Tullio, meu irmão Marlon Eduardo Tullio, a todos os meus amigos do grupo solo sagrado e da comunidade católica shalom, que com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que tudo ficasse bem.

A todos os funcionários da Universidade Estadual de Ponta Grossa, obrigada pela dedicação.

Aos membros componentes da banca examinadora, pela avaliação do trabalho, sugestões e contribuições fornecidas.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para a conclusão desse trabalho, meus sinceros agradecimentos.

¹⁹Na tarde desse mesmo dia, que era o primeiro da semana, estando fechadas, por medo dos judeus, as portas do lugar onde os discípulos estavam reunidos, entrou Jesus, colocou-se no meio e disse-lhes: “A paz esteja convosco!” (João 20, 19)

RESUMO

A preocupação da sociedade com o excessivo uso de agrotóxicos utilizados na agricultura, para o controle de doenças, gera uma grande demanda de pesquisas com métodos de controle ambientalmente menos agressivos. Dentre eles, destaca-se o controle biológico. O uso de relações antagônicas, exercidas por microrganismos, tais como: antibiose, competição, parasitismo, predação e a indução de resistência em plantas, oferece uma vasta gama de oportunidades para a utilização de microrganismos que, ainda, são pouco conhecidos como os microrganismos endofíticos. O objetivo do trabalho foi realizar um levantamento do potencial de controle biológico de bactérias endofíticas isoladas do cacau, para os patógenos de solo *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum* e sua ação na promoção do crescimento radicular de plantas de soja. Foram avaliadas 22 bactérias endofíticas em relação a seu potencial antagônico *in vitro*, pelo método de cultivo pareado com os fitopatógenos, utilizando como parâmetros: a formação de halo de inibição exercido pelas bactérias, o tamanho da colônia do patógeno e a porcentagem de inibição do crescimento micelial do patógeno. Os parâmetros utilizados para avaliar o potencial de controle das bactérias endofíticas sobre fungos de solo e a promoção do crescimento radicular *in vivo* foram: a porcentagem de emergência de plantas, a altura de plantas, a porcentagem de plantas anormais, a severidade de doença, o volume de raízes, as massas fresca e seca de raízes e das partes aérea e total das plantas. Foram encontrados 9 isolados (TCB 02, TCB 7, TCB 08, TCB 10, TCB 11, TCB 17, TCB 18, TCB 19 e TCB 20), que apresentaram mais de 75% de inibição para pelo menos um dos patógenos testados nos experimentos *in vitro*, demonstrando alto potencial antagônico. O isolado bacteriano TCB 10, identificado como *Paenibacillus* e o isolado bacteriano TCB 08, identificado como *Staphylococcus* apresentaram potencial antagônico para os três fitopatógenos. Os isolados TCB 17, TCB 18 e TCB 19 apresentaram potencial antagônico para *S. sclerotiorum*. Para os testes com o tratamento de sementes o isolado bacteriano TCB 10 apresentou redução da severidade de *R. solani*. Não se pôde concluir que as bactérias endofíticas realmente exerceram promoção do crescimento radicular nas plantas.

Palavras-chave: Antagonismo. Controle Biológico. *Fusarium solani*. *Rhizoctonia solani*. *Sclerotinia sclerotiorum*.

ABSTRACT

The society concern with the excessive use of agrochemicals in agriculture to control diseases generates great demand for research with environmentally less aggressive control methods, among them biological control. Utilizing antagonistic relations exerted by microorganisms such as antibiosis, competition, parasitism, predation and resistance induction in plants, offering a wide range of opportunities for the use of microorganisms that are still little known as endophytic microorganisms. The objective of this work was to investigate the biological control potential of endophytic bacteria isolated from cocoa against soil pathogens *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani* and *Sclerotinia sclerotiorum* and their action in promoting the root growth of soybean plants. Twenty-two endophytic bacteria were evaluated *in vitro* for their antagonistic potential by the culture method paired against phytopathogens, using as parameters: the formation of inhibition halo exerted by bacteria, the size of the pathogen colony and the percentage of inhibition of mycelial growth of the pathogen. The parameters used to evaluate the the control potential of endophytic bacteria on soil fungi and the promotion of root growth *in vivo* were: the percentage of plant emergence, plant height, percentage of abnormal plants, disease severity, root volume, the fresh mass and dry mass of roots, and the aerial and total part of the plants. There were 9 isolates (TCB 02, TCB 7, TCB 08, TCB 10, TCB 11, TCB 11, TCB 17, TCB 18, TCB 19 and TBC 20) that showed more than 75% inhibition for at least one of the pathogens tested in the experiments *in vitro*, demonstrating high antagonistic potential. The bacterial isolate TCB 10, identified as *Paenibacillus* and the bacterial isolate TCB 08, identified as *Staphylococcus* presented an antagonistic potential for the three phytopathogens. The isolates TCB 17, TCB 18 and TCB 19 presented antagonistic potential for *S. sclerotiorum*. For the tests with the seed treatment the bacterial isolate TCB 10 presented reduction of the severity of *R. solani*. It was not possible to conclude that the endophytic bacteria promoted the growth of roots in plants.

Keywords: Antagonism. Biological Control. *Fusarium solani*. *Rhizoctonia solani*. *Sclerotinia sclerotiorum*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	–Classificação das bactérias a nível de gênero, com base no sequenciamento genético do gene 16S ribossomal testadas neste projeto para controle biológico, UEPG, Ponta Grossa, 2017.....	32
Tabela 2	–Classificação das bactérias a nível de espécie, com base no sequenciamento genético do gene 16S ribossomal, segundo a comparação com o banco de dados do NCBI. UEPG, Ponta Grossa, 2017.....	33
Tabela 3	–Descrição dos tratamentos utilizados em cada experimento <i>in vivo</i> , UEPG, Ponta Grossa, 2017.....	39
Tabela 4	–Halo de inibição promovido por bactérias endofíticas sobre o fungo <i>Fusarium solani</i> , no primeiro experimento realizado, UEPG, Ponta Grossa, 2017.....	44
Tabela 5	–Área da colônia fúngica de <i>Fusarium solani</i> , no primeiro experimento realizado, UEPG, Ponta Grossa, 2017.....	45
Tabela 6	–Porcentagem de inibição promovido por bactérias endofíticas sobre o fungo <i>Fusarium solani</i> , no primeiro experimento realizado, UEPG, Ponta Grossa, 2017.....	46
Tabela 7	–Halo de inibição promovido por bactérias endofíticas sobre o fungo <i>Rhizoctonia solani</i> , no primeiro experimento realizado, UEPG, Ponta Grossa, 2017.....	47
Tabela 8	–Área da colônia fúngica de <i>Rhizoctonia solani</i> , no primeiro experimento realizado, UEPG, Ponta Grossa, 2017.....	47
Tabela 9	–Porcentagem de inibição promovido por bactérias endofíticas sobre o fungo <i>Rhizoctonia solani</i> , no primeiro experimento realizado, UEPG, Ponta Grossa, 2017.....	49
Tabela 10	–Halo de inibição promovido por bactérias endofíticas sobre o fungo <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , no primeiro experimento realizado, UEPG, Ponta Grossa, 2017.....	50
Tabela 11	–Área da colônia fúngica de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , no primeiro experimento realizado, UEPG, Ponta Grossa, 2017.....	51
Tabela 12	–Porcentagem de inibição promovido por bactérias endofíticas sobre o fungo <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , no primeiro experimento realizado, UEPG, Ponta Grossa, 2017.....	51

Tabela 13 – Halo de inibição promovido por bactérias endofíticas sobre o fungo <i>Fusarium solani</i> , no segundo experimento realizado, UEPG, Ponta Grossa, 2017.....	52
Tabela 14 – Área da colônia fúngica de <i>Fusarium solani</i> , no segundo experimento realizado, UEPG, Ponta Grossa, 2017.....	53
Tabela 15 – Porcentagem de inibição promovido por bactérias endofíticas sobre o fungo <i>Fusarium solani</i> , no segundo experimento realizado, UEPG, Ponta Grossa, 2017.....	54
Tabela 16 – Halo de inibição promovido por bactérias endofíticas sobre o fungo <i>Rhizoctonia solani</i> , no segundo experimento realizado, UEPG, Ponta Grossa, 2017.....	55
Tabela 17 – Área da colônia fúngica de <i>Rhizoctonia solani</i> , no segundo experimento realizado, UEPG, Ponta Grossa, 2017.....	56
Tabela 18 – Porcentagem de inibição promovido por bactérias endofíticas sobre o fungo <i>Rhizoctonia solani</i> , no segundo experimento realizado, UEPG, Ponta Grossa, 2017.....	57
Tabela 19 – Halo de inibição promovido por bactérias endofíticas sobre o fungo <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , no segundo experimento realizado, UEPG, Ponta Grossa, 2017.....	58
Tabela 20 – Área da colônia fúngica de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , no segundo experimento realizado, UEPG, Ponta Grossa, 2017.....	59
Tabela 21 – Porcentagem de inibição promovido por bactérias endofíticas sobre o fungo <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , no segundo experimento realizado, UEPG, Ponta Grossa, 2017.....	60
Tabela 22 – Emergência, altura e porcentagem de plantas anormais, após tratamento de sementes com bactérias endofíticas em sementes com e sem inoculação de <i>Fusarium solani</i> , semeadas em casa de vegetação, UEPG, Ponta Grossa, 2017.....	61
Tabela 23 – Severidade e volume de raízes, após tratamento de sementes com bactérias endofíticas em sementes com e sem inoculação de <i>Fusarium solani</i> , semeadas em casa de vegetação, UEPG, Ponta Grossa, 2017.....	62
Tabela 24 – Massa fresca e massa seca de plantas (raíz, parte aérea e total), após tratamento de sementes com bactérias endofíticas em sementes com e sem inoculação de <i>Fusarium solani</i> , semeadas em casa de vegetação, UEPG, Ponta Grossa, 2017.....	63

Tabela 25 – Emergência, altura e porcentagem de plantas anormais, após tratamento de sementes com bactérias endofíticas com e sem inoculação de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , semeadas em casa de vegetação, UEPG, Ponta Grossa, 2017.....	63
Tabela 26 – Severidade e volume de raízes, após tratamento de sementes com bactérias endofíticas em sementes com e sem inoculação de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , semeadas em casa de vegetação, UEPG, Ponta Grossa, 2017.....	64
Tabela 27 – Massa fresca e massa seca de plantas (raíz, parte aérea e total), após tratamento de sementes com bactérias endofíticas em sementes com e sem inoculação de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , semeadas em casa de vegetação, UEPG, Ponta Grossa, 2017...	65
Tabela 28 – Emergência, altura e porcentagem de plantas anormais, após tratamento de sementes com bactérias endofíticas em sementes com e sem inoculação de <i>Rhizoctonia solani</i> , semeadas em casa de vegetação, UEPG, Ponta Grossa, 2017...	66
Tabela 29 – Severidade e volume de raízes, após tratamento de sementes com bactérias endofíticos em sementes com e sem inoculação de <i>Rhizoctonia solani</i> , semeadas em casa de vegetação, UEPG, Ponta Grossa, 2017.....	67
Tabela 30 – Massa fresca e massa seca de plantas (raíz, parte aérea e total), após tratamento de sementes com bactérias endofíticas em sementes com e sem inoculação de <i>Rhizoctonia solani</i> , semeadas em casa de vegetação, UEPG, Ponta Grossa, 2017...	68

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVO	15
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1	CONTROLE BIOLÓGICO	16
3.2	BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS	18
3.3	BACTÉRIAS ENDOFITICAS ISOLADAS DO CACAU	20
3.4	TRATAMENTO BIOLÓGICO DE SEMENTES	21
3.5	DOENÇAS RADICULARES DA CULTURA DA SOJA	22
3.6	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	23
3.7	<i>Rhizoctonia solani</i>	25
3.8	<i>Fusarium solani</i>	28
4	MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1	OBTENÇÃO DAS BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS	31
4.1.1	Isolamento das bactérias endofíticas	31
4.1.2	Identificação das bactérias endofíticas	32
4.2	OBTENÇÃO DOS MICRORGANISMOS FITOPATOGÊNICOS	34
4.3	SELEÇÃO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTAGÔNICO DAS BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS <i>IN VITRO</i>	34
4.3.1	Método de cultivo pareado	34
4.3.2	Avaliação do potencial de antagonismo	35
4.3.3	Halo de inibição	35
4.3.4	Área da colônia	36
4.3.5	Porcentagem de inibição	36
4.3.6	Delineamento experimental	36
4.4	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTAGÔNICO DAS BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS <i>IN VIVO</i>	37
4.4.1	Obtenção das colônias dos patógenos	38
4.4.2	Obtenção da suspensão bacteriana	38
4.4.3	Inoculação das sementes de soja	38
4.4.4	Tratamento das sementes	39
4.4.5	Procedimento de semeadura	40

4.4.6	Avaliação de emergência	40
4.4.7	Avaliação de altura de plantas	40
4.4.8	Avaliação de plantas anormais.....	40
4.4.9	Avaliação de severidade	41
4.4.10	Avaliação do volume de raízes.....	41
4.4.11	Pesagem da massa fresca e massa seca	41
4.4.12	Delineamento experimental.....	42
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1	PRIMEIRO EXPERIMENTO <i>IN VITRO</i>	43
5.2	SEGUNDO EXPERIMENTO <i>IN VITRO</i>	52
5.3	EXPERIMENTO <i>IN VIVO</i>	60
6	CONCLUSÕES	69
7	REFERÊNCIAS.....	70

1 INTRODUÇÃO

Inúmeras moléculas químicas têm sido usadas extensivamente para proteção contra patógenos. Entretanto, seus efeitos nocivos ao meio ambiente e ao homem têm estimulado a redução de seu uso, buscando métodos de controle menos agressivos. Os defensivos agrícolas apresentam efeitos indesejáveis como a poluição ambiental, a intoxicação do homem e animais e o surgimento de resistência dos patógenos a esses produtos. Neste contexto, buscando uma agricultura mais sustentável, o controle biológico vem buscando a diminuição e interação com produtos químicos, baseando-se em métodos ambientalmente menos agressivos, consolidando-se no manejo integrado de doenças. Muitos agentes bióticos podem ser utilizados em controle biológico, e os residentes do filoplano e endofíticos são uma alternativa ainda pouco explorada. O filoplano de qualquer planta e seus tecidos internos abrigam uma microbiota diversificada e cíclica, que engloba principalmente fungos filamentosos, leveduras e bactérias (ROMEIRO, 2013a).

Nas últimas décadas, a busca e seleção de microrganismos endofíticos ganhou maior atenção da comunidade científica, pois este grupo de seres vivos têm demonstrado diferentes competências em suas associações com variadas espécies vegetais. Tais microrganismos são caracterizados por habitarem o interior dos tecidos vegetais por períodos de seu ciclo de vida, estabelecendo associações sem causar doenças ou danos aparentes em seus hospedeiros e são representados principalmente por fungos e bactérias (PETRINI, 1991; AZEVEDO et al., 2000).

Muitos são os benefícios oriundos da interação planta-endofíticos, como a promoção de crescimento vegetal, disponibilização de nutrientes, produção de fitormônios, indução de resistência a doenças e biocontrole de patógenos (HALLMAN et al., 1997). Este último tem sido intensamente investigado, pois em decorrência da crescente preocupação com a produção de alimentos livres de agrotóxicos, o controle biológico tornou-se uma importante ferramenta para a agricultura sustentável (BETTIOL; MORANDI, 2009).

Segundo Lima; de Marco e Felix (2000), o controle biológico está embasado nas relações ecológicas antagônicas, que envolvem competição por espaço e/ou nutrientes, antibiose, micoparasitismo, indução de resistência,

predação, entre outros. Nem todas as relações antagônicas estão perfeitamente compreendidas e os exemplos mais bem estudados são entre fungos fitopatogênicos e seus antagonistas (HOWELL, 2006).

2 OBJETIVO

O objetivo do trabalho foi realizar um levantamento do potencial de controle biológico, de bactérias endofíticas isoladas do cacau, para os fitopatógenos de solo *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum* e sua ação na promoção do crescimento radicular de soja.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar seleção *in vitro* de bactérias endofíticas isoladas do cacau potencialmente antagônicas a *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum*.
- Avaliar as bactérias endofíticas selecionadas *in vitro*, com relação ao seu potencial antagônico em experimentos *in vivo* (casa de vegetação), na cultura da soja, visando controle de tombamento de plântulas causado pelos fungos: *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum*.
- Avaliar a promoção do crescimento radicular nas plantas devido a inoculação de sementes de soja, com as bactérias endofíticas selecionadas.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 CONTROLE BIOLÓGICO

Em resposta a preocupações ambientais e de saúde sobre o uso prolongado de agroquímicos, há um interesse considerável em encontrar abordagens de controle alternativo para uso em estratégias de manejo integrado de pragas e doenças na agricultura. O uso de agentes de controle biológico minimizam os efeitos prejudiciais sobre o meio ambiente e essas estratégias têm sido amplamente pesquisadas.

Segundo Cook e Baker (1983), o controle biológico pode ser definido como “a redução da soma de inóculo ou das atividades determinantes da doença provocada por um patógeno, realizada por ou através de um ou mais organismos que não o homem”.

Agentes de controle biológico podem agir de diferentes maneiras sobre os patógenos. Antibiose, competição, parasitismo, predação e indução de resistência são os principais mecanismos (TORRES; MICHEREFF, 2000; TRIGIANO; WINDHAM; WINDHAM, 2010; AMORIM; REZENDE; BERGAMIN FILHO, 2011).

Antibiose pode ser definida como a interação entre organismos, na qual um ou mais metabólitos produzidos pelo antagonista têm efeito negativo sobre o patógeno, resultando na inibição do crescimento e/ou germinação. Competição é a interação entre dois ou mais organismos compelidos na mesma ação, esse tipo de interação ocorre principalmente quando há disputa por alimentos, por espaço e por oxigênio. O Parasitismo ocorre quando um microrganismo se nutre a partir de estruturas vegetativas e/ou reprodutivas do outro. Já os hiperparasitas atacam hifas, estruturas de resistência e de reprodução dos fitopatógenos. Predação ocorre quando um organismo obtém alimento a partir de fitopatógenos e de diferentes fontes. A indução de resistência é o estímulo dos mecanismos de defesa do hospedeiro através da introdução de organismos não patogênicos, seus metabólitos, linhagens fracas ou avirulentas do patógeno. Através da introdução de determinado agente de controle biológico pode ocorrer a coexistência de diferentes mecanismos de controle através do mesmo organismo (TORRES; MICHEREFF, 2000; MICHEREFF; ANDRADE; MENEZES, 2005).

Dentre as bactérias envolvidas no controle biológico, os gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus* são as mais estudadas (BETTIOL et al. 2009). Essas por sua vez, agem por antibiose, competição, parasitismo e indução de resistência, podendo estar presentes no solo, rizosfera ou endofiticamente nos tecidos vegetais (LUDWIG; MOURA; GOMES, 2013).

O apelo à pesquisa sobre controle biológico está aumentando globalmente e o controle biológico tornou-se gradualmente um componente central do manejo integrado. A partir da pesquisa sobre o uso de microrganismos antagonistas específicos, muitos microrganismos eficientes foram encontrados e alguns são comercializados com sucesso, como uma ferramenta efetiva no controle de pragas e doenças e também como inoculantes para biofertilização. No entanto, o número de produtos biológicos ainda é bastante limitado (BETTIOL et al. 2009).

Em todo o mundo o crescimento das empresas de biocontrole tem sido de 16%, enquanto o das empresas de agrotóxicos tem sido de apenas 3%. O custo para desenvolvimento de novas moléculas gira em torno de 256 milhões de dólares, isso tem ocasionado a compra de muitas empresas de controle biológico por multinacionais produtoras de agrotóxicos (ABCBIO, 2015).

A regulamentação para produção dos produtos de controle biológico, e a capacitação de pessoas para o uso correto destes, mantêm as perspectivas positivas para o crescimento do uso em larga escala, e também para o surgimento de novos produtos (BETTIOL; MORANDI, 2009).

Assim como o desenvolvimento de moléculas químicas o controle biológico apresenta dificuldades, como a especificidade de controle, a falta de estudos para adequar o uso do controle biológico para os diversos sistemas e culturas e também a eficácia do controle. O que pode ser explicado por fatores como a adaptação do antagonista ao meio em que este está sendo exposto, pois muitos microrganismos trazidos de outras regiões ou de outros países não tem a mesma eficiência quando expostos a condições diferentes do meio em que foram isolados (ABCBIO, 2015).

Outra limitação encontrada é a aplicação correta desses microrganismos, pois a aplicação deste é diferente da aplicação de um químico. As condições de aplicação, tais como umidade e temperatura, devem favorecer a sobrevivência do microrganismo, bem como o volume de aplicação, o tipo de ponta, peneira e misturas

de tanque também tem grande influência sobre a efetividade do controle (BETTIOL; MORANDI, 2009).

3.2 BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS

Os microrganismos endofíticos são caracterizados pela forma de infecções assintomáticas localizadas internamente em tecidos vegetais, como cascas, raízes, caules, folhas e semente. A definição do termo endofíticos mudou ao longo do tempo, a partir do conceito inicial introduzido por De Bary em 1866 para descrever organismos que habitavam o interior das plantas (WILSON, 1995).

A definição de endofíticos conforme descrito por Wilson (1995), é usado como "fungos ou bactérias que, durante todo ou parte do seu ciclo de vida, invadem os tecidos das plantas vivas e causam infecções assintomáticas inteiramente dentro dos tecidos das plantas, mas não causam sintomas de doença".

Segundo Azevedo (1998), os microrganismos endofíticos adentram ao interior das células através de aberturas naturais como estômatos ou hidatódios, ou através de ferimentos nos tecidos vegetais. Em seguida ocorre a colonização, multiplicação e movimentação do microrganismo no tecido.

De acordo com suas estratégias de vida, microrganismos endofíticos podem ser classificados como obrigatórios ou facultativos. Os endofíticos obrigatórios são estritamente dependentes da planta hospedeira para o seu crescimento e a sobrevivência. A transmissão para outras plantas ocorrem verticalmente através de sementes ou material propagativo, ou através de vetores. Os endofíticos facultativos têm um estágio em seu ciclo de vida em que existem fora das plantas hospedeiras. O ciclo de vida dos endofíticos facultativos pode ser caracterizado como bifásico, alternando entre plantas e meio ambiente, principalmente solo. A grande maioria dos microrganismos que podem se multiplicar dentro dos tecidos vegetais provavelmente tem uma propensão a esse estilo de vida bifásico (HARDOIM; VAN OVERBEEK; VAN ELSAS, 2008).

O papel nas sementes ainda não está esclarecido. Os microrganismos endofíticos de sementes podem vir de diferentes órgãos da plantas, sendo transferidos para sementes dos sistemas vasculares ou através de gametas, resultando em colonização de embriões e endospermas. Os meristemas de

reprodução também podem ser a fonte de microrganismos (MALFANOVA et al., 2013).

Após a germinação das sementes, espera-se que essas populações aumentem em número e colonizem diferentes tecidos, incluindo raízes, atingindo a endorizosfera e também a exorizosfera (HERRERA et al., 2016). Mano et al., (2006), observaram que embora os endófitos de sementes de arroz tenham colonizado principalmente brotos, algumas cepas foram capazes de se espalhar para a rizosfera e o solo.

Os endofíticos e seus metabolitos foram documentados na sua capacidade de melhorar e promover o crescimento das plantas, aumentar o rendimento, reduzir os sintomas da doença causados por agentes patogênicos das plantas, reduzir a herbivoria de insetos e mamíferos, remover contaminantes do solo, incluindo metais pesados, melhorar o desempenho da planta em condições extremas de temperatura, disponibilidade de água, solubilizar fosfato e contribuir com nitrogênio assimilável para plantas. Vários novos antibióticos, antimicrobianos, imunossupressores e compostos anticancerígenos também foram isolados e purificados a partir de microrganismos endofíticos (AZEVEDO, 1998).

Alguns deles podem aumentar o crescimento das plantas devido à produção de hormônios vegetais ou à sua contribuição na aquisição de nutrientes vegetais, especialmente nitrogênio e fósforo (GAGNE-BOURGUE et al., 2013). A espécie *Azospirillum brasilense* produz ácido fenilacético, relacionado às auxinas, que antagoniza os agentes patogênicos das plantas (ROMERO et al., 2003). A auxina e outros fitohormônios produzidos por microrganismos podem ter efeitos antimicrobianos imediatos e também impactar em outros processos fisiológicos, como crescimento e sinalização vegetal (MORSHED et al., 2005).

Por outro lado, a atividade antifúngica de vários agentes bacterianos endofíticos isolados de sementes também foi reconhecida, incluindo a formação de lipopeptídeos como surfactina, iturina e micobacilina (GAGNE-BOURGUE et al., 2013). Alguns gêneros de bactérias frequentemente mencionadas como *Bacillus* e *Pseudomonas* apresentaram efeitos antagônicos sobre *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol.), agente causador da murcha do tomateiro (SUNDARAMOORTHY; BALABASKA, 2013). Também foram encontrados compostos voláteis antifúngicos no biocontrole de *Enterobacter* obtidos a partir de sementes de arroz (MUKHOPADHYAY et al., 1996).

Os mecanismos de ação dos microrganismos endofíticos podem influenciar direta ou indiretamente os patógenos e os vegetais. Diferentes espécies de *Bacillus* produzem uma variedade de lipopeptídeos na rizosfera, raízes, folhas e frutas. As espécies de *Bacillus* podem produzir múltiplos antibióticos e pode haver interações sinérgicas contra agentes patogênicos (HAAS; BLUMER; KEEL, 2000).

Bactérias endofíticas associadas à planta podem, interromper as moléculas de sinalização para detecção necessárias para a virulência na interação patógeno hospedeiro. A detecção dessa sinalização é tipicamente mediada por lactases de homoserina de *N*- acil (AHLs). As bactérias como *Bacillus*, *Arthrobacter* e *Klebsiella*, produzem lactonases que degradam a AHL interferindo a comunicação do patógeno e prevenindo a expressão de genes de virulência (READING; SPERANDIO, 2006). Isto foi demonstrado usando a bactéria *Lysobacter enzymogenes* transformada com genes de lactonase, que reduziram a infecção por *Pectobacterium carotovorum*, causador da podridão mole em repolho (QIAN et al., 2010).

3.3 BACTÉRIAS ENDOFITICAS ISOLADAS DO CACAU

Theobroma cacao L. é uma árvore perene, nativa da bacia Amazônica, cultivada na América, África e Ásia e suas amêndoas são utilizadas para a produção de manteiga e mel de cacau utilizados na indústria alimentícia para a produção de chocolate, licores, geleias entre outros produtos. Diversos estudos demonstram que esta espécie vegetal é colonizada por uma ampla variedade de microrganismos. Entre os gêneros de bactérias citam-se *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Staphylococcus*, *Azotobacter*, *Acetobacter*, *Herbaspirillum*, *Agrobacterium*, *Enterobacter*, e *Burkholderia*, (STEENHOUDT; VANDERLEYDEN, 2000; BLOEMBERG; LUGTENBERG, 2001; LODEWYCKX et al., 2002; BASHAN; DE-BASHAN, 2005). Grandes populações de fungos endofíticos já foram encontradas em cacau, como representantes dos gêneros *Trichoderma*, *Pestalotiopsis*, *Curvularia*, *Tolypocladium*, *Acremonium*, *Blastomyces*, *Botryosphaeria*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Diaporthe*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Gibberella*, *Gliocladium*, *Lasiodiplodia*, *Monilochoetes*, *Nectria*, *Pestalotiopsis*, *Phomopsis*, *Pleurotus*, *Pseudofusarium*, *Rhizopycnis*, *Syncephalastrum*, *Verticillium*, entre outros (ARNOLD; HERRE, 2003; ARNOLD, et al., 2003; EVANS; HOLMES; THOMAS, 2003; RUBINI et

al., 2005). Tais endófitos vêm sendo avaliados como antagonistas de fitopatógenos que acometem culturas de grande importância econômica como soja, arroz, feijão, milho.

3.4 TRATAMENTO BIOLÓGICO DE SEMENTES

Os tratamentos de sementes não só protegem as sementes germinadas do tombamento em pré-emergência, mas também ajudam a garantir o desenvolvimento de um sistema radicular saudável, acelerando o crescimento e estabelecimento das plantas, tornando as plantas menos vulneráveis à infecção (MACHADO, 2000).

O tratamento de sementes com agentes biológicos além de promover a proteção de sementes contra patógenos do solo que causam doenças radiculares têm como objetivo a redução do uso de produtos químicos (NASSER; WETZEL; FERNANDES, 1987).

O tratamento de sementes com microrganismos pode ser feito tanto na aplicação direta dos agentes biológicos na semente como também com a aplicação de produtos biológicos formulados (MORETINI; MELO, 2007).

Os principais agentes de biocontrole utilizados no tratamento de sementes contra o tombamento de plântulas são o fungo *Thichoderma* spp. e a bactéria *Bacillus subtilis* (MELO, 1998; LIMA; DE MARCO; FELIX, 2000).

O agente de biocontrole *B. subtilis* produz diversas substâncias, entre elas antibióticos lipopeptídicos de largo espectro que são supressores eficazes de diversos fitopatógenos, incluindo as espécies de *Fusarium*, *Pythium*, *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Septoria* e *Verticillium* (NAGORSKA; BIKOWSKI; OBUCHOWSKI, 2007). Srividya; Sasirekha e Ashwini (2012), avaliando *B. subtilis* isolado da rizosfera observaram que o agente produziu enzimas micolíticas, glucanase e quitinase, que mostraram um amplo antagonismo contra fungos e bactérias fitopatogênicas. Um isolado de *B. subtilis* foi eficaz na inibição de vários patógenos pela produção de quitinase, mostrando um amplo espectro de antagonismo contra *Alternaria* spp. (55%), *Colletotrichum gloeosporioides* (57%), *Phytophthora capsici* (55%), *R. solani* (42%), *F. solani* (42%), *F. oxysporum* (40%) e *Verticillium theobromae* (36%) (NARASIMHAN; SHIVAKUMAR, 2012).

Lazzaretti e Bettiol (1997), aplicando produto a partir de *Bacillus subtilis* via tratamento de sementes obtiveram controle semelhante ao fungicida benomyl no controle de *S. sclerotiorum*, *Aspergillus* sp. e *Rhizoctonia solani*.

O tratamento biológico de sementes ao contrário do que ocorre com os fungicidas químicos, apresentam poucos resultados consistentes tanto em relação ao controle como sua aplicação eficaz nas sementes, necessitando de pesquisas que possibilitem a seleção de microrganismos para utilização como agentes de biocontrole e técnicas de aplicação eficientes nas sementes no controle de doenças radiculares.

3.5 DOENÇAS RADICULARES DA CULTURA DA SOJA

O Brasil é o segundo maior produtor de soja do mundo. Na safra 2016/2017, a cultura se consolidou em 33,9 milhões de hectares, totalizando uma produção de 114 milhões de toneladas, com produtividade média de 3.362 kg por hectare (CONAB, 2017). O aumento da produtividade da soja está associado aos avanços tecnológicos e manejo da cultura. Porém, ainda há fatores limitantes na produtividade.

As doenças causadas por fatores bióticos estão entre os fatores que mais reduzem a produtividade da cultura, contribuindo assim, para o aumento dos custos de produção. Dentre as doenças que atacam o sistema radicular da cultura, destacam-se causadas por bactérias, nematoides, vírus e por fim, doenças de origem fúngicas, sendo essas responsáveis pelo maior número de perdas nessa e em outras culturas (AMORIM; REZENDE; BERGAMIN FILHO, 2011).

As doenças de origem fúngicas radiculares são de difícil controle, pois há dificuldade de observação dos sintomas abaixo do nível do solo para um diagnóstico precoce. Há também a complexidade dos fatores envolvidos na interação hospedeiro-patógeno-ambiente, em que características abióticas e bióticas do solo podem influenciar direta e/ou indiretamente o desenvolvimento das doenças.

Dentre os principais agentes bióticos habitantes de solo destacam-se os fungos, as bactérias e os nematoides. Entretanto, os fungos constituem o maior grupo de patógenos radiculares, ocorrendo em todos os tipos de sistemas agrícolas, causando doenças nas principais espécies cultivadas, com uma variada gama de sintomas e hospedeiros (MICHEREFF; ANDRADE; MENEZES, 2005).

Costamilan; Lhamby e Bonato (1999) avaliaram a sobrevivência de fungos necrotróficos em restos de cultura da soja, cultivada no sistema de plantio direto, considerando que o período médio para a decomposição dos restos culturais da soja foi de 27 meses, com médias de temperatura durante o experimento de 18°C e precipitação de 3565 mm. Nas diferentes seqüências de culturas estudadas, e em todos os meses amostrados, os gêneros *Macrophomina*, *Fusarium* e *Rhizoctonia* foram sempre recuperados. A incidência média de *Fusarium* variou entre 28,4 e 34,5%, a de *Macrophomina*, entre 48,1 e 54,8% e a de *Rhizoctonia*, entre 3,5 e 4,7%. A habilidade de competição saprofítica e as estruturas de resistência desses patógenos permitem que permaneçam viáveis por muito tempo em uma mesma área. Podridões de raízes promovidas por *Rhizoctonia*, *Fusarium* ou por *Phytophthora sojae* foram menos severas em plantio direto ou cultivo mínimo (ROTHROCK; PHILLIPS; HOBBS, 1988).

Os principais agentes etiológicos que possuem importância para a cultura da soja são: *Rhizoctonia solani* Kühn, *Fusarium solani* (App. & Wollenw.) Snyd. & Hams, *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, *Phialophora gregata* (Allington, Chamberlain) W. Gams, *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid e *Sclerotium rolfsii* Sacc (ALMEIDA et al., 1997).

Os agentes *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani* e *Sclerotinia sclerotiorum*, se destacam devido à alta capacidade de colonização, sobrevivência, ampla gama de hospedeiros.

3.6 *Sclerotinia sclerotiorum*

O fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary, agente etiológico da doença Mofo Branco, pertence ao filo Ascomycota, classe Discomycetes, ordem Helotiales, família Sclerotiniaceae e gênero *Sclerotinia*. As hifas são hialinas, septadas, ramificadas e multinucleadas, apresentam coloração branca no meio de cultura e nas plantas (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006).

O mecanismo de sobrevivência deste fungo é através da produção de estruturas de resistência denominadas escleródios, que são agregados de hifas compactadas e endurecidas, produzidas em abundância nos tecidos infectados da planta. Essas estruturas apresentam formato irregular, de vários milímetros de

diâmetro e comprimento (SCHWARTZ; HARVESON; STEADMAN, 2011). O escleródio apresenta uma camada de células grossas, com acúmulo de melanina na parte externa, para proteção da massa de hifas contra condições adversas (BELL; WHEELER, 1986).

Os escleródios podem germinar de forma miceliogênica, onde há a produção de micélio hialino e septado, ou de forma carpogênia, onde o escleródio pode produzir um ou mais apotécios. As condições de temperatura e umidade são determinantes na germinação do escleródio, geralmente, quanto maiores os escleródios, maior a porcentagem de sua germinação e do número de apotécios produzidos (STEADMAN, 1983). O apotécio libera ascósporos continuamente por 2 a 17 dias, com uma média de nove dias, e o total de ascósporos produzidos por um apotécio atinge ao redor de dois milhões (STEADMAN, 1983). O período de viabilidade que o escleródio pode alcançar no campo, varia com as condições climáticas e a presença de microrganismos antagônicos no solo, podendo ficar viável de 5 a 8 anos (STEADMAN, 1983; AYERS; ADAMS, 1981).

O fungo *S. sclerotiorum* ataca cerca de 408 espécies, de 278 gêneros, em 75 famílias botânicas diferentes (BOLAND; HALL, 1994). Chegando a causar perdas de até 100% em algumas culturas como a canola e a ervilha (KIMATI et al., 2005). No inverno, sob irrigação, o feijão e o tomate irrigados podem sofrer perdas de até 70% (NASSER; SPEHAR, 2001). Na cultura da soja, na safra 2009/2010 perdas de até 40% foram registradas por Jaccoud Filho et al. (2010).

O fungo está disseminado em um grande número de países principalmente em regiões de clima temperado e subtropical, tendo como condições favoráveis de desenvolvimento temperaturas amenas, em torno de 20°C e alta umidade (KIMATI et al., 2005).

O fungo *S. sclerotiorum* pode ser transmitido de diferentes maneiras. Contaminações via lote de sementes, implementos e maquinário agrícola contaminado, solos contaminados, plantas daninhas suscetíveis, bem como restos culturais são as mais comuns (KIMATI et al., 2005). Em levantamento através de questionário realizado por Sartori et al. (2011), quanto a ocorrência de Mofo Branco, constatou-se que cerca de 85% dos entrevistados acreditam que o patógeno se instalou na área através do uso de implementos contaminados e lotes de sementes infectadas.

Em sementes armazenadas, o fungo pode alcançar longevidade de até sete anos em algumas culturas (MACHADO, 2000). A interação patógeno-semente pode ocorrer de duas formas. A primeira, e mais comum é a contaminação do lote com escleródios. A segunda e em menor intensidade ocorre de forma miceliogênica, onde micélios do fungo se aderem e ou penetram na semente, (MORAES; HENNEBERG, 2017; NASSER; SPEHAR, 2001; MACHADO, 2000). A associação do fungo á semente é classificada como: contaminação concomitante, onde a estrutura do fungo se encontra entre as sementes do lote, ou intra e extraembrionária onde o fungo se adere interna ou externamente (NEERGAARD,1979).

Ainda não foi estabelecido como ocorre à contaminação miceliogênica do fungo as sementes em formação. Postula-se que essa possa ocorrer de duas formas: diretamente através de infecção das vagens em formação, ou através da ligação interna das vagens com as sementes (MACHADO; ZANCAN, 2017).

Sementes contaminadas com micélios dormentes podem causar diferentes níveis de infecção, ou ainda servirem como fonte de inóculo para outras plantas presentes na área. A infecção pode se estabelecer pela atuação direta da semente contaminada gerando uma planta doente, ou indiretamente via cotilédones contaminados oriundos da germinação, sementes ou plantas mortas, servindo como fonte secundária de infecção (MACHADO; ZANCAN, 2017).

3.7 *Rhizoctonia solani*

Rhizoctonia solani (anamorfo *Thanatephorus cucumeris*), é a espécie mais estudada no gênero *Rhizoctonia* (SNEH; BURPEE; OGOSHI, 1991). A espécie foi descritas por Kühn em 1858 a partir de tubérculos de batata doentes. A descrição de Kühn sobre a espécie, bem como os sintomas da doença, pareciam vagos com alguns elementos de contaminações (PARMETER; WHITNEY, 1970). Em uma tentativa de ajudar a identificar adequadamente as espécie de *Rhizoctonia*, Duggar (1915) fez uma revisão completa do conceito de espécie, fornecendo informações detalhadas sobre as características morfológicas importantes que a distinguiram de outras espécies, bem como uma descrição dos sintomas que a espécie causa.

Com base nos trabalhos de Duggar (1915) e Parmeter e Whitney (1970), as características que definem *R. solani* incluem hifas septadas, células multinucleadas

em hifas jovens, coloração marrom de hifas maduras. A ramificação é observada próximo ao septo distal em hifas jovens; presença de septos doliporos; presença de um septo na ramificação da hifa próximo ao seu ponto de origem; as ramificações das hifas são concêntricas em sua extremidade basal; ausência conídios e grampos de conexão. Não ocorre esporulação na fase de anamorfo, as células geralmente são longas e multinucleadas, a variabilidade genética pode ocorrer a partir da fusão de hifas de diferentes isolados.

Os isolados de *Rhizoctonia solani* geralmente não produzem esporos assexuados, e o papel dos basidiosporos como fonte de inóculo na soja é desconhecido. O patógeno é um parasita facultativo que é muito bem sucedido em competir com outros saprófitos do solo. Sua sobrevivência no solo é auxiliada pela formação de escleródios (HOITINK; INBAR e BOEHM, 1991). Nos escleródios, surgem hifas que germinam para formar micélios, servindo como fonte de inóculo para infecção (KEIJER, 1996) e propagação da doença. Para a maioria das infecções por *Rhizoctonia*, os escleródios devem primeiro germinar para formar micélios que crescem em direção à planta hospedeira. O crescimento micelial geralmente ocorre em resposta a exsudatos de plantas hospedeiras, e é sucedido por ligação das hifas aos tecidos do hospedeiro, crescimento das hifas ao longo das paredes celulares epidérmicas do hospedeiro, formação do opressório, colonização do tecido hospedeiro e eventual colapso das células (KEIJER, 1996).

Rhizoctonia solani é considerado um patógeno necrotrófico que pode matar seu hospedeiro antes da colonização. A atividade da maioria dos patógenos necrotróficos tem sido associada à produção de enzimas extracelulares ou toxinas (VAN KAN, 2006). Boosalis (1950), estudou a patogenicidade de *R. solani* na soja, e descobriu que a descoloração do tecido hospedeiro precedeu o contato das hifas, sugerindo que os sintomas necróticos são resultado do efeito de certas substâncias tóxicas segregadas pelas hifas invasoras. Wyllie (1962), obteve resultados semelhantes e observou que os exsudatos radiculares das plantas de soja estimularam o crescimento micelial do patógeno.

A habilidade causadora de doenças de *R. solani* também tem sido associada à produção de enzimas pectinolíticas e celulolíticas (BATEMAN, 1970). As enzimas pectinolíticas pertencem a um grupo de enzimas que degradam a parede celular conhecidas por hidrolisar o componente de pectina das plantas. Essas enzimas foram

associadas à patogenicidade de muitos microrganismos patogênicos de plantas (COLLMER; KEEN, 1986; LANG; DÖRNENBURG, 2000).

O apodrecimento de sementes e o *damping off* na pré-emergência ocorre frequentemente em áreas com altas quantidades de inóculo, ou em condições que afetam negativamente a germinação e emergência de plântulas, como clima frio e úmido. Sob menor pressão do inóculo, as raízes ou hipocótilos das plantas germinadas ficam apodrecidas.

Podridões no hipocótilo e nas raízes são comuns depois que as plantas emergem. A coloração avermelhada na camada cortical das raízes laterais ou no colo perto da linha do solo geralmente é evidente nas plantas doentes. As plantas com raízes afetadas podem exibir um crescimento lento das raízes laterais, tornando as plantas menos vigorosas, com redução da capacidade de absorção de água e nutrientes. Tais plantas aparecem cloróticas e atrofiadas (HWANG; HOWARD; CHANG, 1996).

As plantas mais jovens são mais suscetíveis a infecções, onde a resistência geralmente aumenta com a idade da planta. No entanto, em condições ambientais desfavoráveis podem predispor plantas mais velhas a infecção (SINCLAIR; BACKMAN, 1989). Além das condições de umidade e temperatura, as aplicações de alguns herbicidas demonstraram aumentar a severidade da doença, seja por atividade inibidora sobre microrganismos antagonistas, ou pela redução do vigor da planta (BRADLEY et al., 2002; BOWMAN; SINCLAIR, 1989).

O cultivo em áreas com histórico da doença é considerada um fator de risco. As infecções geralmente não são uniformemente distribuídas porque a maioria dos inóculos está localizada em reboleiras (HWANG; HOWARD; CHANG, 1996). Do mesmo modo, a distribuição generalizada do inóculo em qualquer campo pode causar surtos de doenças graves, reduzindo os estandes e reduzindo os rendimentos. Koenning e Wrather (2010), avaliaram o impacto de *R. solani* em plântulas de soja nos Estados Unidos, relatando reduções de até 48% nos rendimentos da cultura.

A escassez de cultivares comerciais de soja com altos níveis de resistência e os esforços de criação limitados ou inexistentes direcionados ao desenvolvimento de genótipos resistentes impediram o uso de cultivares de soja resistentes no manejo da podridão de raízes, hipocótilo e *damping off* causados por *Rhizoctonia* na cultura da

soja. Devido a isso, o uso de tratamentos de sementes através de fungicidas é um dos principais manejos adotados. Esses oferecem proteção da semente durante os estágios iniciais de crescimento, sendo um dos métodos mais comuns de gerenciamento dessa e outras doenças (KATARIA; GISI, 1996; DORRANCE et al., 2003). Os tratamentos de sementes não só protegem as sementes germinadas do tombamento de pré-emergência, mas também ajudam a garantir o desenvolvimento de um sistema radicular saudável, acelerando o crescimento e estabelecimento das plantas, tornando-as plantas menos vulneráveis à infecção

O controle biológico no manejo de *R. solani* vem sendo amplamente estudado, apresentando resultados favoráveis, proporcionando o manejo da doença de forma sustentável e menos agressiva ao meio ambiente. Lazzaretti e Bettioli (1997), aplicando produto a partir de *Bacillus subtilis* via tratamento de sementes obtiveram controle semelhante ao fungicida benomyl no controle de *S. sclerotiorum*, *Aspergillus* sp. e *Rhizoctonia solani*.

3.8 *Fusarium solani*

O gênero *Fusarium* foi descrito por Link em 1809, pertence ao grupo dos fungos mitospóricos, correspondente a fase teleomórfica do filo Ascomycota, classe Ascomycetes e ordem Hypocreales (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

O gênero *Fusarium* constitui um grande grupo monofilético de várias espécies. O gênero inclui patógenos de plantas, endofíticos e saprófitas capazes de metabolizar diversos substratos. A análise filogenética molecular deste gênero revelou que compreende pelo menos 20 clados, que se originou no período cretáceo médio há aproximadamente 91,3 milhões de anos (O'DONNELL et al., 2013).

O complexo de espécies *Fusarium solani* (FSSC-*Fusarium solani* species complex) é um grupo que contém pelo menos 60 espécies filogeneticamente distintas (NALIM et al., 2011; O'DONNELL, 2000; O'DONNELL et al., 2008; ZHANG et al., 2006). À medida que os membros da FSSC foram mais estudados como agentes patogênicos das plantas, esses fungos foram subdivididos em *especialidades formais* (F. Sp.) com base na especificidade do hospedeiro.

Os quatro patógenos que causam a síndrome da morte súbita da soja são: *F. virguliforme*, *F. tucumaniae*, *F. brasiliense* e *F. cuneirostrum*, (AOKI; O'DONNELL; SCANDIANI, 2005).

Temperaturas entre 25-28°C, solos compactados e alta umidade favorecem o desenvolvimento do patógeno. Temperaturas superiores a 30°C limitam a expressão da doença e seu desenvolvimento no campo ocorre quando a temperatura acumulada diariamente atinge 850 a 960 graus-dia (SCHERM; YANG, 1996). Neto et al. (2006), relatam que os sintomas são mais proeminentes quando há alta umidade no solo, especialmente nos estádios reprodutivos R4 e R5.

Os exsudatos radiculares podem influenciar a germinação e o crescimento do fungo dentro da rizosfera, sendo os carboidratos e os aminoácidos presentes nos exsudatos radiculares parcialmente responsáveis pela estimulação da germinação dos esporos (SHORT; LACY, 1974). O micélio do fungo juntamente com os conídios, invade o tecido vascular, impedindo assim o movimento da água no xilema. O fungo também pode produzir toxinas que afetam a permeabilidade das membranas celulares interrompendo o metabolismo celular (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996).

O fungo é disseminado pela água, implementos agrícolas, ventos, restos culturais infestados, partículas de solo e sementes contaminadas. As condições favoráveis para a doença são solos úmidos, temperaturas amenas e períodos secos, condições estas que causam estresse na planta ou danos nas raízes, e ainda as condições de solos compactados e ácidos que aumentam a severidade (DIANESE et al., 2010).

Os sintomas incluem raízes com poucas ramificações e baixa nodulação. O lenho adquire coloração externa castanho claro. A raiz principal apresenta coloração avermelhada de formato irregular, que tornam-se marrons e estendem-se até a superfície do solo, causando redução no rendimento e no número de vagens por planta. Os sintomas nas folhas são através de mosqueados cloróticos, clorose internerval, necrose, podendo haver desfolhamento total e morte da planta (MILANESI, 2009; DIANESE et al., 2010). As perdas variam de acordo com o estado fenológico da cultura e exposição ao patógeno. Altas incidências do patógeno nos estádios reprodutivos refletem em menores produtividades, em especial pelo abortamento de flores e vagens (DIANESE et al., 2010).

A doença causa danos principalmente no rendimento de plantas de soja devido à infecção do patógeno no sistema radicular das plantas. Em condições propícias ao desenvolvimento da doença, pode-se atingir um nível elevado de severidade ainda no período de florescimento, e com isso observa-se uma interferência no processo de formação de vagens e formação de grãos. Por outro lado, se a infecção ocorrer de forma lenta ou tardia, atingindo seu máximo no período de enchimento de grãos, é observado redução no número de vagens por planta, número de grãos por vagem e peso de mil grãos (FREITAS; MENEGHETTI; BALARDIN, 2004).

O controle da doença é realizado através da integração de diferentes métodos. O controle químico é realizado através de aplicação de fungicidas via sulco ou tratamento de sementes.

O uso de variedades resistentes é o melhor e mais barato método de controle de doenças. No caso da fusariose inúmeros trabalhos demonstraram diferenças de suscetibilidade entre os genótipos de soja. A resistência das cultivares à doença é parcial, uma vez que, sob alta pressão de inóculo, mesmo os genótipos com maior nível de resistência podem apresentar sintomas típicos da doença (GASPERI; PRESTES; COSTAMILAN, 2003)

Diversos trabalhos apontam decréscimo da incidência e severidade da doença em plantios tardios (HERSHMAN et al., 1990), o que deve estar relacionado com alta umidade e temperaturas baixas do solo nos plantios mais antecipados. Hershman et al. (1990) sugeriram que cultivares de ciclo mais curto desenvolvem sintomas em estágios mais tardios, o que reduz as perdas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no laboratório de fitopatologia aplicada da Universidade Estadual de Ponta Grossa, durante agosto de 2015 a julho de 2017.

4.1 OBTENÇÃO DAS BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS

A coleção de bactérias utilizada, contendo 22 isolados bacterianos, foi isolada de plantas de cacau provenientes de área sem a utilização de fungicidas e cedidos pela Universidade Estadual do Pará, pela Professora Msc. Milena Pupo Raimam.

4.1.1 Isolamento das bactérias endofíticas

Frutos de cacau foram desinfetados superficialmente com etanol 70% e enxaguados com água destilada estéril. Assepticamente as sementes foram coletadas e submetidas à assepsia superficial: etanol 70% por um minuto, solução de hipoclorito de sódio 2,5% por dois minutos, etanol 70% por um minuto e dois enxágues em água destilada estéril. Posteriormente as sementes sofreram cortes transversais com lâmina de bisturi estéril. Fragmentos foram transportados para solução fisiológica estéril (NaCl 0,85%), na proporção de 50 mL de solução fisiológica para cada 10g de sementes, e submetidas a agitação manual a cada 10 minutos por 1 hora (ASSUMPÇÃO et al., 2009). Após este período, alíquotas de 100 µL das suspensões foram plaqueadas em meio de cultivo Ágar Count (AC – 400g de extrato de carne, dextrose 20g e ágar 15g e pH 6,8) suplementado com o fungicida Contrast (carbendazime+flusilazol na concentração de 1 µg/mL) e incubadas a 28°C por até 15 dias. Este procedimento foi realizado em triplicata (ARAÚJO et al., 2002). As colônias isoladas obtidas foram purificadas pelo método de esgotamento em meio de cultivo Ágar Count e posteriormente multiplicadas, sendo preservados em glicerol 40% a -5°C e em óleo mineral.

4.1.2 Identificação das bactérias endofíticas

Foi realizada a identificação a nível molecular da coleção de bactérias apresentada na tabela 1, esta identificação foi procedida pela empresa Wenseq® de Curitiba-PR, sendo a técnica de identificação por análise do gene 16S ribossomal, utilizando os primers universais 27F “AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG” e 1492R “CGG TTA CCT TGT TAC GAC TT”, para obtenção da sequência de pares de base que compõem este gene, em cada bactéria e posteriormente o sequenciamento deste amplicon, utilizando sequenciador automático pelo método Sanger.

Tabela 1 – Classificação das bactérias a nível de gênero, com base no sequenciamento genético do gene 16S ribossomal testadas neste projeto para controle biológico, UEPG, Ponta Grossa, 2017.

Nome teste	Classificação bacteriana				Identificação
	Filo	Classe/Ordem	Família	Gênero	
TCB01	Actinobacteria	Actinomycetales	Microbacteriaceae	<i>Microbacterium</i> *	1240/1254 (99%)
TCB02	Firmicutes	Bacilli	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	1412/1425 (99%)
TCB03	Proteobacteria	Burkholderiales	Alcaligenaceae	<i>Achromobacter</i>	1264/1267 (99%)
TCB04	Firmicutes	Bacilli	Bacillaceae	<i>Lysinibacillus</i>	1281/1284 (99%)
TCB07	Firmicutes	Bacilli	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	666/668 (99%)
TCB08	Firmicutes	Bacilli	Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus</i>	1426/1436 (99%)
TCB09	Actinobacteria	Actinomycetales	Brevibacteriaceae	<i>Brevibacterium</i>	1383/1396 (99%)
TCB10	Firmicutes	Bacilli	Paenibacillaceae	<i>Paenibacillus</i>	1401/1415 (99%)
TCB11	Firmicutes	Bacilli	Bacillaceae	<i>Lysinibacillus</i>	1002/1025 (98%)
TCB12	Firmicutes	Bacilli	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	1411/1416 (99%)
TCB13	Firmicutes	Bacilli	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	1413/1418 (99%)
TCB14	Firmicutes	Bacilli	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	1408/1410 (99%)
TCB15	Firmicutes	Bacilli	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	1414/1422 (99%)
TCB17	Firmicutes	Bacilli	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	700/703 (99%)
TCB18	Firmicutes	Bacilli	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	1407/1426 (99%)
TCB19	Firmicutes	Bacilli	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	1388/1421 (98%)
TCB20	Firmicutes	Bacilli	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	1394/1396 (99%)
TCB21	Actinobacteria	Micrococcales	Micrococcaceae	<i>Sinomonas</i>	751/761 (99%)
TCB22	Actinobacteria	Micrococcales	Micrococcaceae	<i>Micrococcus</i>	1379/1382 (99%)
TCB24	Firmicutes	Bacilli	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	1398/1413 (99%)
TCB25	Firmicutes	Bacilli	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	1339/1352 (99%)
TCB26	Firmicutes	Bacilli	Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus</i>	1412/1419 (99%)

*Classificação encontrada e atestada por Eduardo Balsanelli CRBio 83112/07-D, Wenseq® biotecnologia.

O sequenciamento genético do gene 16S ribossomal para o nível taxonômico de gênero é muito preciso, porém para se conhecer o nível de espécie é necessária a análise de uma diversidade maior de genes. Para efeitos demonstrativos pode-se analisar a sequência obtida do gene 16S ribossomal, com o banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information) para encontrar possíveis espécies como descreve a tabela 2, lembrando que ao analisar-se mais genes pode-se encontrar outra classificação.

Tabela 2 – Classificação das bactérias a nível de espécie, com base no sequenciamento genético do gene 16S ribossomal, segundo a comparação com o banco de dados do NCBI. UEPG, Ponta Grossa, 2017.

(continua)

Nome teste	Gênero	Provável espécie	Identidade (%)	ID sequencial
TCB01	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacterium ginsengisoli</i> strain HKS03	1240/1254(99%)	KT950750.1
TCB02	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus subtilis</i> strain 89	994/1025(97%)	KC465728.1
TCB03	<i>Achromobacter</i>	<i>Achromobacter xylosoxidans</i> strain X01-2	1264/1267(99%)	KC814719.1
TCB04	<i>Lysinibacillus</i>	<i>Lysinibacillus macroides</i> Isolate 47.2	1281/1284(99%)	LT891937.1
TCB07	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain AK9	745/750(99%)	KR154350.1
TCB08	<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus pasteurii</i> strain B-15	1426/1436(99%)	MF417799.1
TCB09	<i>Brevibacterium</i>	<i>Brevibacterium avium</i> strain SS-T4	1383/1396(99%)	KF876886.1
TCB10	<i>Paenibacillus</i>	<i>Paenibacillus jamilae</i> strain NBI	1401/1415(99%)	JX498909.1
TCB11	<i>Lysinibacillus</i>	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> strain CAU9434	441/480(92%)	MF428768.1
TCB12	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus pumilus</i> strain HT-Z45	1411/1416(99%)	KJ526891.1
TCB13	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus cereus</i> strain Xmb051	1413/1418(99%)	KT986177.1
TCB14	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus megaterium</i> strain H39	1408/1410(99%)	LC005453.1
TCB15	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus aryabhattai</i> strain JN2	1414/1422(99%)	KX399855.1
TCB17	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain Y-32-1	827/837(99%)	KT833128.1
TCB18	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus subtilis</i> strain BA-013	1407/1426(99%)	JQ806052.1
TCB19	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus methylotrophicus</i> strain IHB B 7249	1388/1421(98%)	KJ767354.1
TCB20	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus aerius</i> strain FL48	1394/1396(99%)	KY818965.1
TCB21	<i>Sinomonas</i>	<i>Sinomonas atrocyanea</i> strain NSB-27	844/872(97%)	KR010184.1

(conclusão)				
Nome teste	Gênero	Provável espécie	Identidade (%)	ID sequencial
TCB22	<i>Micrococcus</i>	<i>Micrococcus luteus</i> strain SSA-1	1379/1382(99%)	KY486008.1
TCB24	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus cereus</i> strain UFGRB3	1398/1413(99%)	MF526969.1
TCB25	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus megaterium</i> strain H39	1339/1352(99%)	LC005453.1
TCB26	<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> strain G23	1412/1419(99%)	KX343982.1

4.2 OBTENÇÃO DOS MICRORGANISMOS FITOPATOGÊNICOS

Os isolados dos fitopatógenos *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum*, utilizados são provenientes da coleção do Laboratório de Fitopatologia Aplicada (UEPG).

4.3 SELEÇÃO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTAGÔNICO DAS BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS *IN VITRO*

Para a seleção das bactérias potencialmente antagonistas, os 22 isolados bacterianos foram confrontados com os fitopatógenos de solo *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum*, utilizando-se o método de cultivo pareado (MARIANO, 1993). O potencial de antagonismo foi interpretado, mediante a análise de três variáveis: o halo de inibição, a área da colônia e a porcentagem de inibição. O experimento foi repetido uma vez, para consolidar os dados.

4.3.1 Método de cultivo pareado

As células viáveis bacterianas dos isolados a serem testados, foram plaqueadas em duas faixas, espaçadas entre si em 40 mm, em lados opostos de placas de Petri descartáveis de 90x90 mm, sobre meio de cultivo BDA (batata Dextrose ágar), com o auxílio de alças bacteriológicas estéreis descartáveis, como mostra a figura 1. Em seguida, as placas foram incubadas a 25°C por 24 horas, com fotoperíodo de 12h de luz / 12h de escuro. Após o período de incubação foi acrescentado um disco de BDA, de 10 mm de diâmetro contendo micélio do fungo

fitopatogênico, em cada placa de Petri, entre as faixas de bactérias de maneira que fiquem equidistantes das bactérias crescidas (figura 1). As placas controle foram constituídas do disco de micélio na ausência de bactérias endofíticas. As placas foram novamente incubadas nas mesmas condições que já se encontravam (MARIANO, 1993).

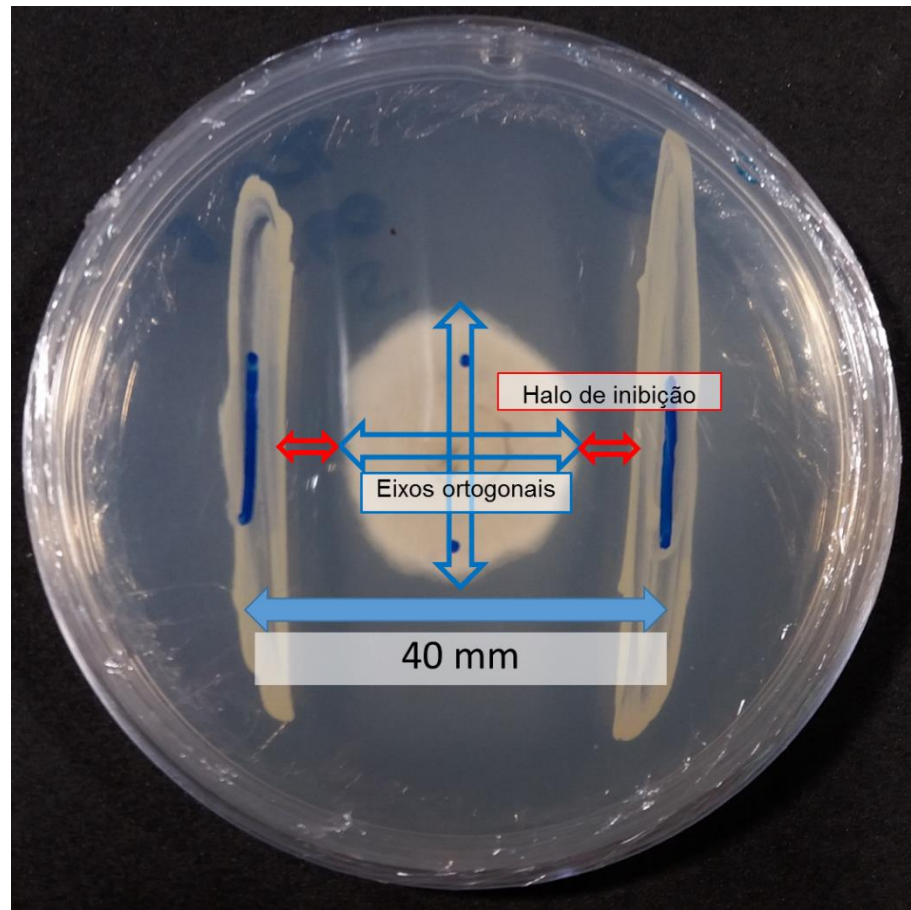


Figura 1 – Exemplificação do pareamento de bactérias endofíticas com fitopatógenos, UEPG, Ponta Grossa, 2017.

4.3.2 Avaliação do potencial de antagonismo

O potencial de antagonismo foi interpretado, mediante a análise de três variáveis: o halo de inibição, a área da colônia e a porcentagem de inibição.

4.3.3 Halo de inibição

O Halo de inibição foi obtido a partir da medição realizada a cada 24 horas da distância entre as bordas do crescimento bacteriano e a distância das bordas do crescimento do patógeno de uma extremidade a outra, até o crescimento do patógeno atingir a placa toda no tratamento controle. Quando o crescimento do patógeno ultrapassou o crescimento bacteriano foi atribuído o valor zero, pois não havia halo de inibição. Os resultados foram expressos em milímetros (mm).

4.3.4 Área da colônia

A área da colônia foi obtida com a medição do crescimento radial da colônia em dois eixos ortogonais (figura 1), foi calculado a média entre essas duas medidas e assumiu-se essa média como o raio (r) para o cálculo da área, pela fórmula da área do círculo, ou seja, a área do crescimento do patógeno é igual a $2 \cdot \pi \cdot r^2$. A medição dos eixos ortogonais de cada placa de Petri foi a cada 24 horas e finalizadas quando o crescimento do fungo atingiu a placa toda no tratamento controle. Os resultados foram expressos em milímetros quadrados (mm²).

4.3.5 Porcentagem de inibição

A porcentagem de inibição foi obtida através da relação entre a área do crescimento micelial do patógeno na presença de cada uma das bactérias endofíticas, e a área ocupada pelo crescimento do patógeno no tratamento controle sem a presença da bactéria. Com esses valores foi calculada a porcentagem de inibição (%In), sendo esta resultante da aplicação da seguinte fórmula:

$$\% \text{ In} = \frac{\text{AT(mm)} \cdot 100}{\text{AC (mm)}} - 100$$

Onde:

AT = Área do tratamento (mm);

AC = Área do controle (mm);

4.3.6 Delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente aleatorizado com 23 tratamentos e 10 repetições para cada bactéria endofítica, considerando-se cada placa de Petri uma repetição.

Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância, e quando significativa as médias foram submetidas a comparação pelo teste de Scott-Knott a 1% de probabilidade, com auxílio do software estatístico SASM-Agri (CANTERI et al., 2001). Os dados de porcentagem de inibição foram transformados em $\arcsen \sqrt{(x/100)}$ e os dados de halo de inibição devido a quantidade de valores iguais a zero foram transformados em $\sqrt{(x+k)}$, sendo $k=1$ (GOMES, 1984).

4.4 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTAGÔNICO DAS BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS *IN VIVO*

O experimento foi realizado em casa de vegetação na Universidade Estadual de Ponta Grossa, durante o mês de julho de 2017.

Para a avaliação do potencial antagônico *in vivo*, foi realizado o tratamento de sementes com 5 isolados bacterianos: TCB 02 (*Bacillus*), TCB 08 (*Staphylococcus*), TCB 10 (*Paenibacillus*), TCB 13 (*Bacillus*) e TCB 18 (*Bacillus*), selecionados a partir dos resultados obtidos na análise de potencial antagônico *in vitro*.

Os tratamentos foram divididos em sementes artificialmente inoculadas com os patógenos, e sementes sem a inoculação dos patógenos. Os tratamentos com as sementes inoculadas foram: um tratamento controle (sem tratamento com bactérias endofíticas); um tratamento com fungicida; e cinco tratamentos com bactérias endofíticas, sendo cada tratamento um dos cinco isolados bacterianos selecionados. As sementes sem a inoculação artificial foram tratadas da mesma forma: um tratamento controle (sem tratamento com bactérias endofíticas); um tratamento com fungicida; e cinco tratamentos com bactérias endofíticas, sendo cada tratamento um dos cinco isolados bacterianos selecionados.

Foram avaliados as seguintes variáveis: emergência, altura de plantas, plantas anormais, severidade de doença, volume de raízes, massa fresca de raízes, massa fresca da parte aérea, massa fresca da planta inteira, massa seca de raiz, massa seca da parte aérea e massa seca da planta inteira.

4.4.1 Obtenção das colônias dos patógenos

As colônias dos patógenos utilizados foram obtidos de isolados dos fungos *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* e *Fusarium solani*, da coleção do laboratório de Fitopatologia Aplicada da Universidade Estadual de Ponta Grossa. Os isolados de *Sclerotinia sclerotiorum* (CMM-1570), *Rhizoctonia solani* (CMM-1572) e *Fusarium solani* (CMM-1573) estão catalogados na coleção de culturas de fungos fitopatogênicos da Universidade Federal Rural de Pernambuco que é depositária internacional.

Os isolados conservados em placas de Petri em meio BDA e armazenadas em geladeira foram multiplicados em meio de cultivo BDA, e incubadas em germinadoras do tipo BOD a 25°C. Após o crescimento dos patógenos eles foram novamente multiplicados em meio BDA. O período de crescimento para o pareamento com as bactérias endofíticas foi de 3 dias para *Sclerotinia sclerotiorum* e *Rhizoctonia solani*, e de 7 dias para *Fusarium solani*, considerando o tempo necessário para os patógenos colonizarem a placa toda.

4.4.2 Obtenção da suspensão bacteriana

As suspensões bacterianas que foram utilizadas para tratar as sementes foram obtidas pelo crescimento de cada bactéria separadamente em meio líquido Luria-Bertani, por 24 horas sob agitador mecânico a 70 rpm, em temperatura controlada de 25°C, e fotoperíodo de 12 horas; posteriormente foi realizada a contagem de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) da suspensão bacteriana pelo método da microgota (ROMEIRO, 2013b).

4.4.3 Inoculação das sementes de soja

O procedimento de inoculação das sementes com os patógenos deu-se da seguinte forma: as sementes foram colocadas em placas de Petri, com meio de cultivo BDA contendo os patógenos *S. sclerotirum*, *R. solani* e *F. solani* crescidos até a borda das placas (vide item 4.4.1), na proporção de 40 gramas de sementes em cada

placa, estas foram vedadas com filme plástico e incubadas em germinadora do tipo BOD a 25°C por 24 horas. Após o período de incubação as sementes foram tratadas com as bactérias endofíticas.

4.4.4 Tratamento das sementes

O tratamento das sementes foi realizado utilizando a dosagem de 1 L de suspensão bacteriana para 100 Kg de sementes, em vista de ser uma dose padrão para um bom recobrimento da semente. Utilizou-se sementes da cultivar de soja NS 5959, com germinação de 97,75% e livres dos patógenos testados, conforme teste de patologia de sementes e germinação, realizados segundo as regras de análise de sementes (BRASIL, 2009). Posteriormente foi realizado o tratamento de uma amostra de 40 gramas de sementes, sendo a suspensão bacteriana espalhada sobre a superfície das sementes, com o auxílio de ponteiros descartáveis em placas de Petri.

Tabela 3 – Descrição dos tratamentos utilizados em cada experimento *in vivo*, UEPG, Ponta Grossa, 2017.

Tratamento		Concentração da suspensão Bacteriana (UFC/mL)	Ingrediente ativo (% de i. a. no produto comercial)
com inoculação	TCB 02	$2,5 \times 10^6$	-
	TCB 08	1×10^5	-
	TCB 10	$4,75 \times 10^5$	-
	TCB 13	$1,5 \times 10^6$	-
	TCB 18	2×10^6	-
	Controle	-	-
	Standak Top	-	piraclostrobina (2,5%) + tiofanato metílico (22,5%) + fipronil (25%)
sem inoculação	TCB 02	$2,5 \times 10^6$	-
	TCB 08	1×10^5	-
	TCB 10	$4,75 \times 10^5$	-
	TCB 13	$1,5 \times 10^6$	-
	TCB 18	2×10^6	-
	Controle	-	-
	Standak Top	-	piraclostrobina (2,5%) + tiofanato metílico (22,5%) + fipronil (25%)

Foram três experimentos conduzidos separadamente, um para cada patógeno, tendo cada experimento um tratamento controle com sementes sadias e com sementes inoculadas; um tratamento com fungicida aplicado em sementes sadias e inoculadas; e também os tratamentos com cada bactéria endofítica separadamente

aplicadas em uma amostra de sementes sadias e sementes inoculadas, obtendo-se os tratamentos descritos na tabela 3.

4.4.5 Procedimento de semeadura

As sementes logo após o tratamento foram semeadas em bandejas plásticas para produção de mudas com 32 células e capacidade de 6 L, preenchidas com substrato comercial esterilizado para produção de mudas. Foram semeadas 32 sementes por bandeja, uma em cada célula, e cada bandeja foi considerada uma repetição; foram realizadas 4 repetições, totalizando 128 sementes por tratamento. As bandejas foram alocadas em casa de vegetação com temperatura média de 20°C, por 21 dias.

4.4.6 Avaliação de emergência

Após a semeadura realizou-se a contagem de todas as plantas emergidas a cada 7 dias, até a avaliação dos 21 dias. Efetuou-se o cálculo de emergência de plantas considerando 32 plântulas por bandeja, com 4 repetições. Os resultados foram expressos em porcentagem (%).

4.4.7 Avaliação de altura de plantas

A cada 7 dias após a semeadura realizou-se a medição da distância entre a superfície do substrato ao ápice da planta, com auxílio de uma régua. Os resultados foram obtidos pela média de todas as plantas emergidas em cada bandeja, com 4 repetições. Os resultados foram expressos em centímetros (cm).

4.4.8 Avaliação de plantas anormais

Foram consideradas anormais as plantas que apresentavam qualquer dano no caule, nos cotilédones ou deformações, as avaliações foram realizadas a cada 7 dias a partir da semeadura. Os resultados foram obtidos da porcentagem de plantas anormais em cada bandeja, com 4 repetições.

4.4.9 Avaliação de severidade

Com 21 dias as plantas foram retiradas das bandejas, essas foram lavadas em água corrente para a retirada dos resíduos de substrato. Para a estimativa da severidade avaliou-se a porcentagem de tecido infectado pelo patógeno inoculado em relação ao tecido sadio em todas as plantas. Os resultados obtidos foram a média de severidade de todas as plantas em cada bandeja, expressos em porcentagem, com 4 repetições.

4.4.10 Avaliação do volume de raízes

Com 21 dias as plantas retiradas das bandejas e lavadas, após a avaliação de severidade foram cortadas na região do colo separando as raízes da parte aérea. Em seguida procedeu-se a imersão do conjunto de todas as raízes de cada bandeja em uma proveta com volume conhecido de água, obtendo-se o volume de raízes produzido. Os resultados foram obtidos pela média do volume de raízes de cada bandeja, com 4 repetições e expresso em mililitros.

4.4.11 Pesagem da massa fresca e massa seca

Com 21 dias as plantas retiradas das bandejas e lavadas, após a avaliação de severidade, foram cortadas na região do colo separando a parte aérea e as raízes; essas duas partes foram pesadas separadamente em balança digital, com precisão de 0,001 gramas para obtenção da massa fresca de cada parte, os resultados foram a média da massa fresca de todas as plantas da bandeja, com 4 repetições e expresso em gramas.

Após a pesagem da massa fresca, as plantas foram alocadas em estufa de secagem à temperatura de 67°C, até a obtenção do peso constante, e após foram pesadas em balança digital com precisão de 0,001 gramas, para obtenção da massa

seca de cada parte. Os resultados foram a média da massa seca de cada parte, com 4 repetições, expresso em gramas (g).

4.4.12 Delineamento experimental

O delineamento experimental foi inteiramente aleatorizado, constituído de 12 tratamentos, com 4 repetições sendo cada bandeja uma repetição.

Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância, e quando significativa as médias foram submetidas a comparação pelo teste de Scott-Knott a 1% de probabilidade com auxílio do software estatístico SASM-Agri (CANTERI et al., 2001). Os dados que são representados em porcentagem (emergência, severidade e plantas anormais) foram transformados em $\arcsen \sqrt{(x/100)}$ (GOMES, 1984).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados foram organizados em 3 tópicos: primeiro experimento *in vitro*, segundo experimento *in vitro* (repetição do primeiro) e experimento *in vivo*.

Devido ao grande número de isolados bacterianos avaliados, número de variáveis analisadas e o número de avaliações para cada variável, obteve-se grande quantidade de resultados, todos esse são apresentados nas tabelas de resultados. As discussões porém concentram-se nos tratamentos com melhores resultados e sempre na última avaliação, que é a mais expressiva.

5.1 PRIMEIRO EXPERIMENTO *IN VITRO*

Para o primeiro experimento podemos observar na tabela 4, os resultados obtidos para a variável halo de inibição promovido pelas bactérias endofíticas sobre o crescimento de *Fusarium solani*, onde o isolado bacteriano TCB 10 foi o que apresentou a maior atividade de inibição, com 3,65 mm de halo de inibição, após o período de 144 horas, que foi a última avaliação, quando o tratamento controle colonizou a placa toda.

Segundo a classificação do gene 16S ribossomal temos que o isolado TCB 10 é do gênero *Paenibacillus* e segundo Herrera et al. (2016), avaliando cepas de *Paenibacillus* spp., obtidos de sementes de trigo, observaram que determinados isolados foram capazes de inibir o crescimento de *F. graminearum* em sementes de trigo *in vitro*, devido os mesmos conseguirem formar grande quantidade de biofilme. A produção de biofilme é geralmente considerada como um mecanismo de proteção de plantas contra bactérias patogênicas, uma vez que estabelecido em raízes de plantas esses biofilmes microbianos podem atuar como barreiras físicas e químicas. Do mesmo modo, estas bactérias também podem limitar a liberação de exsudatos radiculares evitando o crescimento de patógenos (HAGGAG, 2010).

Os isolados bacterianos TCB 13 (0,75 mm) e TCB 24 (0,45 mm), também diferiram do tratamento controle, apresentando halo inibição para o patógeno *F. solani*, mas em menor proporção que o isolado bacteriano TCB 10 (3,65 mm).

Tabela 4 – Halo de inibição promovido por bactérias endofíticas sobre o fungo *Fusarium solani*, no primeiro experimento realizado, UEPG, Ponta Grossa, 2017.

Isolado bacteriano	Halo de inibição (mm)					
	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h
TCB 01	11,90 a*	5,10 b	0,70 c	0,00 d	0,00 d	0,00 c
TCB 02	6,30 c	0,80 e	0,10 d	0,00 d	0,00 d	0,00 c
TCB 03	12,75 a	7,15 a	1,25 c	0,00 d	0,00 d	0,00 c
TCB 04	10,20 b	3,75 c	0,65 c	0,05 d	0,00 d	0,00 c
TCB 07	10,50 b	2,95 d	0,10 d	0,00 d	0,00 d	0,00 c
TCB 08	9,80 b	5,80 b	3,90 b	0,80 c	0,00 d	0,00 c
TCB 09	9,30 b	1,25 e	0,00 d	0,00 d	0,00 d	0,00 c
TCB 10	8,75 b	7,25 a	6,25 a	5,35 a	5,05 a	3,65 a
TCB 11	9,95 b	3,90 c	0,10 d	0,00 d	0,00 d	0,00 c
TCB 12	9,40 b	2,40 d	0,05 d	0,00 d	0,00 d	0,00 c
TCB 13	9,80 b	5,20 b	4,70 b	1,85 b	1,05 b	0,75 b
TCB 14	10,95 a	4,95 b	1,20 c	0,00 d	0,00 d	0,00 c
TCB 15	9,90 b	3,90 c	0,25 d	0,00 d	0,00 d	0,00 c
TCB 17	6,65 c	0,50 f	0,20 d	0,00 d	0,00 d	0,00 c
TCB 18	4,10 d	0,00 f	0,10 d	0,00 d	0,00 d	0,00 c
TCB 19	4,65 d	0,20 f	0,55 c	0,00 d	0,00 d	0,00 c
TCB 20	11,25 a	4,75 b	0,60 c	0,00 d	0,00 d	0,00 c
TCB 21	10,55 b	3,40 c	0,35 d	0,00 d	0,00 d	0,00 c
TCB 22	10,40 b	3,75 c	0,00 d	0,00 d	0,00 d	0,00 c
TCB 24	9,40 b	4,50 b	3,95 b	1,95 b	0,70 c	0,45 b
TCB 25	11,30 a	3,80 c	0,75 c	0,00 d	0,00 d	0,00 c
TCB 26	10,50 b	4,55 b	0,40 d	0,00 d	0,00 d	0,00 c
Controle (<i>Fusarium solani</i>)	0,00 e	0,00 f	0,00 d	0,00 d	0,00 d	0,00 c
C.V. (%)	5,92	12,40	16,96	12,90	10,53	14,05

*Médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 1% de probabilidade, dados transformados em $\sqrt{x + k}$, sendo k=1.

Os dados apresentados na tabela 5, para a variável área da colônia fúngica, mostram que o isolado bacteriano TCB 10 foi o que apresentou menor área de crescimento de *Fusarium solani* (3.366 mm²), resultado que corrobora com os obtidos por Naing et al., (2015) que avaliou *in vitro* uma estirpe de *Paenibacillus ehimensis*, onde essa produziu compostos orgânicos extracelulares que inibiram *F. oxysporum* f. Sp., demonstrando alta capacidade de antibiose, promovido pelo gênero *Paenibacillus*. Segundo o teste de médias realizado, o isolado bacteriano TCB 08 (*Staphylococcus*) também promoveu uma grande redução do crescimento fúngico (9.203 mm²), sendo a segunda classe de médias. Os isolados bacterianos TCB 13 e TCB 24 (*Bacillus*) proporcionaram redução do crescimento fúngico, sendo a terceira classe de médias com maior potencial de antagonismo.

Os demais isolados bacterianos TCB 02, TCB 04, TCB 11, TCB 14, TCB 15, TCB 17, TCB 18, TCB 19, TCB 20, TCB 25 e TCB 26, diferiram do tratamento controle, demonstrando potencial de antagonismo, como mostra a tabela 5.

Tabela 5 – Área da colônia fúngica de *Fusarium solani*, no primeiro experimento realizado, UEPG, Ponta Grossa, 2017.

Isolado bacteriano	Área da colônia (mm ²)					
	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h
TCB 01	706,86 Ns**	2.598 c*	5.234 a	10.715 a	17.146 b	22.167 a
TCB 02	706,86	2.481 c	3.925 c	7.423 c	11.524 e	15.325 e
TCB 03	706,86	2.201 d	4.955 a	9.640 b	14.832 c	22.167 a
TCB 04	706,86	2.601 c	4.517 b	6.706 d	9.684 f	12.680 g
TCB 07	706,86	2.895 b	5.194 a	11.312 a	18.077 a	22.167 a
TCB 08	706,86	1.923 e	2.849 e	4.443 e	6.477 h	9.203 i
TCB 09	706,86	3.226 a	5.083 a	10.346 a	16.847 b	22.167 a
TCB 10	706,86	1.624 e	2.201 f	2.575 f	2.903 i	3.366 j
TCB 11	706,86	2.320 d	4.468 b	7.084 c	11.641 e	16.298 d
TCB 12	706,86	2.724 c	4.771 a	9.696 b	15.850 c	21.364 a
TCB 13	706,86	2.169 d	3.247 d	5.923 d	8.056 g	10.122 h
TCB 14	706,86	2.563 c	4.214 b	8.052 c	12.783 d	17.176 c
TCB 15	706,86	2.362 d	4.844 a	9.262 b	13.770 d	17.897 c
TCB 17	706,86	2.573 c	4.212 b	7.830 c	12.164 e	17.099 c
TCB 18	706,86	2.156 d	3.650 c	6.742 d	10.113 f	13.762 f
TCB 19	706,86	2.025 d	3.388 d	6.347 d	9.675 f	12.438 g
TCB 20	706,86	2.493 c	4.945 a	7.243 c	12.116 e	16.572 d
TCB 21	706,86	2.841 b	4.905 a	8.931 b	15.143 c	22.167 a
TCB 22	706,86	2.588 c	4.982 a	10.339 a	16.179 b	22.167 a
TCB 24	706,86	2.450 c	3.507 d	5.780 d	8.267 g	10.397 h
TCB 25	706,86	2.965 b	5.015 a	7.842 c	12.533 e	17.605 c
TCB 26	706,86	2.482 c	4.735 a	9.261 b	14.669 c	19.647 b
Controle (<i>Fusarium solani</i>)	706,86	3.226 a	5.083 a	10.346 a	16.847 b	22.167 a
C.V. (%)	-	10,61	9,40	10,08	8,80	5,12

* Ns (dados não significativos entre si pelo teste Scott-Knott a 1% de probabilidade).

**Médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 1% de probabilidade, dados não transformados.

A maior porcentagem de inibição de crescimento micelial de *Fusarium solani*, foi de 84,82%, obtida pelo isolado bacteriano TCB 10 (tabela 6), provavelmente devido a alta capacidade de antibiose; o isolado bacteriano TCB 08 obteve a segunda maior porcentagem de inibição, seguido dos isolados bacterianos TCB 13 e TCB 24 que são do gênero *Bacillus* e obtiveram 54,36% e 53,09% de inibição respectivamente, mostrando-se eficientes na inibição do crescimento de *F. solani*, estes resultados condizem com os resultados de Narasimhan e Shivakumar (2012), que relatam 42% de inibição de *F. solani* por isolados de *Bacillus subtilis*, obtidos da rizosfera.

Os isolados bacterianos TCB 02, TCB 04, TCB 11, TCB 14, TCB 15, TCB 17, TCB 18, TCB 19, TCB 20 TCB 25 e TCB26 (tabela 6), também se mostraram eficientes, diferindo estatisticamente do tratamento controle, porém mostram-se menos eficientes que os isolados já citados. Os valores negativos expressos na tabela 6 e nas demais tabelas que apresentam resultados de porcentagem de inibição,

ocorrem quando o crescimento do patógeno na presença da bactéria endofítica foi superior ao seu crescimento no tratamento controle (meio de cultivo BDA, sem a presença de bactérias endofíticas).

Tabela 6 – Porcentagem de inibição promovido por bactérias endofíticas sobre o fungo *Fusarium solani*, no primeiro experimento realizado, UEPG, Ponta Grossa, 2017.

Isolado bacteriano	Porcentagem de inibição (%)					
	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h
TCB 01	0,00 Ns*	19,46 c**	-2,94 f	-3,55 f	-1,77 h	0,00 j
TCB 02	0,00	23,07 c	22,79 d	28,26 d	31,61 e	30,87 f
TCB 03	0,00	31,76 b	2,53 f	6,82 e	11,94 g	0,00 j
TCB 04	0,00	19,35 c	11,16 e	35,14 c	42,51 d	42,79 d
TCB 07	0,00	10,23 d	-2,19 f	-9,32 f	-7,29 i	0,00 j
TCB 08	0,00	40,37 a	43,94 b	57,05 b	61,54 b	58,46 b
TCB 09	0,00	-0,02 e	0,01 f	0,02 f	0,00 h	0,00 j
TCB 10	0,00	49,68 a	56,70 a	75,13 a	82,77 a	84,82 a
TCB 11	0,00	28,08 b	12,11 e	31,51 d	30,89 e	26,47 g
TCB 12	0,00	15,53 c	6,16 f	6,29 e	5,92 g	3,63 j
TCB 13	0,00	32,75 b	36,13 c	42,73 c	52,16 c	54,36 c
TCB 14	0,00	20,54 c	17,12 e	22,18 d	24,11 f	22,52 h
TCB 15	0,00	26,78 b	4,72 f	10,48 e	18,26 f	19,27 h
TCB 17	0,00	20,22 c	17,16 e	24,32 d	27,79 e	22,86 h
TCB 18	0,00	33,15 b	28,19 d	34,82 c	39,99 d	37,93 e
TCB 19	0,00	37,23 b	33,36 c	38,64 c	42,56 d	43,88 d
TCB 20	0,00	22,71 c	2,74 f	29,99 d	28,09 e	25,24 g
TCB 21	0,00	11,91 d	3,51 f	13,67 e	10,11 g	0,00 j
TCB 22	0,00	19,76 c	2,01 f	0,06 f	3,96 h	0,00 j
TCB 24	0,00	24,02 c	31,00 c	44,13 c	50,93 c	53,09 c
TCB 25	0,00	8,08 d	1,33 f	24,21 d	25,61 e	20,56 h
TCB 26	0,00	23,05 c	6,87 f	10,50 e	12,91 g	11,38 i
Controle (<i>Fusarium solani</i>)	0,00	0,00 e	0,00 f	0,00 f	0,00 h	0,00 j
C.V. (%)	-	36,50	55,26	34,24	25,24	15,98

* Ns (dados não significativos entre si pelo teste Scott-Knott a 1% de probabilidade).

**Médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 1% de probabilidade, dados não transformados.

Para *Rhizoctonia solani*, o maior halo de inibição foi obtido pelo isolado bacteriano TCB 10 (tabela 7), o qual foi altamente eficaz na antibiose de *Rhizoctonia solani* assim como relatado por Weselowski et al. (2016), que também relataram uma alta atividade antagonista promovida por *Paenibacillus* sobre *R. solani*, ressaltaram ainda estes autores que o crescimento desta bactéria é muito rápido.

O isolado bacteriano TCB 08 (*Staphylococcus*) também apresentou halo de inibição. Os demais isolados não formaram halo de inibição para o patógeno *Rhizoctonia solani*.

Tabela 7 – Halo de inibição promovido por bactérias endofíticas sobre o fungo *Rhizoctonia solani*, no primeiro experimento realizado, UEPG, Ponta Grossa, 2017.

Isolado bacteriano	Halo de inibição (mm)		
	24 h	48 h	72 h
TCB 01	0,10 d	0,00 e	0,00 c
TCB 02	0,00 d	0,00 e	0,00 c
TCB 03	2,05 b	0,00 e	0,00 c
TCB 04	0,40 d	0,00 e	0,00 c
TCB 07	0,35 d	0,00 e	0,00 c
TCB 08	5,85 a	4,20 b	0,70 b
TCB 09	0,00 d	0,00 e	0,00 c
TCB 10	6,45 a	6,35 a	6,25 a
TCB 11	1,35 c	0,00 e	0,00 c
TCB 12	0,05 d	0,00 e	0,00 c
TCB 13	0,75 c	0,00 e	0,00 c
TCB 14	0,40 d	0,00 e	0,00 c
TCB 15	0,75 c	0,70 d	0,00 c
TCB 17	0,00 d	0,00 e	0,00 c
TCB 18	0,00 d	0,00 e	0,00 c
TCB 19	0,00 d	0,00 e	0,00 c
TCB 20	0,75 c	0,00 e	0,00 c
TCB 21	0,00 d	0,00 e	0,00 c
TCB 22	0,00 d	0,00 e	0,00 c
TCB 24	2,25 b	1,60 c	0,10 c
TCB 25	0,00 d	0,00 e	0,00 c
TCB 26	2,40 b	0,00 e	0,00 c
Controle (<i>Rhizoctonia solani</i>)	0,00 d	0,00 e	0,00 c
C.V. (%)	17,04	8,22	6,72

*Médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 1% de probabilidade, dados transformados em $\sqrt{x + k}$, sendo $k=1$.

Com relação a área da colônia de *Rhizoctonia solani* (tabela 8) pode-se observar que o isolado bacteriano TCB 08 (*Staphylococcus*) apresentou a maior redução da área da colônia fúngica, tendo sido mais eficaz na redução do crescimento do patógeno que o isolado bacteriano TCB 10, que apresentou maior halo de inibição (tabela 7).

Os isolados bacterianos TCB 02, TCB 03, TCB 04, TCB 11, TCB 12, TCB 15, TCB 18, TCB 19, TCB 20, TCB 24, TCB 25 e TCB 26, diferiram do tratamento controle, proporcionando redução do crescimento do patógeno.

Tabela 8 – Área da colônia fúngica de *Rhizoctonia solani*, no primeiro experimento realizado, UEPG, Ponta Grossa, 2017.

(continua)

Isolado bacteriano	Área da colônia (mm ²)		
	24 h	48 h	72 h
TCB 01	4.376 c	13.886 d	22.698 a
TCB 02	4.641 c	11.710 e	19.627 b
TCB 03	2.764 g	7.361 h	18.781 b

(conclusão)

Isolado bacteriano	Área da colônia (mm ²)		
	24 h	48 h	72 h
TCB 04	3.698 e	9.484 f	16.998 c
TCB 07	4.474 c	11.861 e	21.290 a
TCB 08	1.395 h	2.342 i	3.888 f
TCB 09	4.709 c	15.817 c	22.698 a
TCB 10	2.613 g	6.556 h	8.693 e
TCB 11	3.616 e	8.566 g	16.006 c
TCB 12	4.220 d	9.909 f	16.640 c
TCB 13	3.816 e	11.131 e	22.698 a
TCB 14	4.192 d	12.853 d	22.698 a
TCB 15	3.621 e	7.890 g	15.026 d
TCB 17	4.196 d	11.617 e	22.698 a
TCB 18	2.811 g	7.768 g	17.515 c
TCB 19	4.168 d	9.746 f	17.781 c
TCB 20	3.233 f	8.054 g	16.096 c
TCB 21	5.184 b	17.251 b	22.698 a
TCB 22	7.302 a	20.106 a	22.698 a
TCB 24	2.881 g	6.525 h	10.515 d
TCB 25	4.891 b	14.090 d	22.698 a
TCB 26	3.331 f	8.532 g	18.609 b
Controle (<i>Rhizoctonia solani</i>)	7.302 a	20.106 a	22.698 a
C.V. (%)	10,73	12,19	7,94

*Médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 1% de probabilidade, dados não transformados.

Pode-se observar na tabela 9 que o isolado bacteriano TCB 08 foi o que apresentou maior porcentagem de inibição (82,87%) para *Rhizoctonia solani*, este efeito de inibição pode ter sido expresso mais intensamente devido a velocidade de crescimento do patógeno que ocupou a placa toda em 72 horas, sendo mais capaz de inibir o crescimento de *R. solani* que de *F. solani*. O isolado bacteriano TCB 08 é do gênero *Staphylococcus* e algumas espécies de *Staphylococcus* são capazes de produzir quitosanases e quitinases, enzimas envolvidas na inibição da síntese de componentes da parede celular, lipídios de membrana e proteínas presentes em fungos, sendo o extrato da lise de *Staphylococcus* capaz de promover o controle de *Magnaporthe oryzae* em arroz, sob condições de campo, devido a deformação de hifas (YU et al., 2013)

O isolado bacteriano TCB 10 também foi capaz de inibir consideravelmente o crescimento de *R. solani* obtendo 61,74% de inibição, seguido pelo isolado bacteriano TCB 24 que apresentou 53,54% de inibição. Os demais isolados apresentaram menos de 50% de inibição, diferenciando estatisticamente do tratamento controle os isolados TCB 02, TCB 03, TCB 04, TCB 11, TCB 12, TCB 15, TCB 18, TCB 19, TCB 20, TCB 24 e TCB 26, os resultados de inibição destes encontram-se na tabela 9.

Tabela 9 – Porcentagem de inibição promovido por bactérias endofíticas sobre o fungo *Rhizoctonia solani*, no primeiro experimento realizado, UEPG, Ponta Grossa, 2017.

Isolado bacteriano	Porcentagem de inibição (%)		
	24 h	48 h	72 h
TCB 01	40,07 f	30,94 f	0,00 g
TCB 02	36,46 f	41,78 e	13,53 f
TCB 03	62,16 b	63,38 b	17,27 f
TCB 04	49,35 d	52,82 d	25,10 d
TCB 07	38,74 f	41,00 e	6,21 g
TCB 08	80,91 a	88,36 a	82,87 a
TCB 09	35,54 f	21,33 g	0,00 g
TCB 10	64,23 b	67,39 b	61,74 b
TCB 11	50,47 d	57,41 c	29,47 d
TCB 12	42,23 e	50,71 d	26,67 d
TCB 13	47,74 d	44,64 e	0,00 g
TCB 14	42,59 e	36,07 f	0,00 g
TCB 15	50,42 d	60,76 c	33,80 d
TCB 17	42,56 e	42,26 e	0,00 g
TCB 18	61,50 b	61,34 c	22,83 e
TCB 19	42,92 e	51,51 d	21,64 e
TCB 20	55,73 c	59,95 c	29,06 d
TCB 21	29,03 g	14,21 h	0,00 g
TCB 22	-0,02 h	0,00 i	0,00 g
TCB 24	60,57 b	67,56 b	53,64 c
TCB 25	33,03 g	29,93 f	0,00 g
TCB 26	54,39 c	57,55 c	18,00 f
Controle (<i>Rhizoctonia solani</i>)	0,00 h	0,00 i	0,00 g
C.V. (%)	13,45	14,75	32,89

*Médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 1% de probabilidade, dados não transformados.

Na tabela 10 pode-se observar para *Sclerotinia sclerotiorum* que os os maiores halos de inibição foram encontrados pelos isolados bacterianos TCB 10 (6,85 mm), TCB 11 (6,40 mm), TCB 17 (7,75 mm) e TCB 18 (6,95 mm) respectivamente, sendo estes isolados os que apresentaram maior potencial antagônico para *S. sclerotiorum*. Esses resultados também foram encontrados em um estudo realizado por Liu et al. (2008), onde isolados de *Bacillus* spp. e *Paenibacillus* spp. inibiram o crescimento micelial de diversos fitopatógenos como por exemplo *S. sclerotiorum*, *R. solani*, *F. oxysporum* e *F. graminearum*, alcançando uma porcentagem de inibição de até 60%.

Os isolados TCB 02, TCB 08, TCB 12, TCB 19 e TCB 20 diferiram estatisticamente do controle, mas foram inferiores aos isolados TCB 10, TCB 11, TCB 17 e TCB 18, como mostra a tabela 10.

Tabela 10 – Halo de inibição promovido por bactérias endofíticas sobre o fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, no primeiro experimento realizado, UEPG, Ponta Grossa, 2017.

Isolado bacteriano	halo de inibição (mm)		
	24 h	48 h	72 h
TCB 01	8,15 b	5,35 b	0,00 e
TCB 02	8,35 b	4,90 b	2,55 c
TCB 03	5,65 d	0,35 d	0,00 e
TCB 04	2,35 f	0,00 d	0,00 e
TCB 07	10,95 a	2,10 c	0,00 e
TCB 08	10,35 a	7,20 a	4,60 b
TCB 09	7,00 c	1,10 d	0,00 e
TCB 10	8,05 b	7,40 a	6,85 a
TCB 11	9,10 b	7,55 a	6,40 a
TCB 12	7,05 c	2,30 c	1,70 d
TCB 13	8,00 b	0,85 d	0,00 e
TCB 14	1,50 f	0,00 d	0,00 e
TCB 15	0,60 g	0,00 d	0,00 e
TCB 17	7,85 b	7,75 a	7,75 a
TCB 18	7,00 c	7,00 a	6,95 a
TCB 19	6,90 c	5,30 b	5,40 b
TCB 20	11,50 a	7,85 a	1,90 d
TCB 21	4,45 d	0,00 d	0,00 e
TCB 22	0,70 g	0,00 d	0,00 e
TCB 24	9,50 b	2,60 c	0,00 e
TCB 25	8,65 b	4,05 b	0,00 e
TCB 26	3,60 e	0,00 d	0,00 e
Controle (<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>)	0,00 g	0,00 d	0,00 e
C.V. (%)	14,63	24,01	15,45

*Médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 1% de probabilidade, dados transformados em $\sqrt{x + k}$, sendo $k=1$.

Com relação a área da colônia fúngica de *Sclerotinia sclerotiorum* (tabela 11), pode-se observar grande redução da área de crescimento de *S. sclerotiorum* pelos isolados bacterianos TCB 02 (2.947 mm²), TCB 08 (2.604 mm²), TCB 10 (3.313 mm²), TCB 11 (1.772 mm²), TCB 17 (722 mm²), TCB 18 (342 mm²), TCB 19 (2.707 mm²) e TCB 20 (3.876 mm²), sendo os isolados TCB 02, TCB 17, TCB18, TCB 19 e TCB 20 do gênero *Bacillus*, tem-se similaridade aos os resultados encontrados por Kim e Kim (1993), que avaliaram enzimas produzidas por espécies de *Bacillus*, verificando a produção de celulase e hemicelulase, o que poderia estar envolvido na degradação de paredes celulares, contendo celulose, galactomanas ou manoproteínas, auxiliando assim no controle biológico de diversos fungos.

Os isolados TCB 07, TCB 12, TCB 13, TCB 24 e TCB 25 diferiram do tratamento controle, demonstrando também potencial antagonista, como mostra a tabela 11.

Tabela 11 – Área da colônia fúngica de *Sclerotinia sclerotiorum*, no primeiro experimento realizado, UEPG, Ponta Grossa, 2017.

Isolado bacteriano	Área da colônia (mm²)		
	24 h	48 h	72 h
TCB 01	864 e	2.904 d	22.080 a
TCB 02	811 e	1.994 d	2.947 e
TCB 03	2.229 c	15.558 b	21.769 a
TCB 04	3.381 b	20.632 a	22.698 a
TCB 07	546 e	3.271 d	16.799 b
TCB 08	724 e	1.668 d	2.604 e
TCB 09	1.511 d	13.093 b	22.698 a
TCB 10	1.520 d	2.773 d	3.133 e
TCB 11	664 e	1.090 d	1.772 e
TCB 12	1.230 d	4.989 d	9.684 d
TCB 13	1.148 d	8.289 c	17.068 b
TCB 14	3.196 b	19.413 a	22.055 a
TCB 15	3.645 b	20.443 a	22.567 a
TCB 17	680 e	724 d	722 e
TCB 18	314 e	314 d	342 e
TCB 19	1.302 d	2.421 d	2.707 e
TCB 20	415 e	1.258 d	3.876 e
TCB 21	2.222 c	18.041 a	22.439 a
TCB 22	4.567 a	22.698 a	22.698 a
TCB 24	994 d	10.220 c	15.697 b
TCB 25	831 e	3.583 d	13.280 c
TCB 26	2.933 c	17.048 b	21.209 a
Controle (<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>)	3.657 b	18.638 a	22.698 a
C.V. (%)	37,86	43,19	18,10

*Médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 1% de probabilidade, dados não transformados.

Na tabela 12 encontram-se as porcentagens de inibição do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* pelas bactérias endofíticas, os isolados que apresentaram as maiores porcentagens de inibição foram: TCB 02 (87,02%), TCB 08 (88,53%), TCB 10 (86,19%), TCB 11 (92,19%), TCB 17 (96,84%), TCB 18 (98,48%), TCB 19 (88,05%) e TCB 20 (82,92%); não diferindo estatisticamente entre si.

Os isolados TCB 07, TCB 12, TCB 13, TCB 24 e TCB 25 diferiram do tratamento controle, demonstrando também potencial antagonista, como mostra a tabela 12.

Tabela 12 – Porcentagem de inibição promovido por bactérias endofíticas sobre o fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, no primeiro experimento realizado, UEPG, Ponta Grossa, 2017.

Isolado bacteriano	Porcentagem de inibição (%)		
	24 h	48 h	72 h
TCB 01	76,37 a	84,43 a	2,72 e
TCB 02	77,82 a	89,31 a	87,02 a
TCB 03	39,04 c	16,52 c	4,09 e

(continua)

(conclusão)

Isolado bacteriano	Porcentagem de inibição (%)		
	24 h	48 h	72 h
TCB 04	7,55 d	-10,70 d	0,00 e
TCB 07	85,07 a	82,47 a	26,00 d
TCB 08	80,21 a	91,06 a	88,53 a
TCB 09	58,67 b	29,77 c	0,00 e
TCB 10	58,44 b	85,11 a	86,19 a
TCB 11	81,86 a	94,14 a	92,19 a
TCB 12	66,35 b	73,23 a	57,35 b
TCB 13	68,61 b	55,53 b	24,80 d
TCB 14	12,59 d	-4,17 d	2,83 e
TCB 15	0,34 d	-9,68 d	0,58 e
TCB 17	81,42 a	96,13 a	96,84 a
TCB 18	91,40 a	98,30 a	98,48 a
TCB 19	64,40 b	87,00 a	88,05 a
TCB 20	88,65 a	93,25 a	82,92 a
TCB 21	39,24 c	3,19 d	1,14 e
TCB 22	-24,89 e	-21,80 d	0,00 e
TCB 24	72,83 b	45,17 b	30,85 d
TCB 25	77,27 a	80,77 a	41,50 c
TCB 26	19,79 c	8,53 c	6,56 e
Controle (<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>)	-0,02 d	0,00 d	0,00 e
C.V. (%)	33,35	41,89	27,20

*Médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 1% de probabilidade, dados não transformados.

5.2 SEGUNDO EXPERIMENTO *IN VITRO*

O experimento foi repetido no tempo para uma maior credibilidade dos dados, na tabela 13 encontram-se os dados do segundo experimento de pareamento de bactérias endofíticas com o patógeno *Fusarium solani*. Os resultados se mostraram muito similares ao primeiro experimento, sendo o maior halo de inibição encontrado pelo isolado bacteriano TCB 10 (2,45 mm), e o segundo maior halo pelo isolado TCB 13 (0,75 mm).

Tabela 13 – Halo de inibição promovido por bactérias endofíticas sobre o fungo *Fusarium solani*, no segundo experimento realizado, UEPG, Ponta Grossa, 2017.

(continua)

Isolado bacteriano	Halo de inibição (mm)					
	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h
TCB 01	8,00 a	0,70 d	0,00 d	0,00 d	0,00 c	0,00 c
TCB 02	8,45 a	2,15 c	0,25 d	0,00 d	0,00 c	0,00 c
TCB 03	8,05 a	1,15 d	0,00 d	0,00 d	0,00 c	0,00 c
TCB 04	5,30 c	0,85 d	0,00 d	0,00 d	0,00 c	0,00 c
TCB 07	6,65 b	1,60 c	0,00 d	0,00 d	0,00 c	0,00 c
TCB 08	8,95 a	5,20 a	1,35 c	0,00 d	0,00 c	0,00 c
TCB 09	6,45 b	1,40 c	0,15 d	0,00 d	0,00 c	0,00 c
TCB 10	7,70 a	6,75 a	5,85 a	5,15 a	3,80 a	2,45 a

(conclusão)

Isolado bacteriano	Halo de inibição (mm)					
	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h
TCB 11	7,65 a	3,95 b	1,45 c	0,00 d	0,00 c	0,00 c
TCB 12	7,65 a	5,00 a	0,15 d	0,00 d	0,00 c	0,00 c
TCB 13	8,05 a	5,40 a	3,85 b	3,00 b	1,35 b	0,75 b
TCB 14	7,85 a	2,10 c	0,30 d	0,00 d	0,00 c	0,00 c
TCB 15	8,55 a	4,00 b	0,25 d	0,00 d	0,00 c	0,00 c
TCB 17	6,45 b	3,80 b	0,15 d	0,00 d	0,00 c	0,00 c
TCB 18	4,95 c	2,70 c	0,15 d	0,00 d	0,00 c	0,00 c
TCB 19	4,75 c	3,15 b	0,20 d	0,00 d	0,00 c	0,00 c
TCB 20	7,05 a	4,45 b	0,35 d	0,00 d	0,00 c	0,00 c
TCB 21	7,95 a	2,90 c	0,20 d	0,00 d	0,00 c	0,00 c
TCB 22	8,35 a	1,95 c	0,00 d	0,00 d	0,00 c	0,00 c
TCB 24	8,20 a	3,90 b	1,75 c	0,55 c	0,00 c	0,00 c
TCB 25	7,60 a	2,45 c	0,10 d	0,00 d	0,00 c	0,00 c
TCB 26	8,95 a	3,50 b	0,15 d	0,00 d	0,00 c	0,00 c
Controle (<i>Fusarium solani</i>)	0,00 d	0,00 e	0,00 d	0,00 d	0,00 c	0,00 c
C.V. (%)	7,29	16,09	15,46	8,01	6,51	7,95

*Médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 1% de probabilidade, dados transformados em $\sqrt{x + k}$, sendo $k=1$.

Com relação a área da colônia de *F. solani* (tabela 14), para o segundo experimento o isolado bacteriano TCB 10 foi o que apresentou maior redução do crescimento de *F. solani*, assim como no primeiro experimento. Os isolados TCB 11, TCB 17, TCB 18 e TCB 19, apresentaram também alta redução do crescimento de *F. solani*, sendo o segundo maior nível de redução de crescimento micelial.

Os isolados TCB 02, TCB 03, TCB 04, TCB 07, TCB 08, TCB 12, TCB 13, TCB 14, TCB 15, TCB 20, TCB 24, TCB 25 e TCB 26, diferiram do tratamento controle, apresentando potencial antagonista, como mostra a tabela 14.

Tabela 14 – Área da colônia fúngica de *Fusarium solani*, no segundo experimento realizado, UEPG, Ponta Grossa, 2017.

(continua)

Isolado bacteriano	Área da colônia (mm²)					
	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h
TCB 01	1.315 b	4.109 a	7.092 a	12.444 a	17.342 a	21.224 a
TCB 02	1.020 d	3.053 b	5.226 c	7.448 e	9.614 f	12.830 e
TCB 03	1.390 b	4.007 a	7.065 a	11.198 b	16.713 b	19.911 b
TCB 04	1.737 a	3.746 a	7.733 a	12.703 a	17.509 a	19.469 b
TCB 07	1.443 b	3.489 b	6.313 b	10.749 c	15.095 c	19.800 b
TCB 08	1.235 c	2.559 c	4.435 d	6.360 f	8.648 f	12.375 e
TCB 09	1.599 a	3.625 a	6.780 a	12.076 a	18.966 a	21.895 a
TCB 10	1.068 d	1.496 d	1.781 f	2.078 h	2.427 h	3.022 h
TCB 11	1.200 c	2.355 c	3.984 d	5.558 g	6.808 g	7.979 g
TCB 12	1.431 b	2.407 c	5.787 b	7.997 e	11.942 d	14.813 d
TCB 13	1.249 c	2.724 c	4.708 c	6.366 f	8.989 f	10.622 f
TCB 14	1.195 c	3.060 b	5.056 c	10.016 c	14.825 c	19.236 b
TCB 15	1.097 d	2.599 c	4.970 c	9.166 d	13.874 c	17.098 c

(conclusão)

Isolado bacteriano	Área da colônia (mm²)					
	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h
TCB 17	1.006 d	1.692 d	4.399 d	5.502 g	6.746 g	8.032 g
TCB 18	1.120 d	1.823 d	3.764 d	5.254 g	6.289 g	7.399 g
TCB 19	1.159 c	1.427 d	3.221 e	5.457 g	7.042 g	8.412 g
TCB 20	1.256 c	2.172 c	4.410 d	7.008 e	10.949 e	13.989 e
TCB 21	1.389 b	3.285 b	6.199 b	12.338 a	18.190 a	21.888 a
TCB 22	1.467 b	3.699 a	6.317 b	12.663 a	17.847 a	21.077 a
TCB 24	1.347 b	2.962 b	5.076 c	7.235 e	9.217 f	10.787 f
TCB 25	1.335 b	3.209 b	5.317 c	7.874 e	12.463 d	15.966 d
TCB 26	1.291 c	3.428 b	5.290 c	9.048 d	14.031 c	18.162 c
Controle (<i>Fusarium solani</i>)	1.502 b	3.867 a	7.347 a	12.089 a	15.803 b	22.698 a
C.V. (%)	12,92	14,03	13,33	10,90	12,24	12,33

*Médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 1% de probabilidade, dados não transformados.

Os resultados de porcentagem de inibição encontrados no segundo experimento de *F. solani* (tabela 15) mostram-se semelhantes ao primeiro experimento, porém as bactérias como a TCB 11, TCB 17, TCB 18 e TCB 19, expressaram-se melhores que no primeiro experimento.

O isolado bacteriano TCB 10 (86,70%), foi o que apresentou maior porcentagem inibição de *F. solani*, assim como no primeiro experimento; os isolados TCB 11 (64,85%), TCB 17 (64,62%), TCB 18 (67,41%) e TCB 19 (62,93%) se apresentaram no segundo maior nível de inibição.

Os isolados TCB 17, TCB 18 e TCB19 são do gênero *Bacillus*, é conhecido que bactérias deste gênero produzem uma grande quantidade de antibióticos peptídicos, como subtilina, bacilisina, micobacilina e iturina A, bem como metabólitos secundários que representam pelo menos 25 estruturas químicas básicas diferentes, que conferem a estes capacidade de inibição de patógenos (YOSHIDA et al., 2000; MUTAZ e HASNAIN, 2006).

Os isolados TCB 02, TCB 03, TCB 04, TCB 07, TCB 08, TCB 12, TCB 13, TCB 14, TCB 15, TCB 20, TCB 24, TCB 25 e TCB 26, diferiram do tratamento controle, apresentando potencial antagonico, como mostra a tabela 15.

Tabela 15 – Porcentagem de inibição promovido por bactérias endofíticas sobre o fungo *Fusarium solani*, no segundo experimento realizado, UEPG, Ponta Grossa, 2017.

(continua)

Isolado bacteriano	Porcentagem de inibição (%)					
	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h
TCB 01	12,41 c	-6,23 d	3,47 f	-2,93 h	-9,72 h	6,49 h
TCB 02	32,06 a	21,06 c	28,87 d	38,40 d	39,17 c	43,48 d

(conclusão)

Isolado bacteriano	Porcentagem de inibição (%)					
	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h
TCB 03	7,42 c	-3,61 d	3,82 f	7,37 g	-5,74 g	12,29 g
TCB 04	-15,65 d	3,13 d	-5,26 f	-5,08 h	-10,80 h	14,23 g
TCB 07	3,91 c	9,78 c	14,06 e	11,09 f	4,47 f	12,77 g
TCB 08	17,76 b	33,82 b	39,66 c	47,38 c	45,28 c	45,48 d
TCB 09	-6,47 d	6,25 d	7,72 f	0,10 h	-20,00 h	3,53 h
TCB 10	28,85 a	61,32 a	75,77 a	82,80 a	84,65 a	86,70 a
TCB 11	20,13 b	39,12 b	45,77 c	54,03 b	56,89 b	64,85 b
TCB 12	4,74 c	37,77 b	21,24 e	33,84 d	24,43 e	34,74 e
TCB 13	16,85 b	29,56 b	35,93 d	47,35 c	43,12 c	53,20 c
TCB 14	20,45 b	20,86 c	31,21 d	17,15 f	6,21 f	15,24 g
TCB 15	26,94 a	32,80 b	32,38 d	24,18 e	12,21 f	24,66 f
TCB 17	33,00 a	56,25 a	40,13 c	54,50 b	57,30 b	64,62 b
TCB 18	25,43 a	52,85 a	48,78 c	56,56 b	60,19 b	67,41 b
TCB 19	22,81 b	63,10 a	56,14 b	54,84 b	55,43 b	62,93 b
TCB 20	16,35 b	43,85 b	39,99 c	42,04 d	30,71 d	38,37 d
TCB 21	7,50 c	15,05 c	15,61 e	-2,06 h	-15,09 h	3,57 h
TCB 22	2,31 c	4,36 d	14,01 e	-4,74 h	-12,92 h	7,14 h
TCB 24	10,26 c	23,40 c	30,93 d	40,15 d	41,67 c	52,47 c
TCB 25	11,13 c	17,01 c	27,65 d	34,86 d	21,14 e	29,64 e
TCB 26	14,04 b	11,35 c	28,02 d	25,15 e	11,22 f	19,99 f
Controle (<i>Fusarium solani</i>)	0,00 c	0,00 d	0,00 f	0,00 h	0,00 g	0,00 h
C.V. (%)	82,21	42,30	34,89	27,27	41,91	24,80

*Médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 1% de probabilidade, dados não transformados.

Na tabela 16 estão o resultados do segundo experimento com *Rhizoctonia solani*, os resultados foram muito similares ao primeiro experimento, o maior halo de inibição foi exercido pelo isolado TCB 10 (5,85 mm), e o segundo maior halo foi exercido pelos isolados TCB 11 (1,90 mm) e TCB 18 (1,95 mm). Os demais isolados não diferiram do tratamento controle.

Tabela 16 – Halo de inibição promovido por bactérias endofíticas sobre o fungo *Rhizoctonia solani*, no segundo experimento realizado, UEPG, Ponta Grossa, 2017.

(continua)

Isolado bacteriano	Halo de inibição (mm)		
	24 h	48 h	72 h
TCB 01	2,25 d	0,00 d	0,00 c
TCB 02	4,95 b	0,25 d	0,00 c
TCB 03	0,10 e	0,00 d	0,00 c
TCB 04	0,80 e	0,00 d	0,00 c
TCB 07	0,85 e	0,00 d	0,00 c
TCB 08	9,55 a	4,95 a	0,40 c
TCB 09	2,25 d	0,00 d	0,00 c
TCB 10	8,05 a	5,85 a	5,85 a
TCB 11	5,70 b	1,90 b	1,90 b
TCB 12	4,45 b	0,30 d	0,05 c
TCB 13	5,50 b	0,80 c	0,20 c
TCB 14	0,15 e	0,00 d	0,00 c
TCB 15	0,60 e	0,00 d	0,00 c

(conclusão)

Isolado bacteriano	Halo de inibição (mm)		
	24 h	48 h	72 h
TCB 17	4,70 b	1,40 c	0,40 c
TCB 18	3,55 c	2,40 b	1,95 b
TCB 19	3,65 c	2,30 b	0,60 c
TCB 20	5,15 b	0,15 d	0,00 c
TCB 21	0,50 e	0,00 d	0,00 c
TCB 22	0,20 e	0,00 d	0,00 c
TCB 24	4,60 b	0,00 d	0,00 c
TCB 25	5,00 b	0,00 d	0,00 c
TCB 26	3,95 c	0,00 d	0,00 c
Controle (<i>Rhizoctonia solani</i>)	0,00 e	0,00 d	0,00 c
C.V. (%)	14,75	18,51	15,95

*Médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 1% de probabilidade, dados transformados em $\sqrt{x + k}$, sendo k=1.

Na tabela 17, encontram-se os resultados de redução de crescimento de *F. solani*, os isolados bacterianos que apresentam a maior redução foram o TCB 17 (3.092 mm²), TCB 18 (2.201 mm²) e TCB 19 (3.5012 mm²), mostrando-se mais capazes de reduzir área de crescimento de *R. solani* neste experimento do que no primeiro experimento. Os isolados que apresentaram o segundo maior nível de redução de crescimento foram o TCB 08 (4.731 mm²), TCB 10 (4.726 mm²) e TCB 11 (5.218 mm²).

Os isolados TCB 02, TCB 12, TCB 13, TCB 14, TCB 20, TCB 24, TCB 25 e TCB 26, diferiram do tratamento controle, apresentando potencial antagonista, como mostra a tabela 17.

Tabela 17 – Área da colônia fúngica de *Rhizoctonia solani*, no segundo experimento realizado, UEPG, Ponta Grossa, 2017.

(continua)

Isolado bacteriano	Área da colônia (mm ²)		
	24 h	48 h	72 h
TCB 01	3.256 d	18.643 b	22.698 a
TCB 02	1.656 g	4.338 g	7.293 g
TCB 03	4.844 b	17.991 b	22.340 a
TCB 04	3.877 c	20.806 a	22.698 a
TCB 07	3.818 c	15.355 c	22.698 a
TCB 08	799 h	2.333 h	4.731 h
TCB 09	2.853 e	14.828 c	22.698 a
TCB 10	1.883 g	4.076 g	4.726 h
TCB 11	1.874 g	3.923 g	5.218 h
TCB 12	1.965 g	5.562 g	9.706 f
TCB 13	2.249 f	6.989 f	12.116 e
TCB 14	3.946 c	14.762 c	20.546 b
TCB 15	4.213 c	17.992 b	22.698 a
TCB 17	1.259 h	2.292 h	3.092 i
TCB 18	1.248 h	1.786 h	2.201 i

(conclusão)

Isolado bacteriano	Área da colônia (mm ²)		
	24 h	48 h	72 h
TCB 19	1.673 g	2.622 h	3.512 i
TCB 20	1.945 g	6.368 f	10.824 f
TCB 21	3.979 c	21.449 a	22.698 a
TCB 22	5.493 a	21.817 a	22.698 a
TCB 24	2.458 f	9.304 e	18.246 c
TCB 25	2.650 e	8.485 e	14.679 d
TCB 26	2.974 e	10.971 d	19.943 b
Controle (<i>Rhizoctonia solani</i>)	4.136 c	18.643 b	22.698 a
C.V. (%)	15,75	13,60	9,44

*Médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 1% de probabilidade, dados não transformados.

Na tabela 18 estão os resultados de porcentagem de inibição encontrados no segundo experimento com *R. solani*, as maiores porcentagens de inibição foram obtidas pelos isolados bacterianos de TCB 17 (86,38 %), TCB 18 (86,38 %) e TCB 19 (86,38 %).

Os isolados que apresentaram o segundo maior nível de porcentagem de inibição foram o TCB 08 (79,14 %), TCB 10 (79,17 %) e TCB 11 (77,01 %).

Os isolados TCB 02, TCB 12, TCB 13, TCB 14 e TCB 20, TCB 24, TCB 25 e TCB 26, diferiram do tratamento controle apresentando potencial antagonista, como mostra a tabela 18.

Tabela 18 – Porcentagem de inibição promovido por bactérias endofíticas sobre o fungo *Rhizoctonia solani*, no segundo experimento realizado, UEPG, Ponta Grossa, 2017.

(continua)

Isolado bacteriano	Porcentagem de inibição (%)		
	24 h	48 h	72 h
TCB 01	21,28 e	0,02 g	0,00 i
TCB 02	59,98 b	76,74 b	67,88 c
TCB 03	-17,12 g	3,51 g	1,58 i
TCB 04	6,28 f	-11,62 h	0,00 i
TCB 07	7,70 f	17,63 f	0,00 i
TCB 08	80,67 a	87,49 a	79,14 b
TCB 09	31,00 d	20,46 f	0,00 i
TCB 10	54,48 b	78,14 b	79,17 b
TCB 11	54,67 b	78,96 b	77,01 b
TCB 12	52,47 b	70,17 b	57,23 d
TCB 13	45,63 c	62,51 c	46,61 e
TCB 14	4,60 f	20,84 f	9,48 h
TCB 15	-1,86 f	3,50 g	0,00 i
TCB 17	69,56 a	87,69 a	86,38 a
TCB 18	69,81 a	90,41 a	90,30 a
TCB 19	59,54 b	85,93 a	84,53 a
TCB 20	52,98 b	65,86 c	52,30 d
TCB 21	3,81 f	-15,06 h	0,00 i
TCB 22	-32,80 h	-17,05 h	0,00 i

(conclusão)

Isolado bacteriano	Porcentagem de inibição (%)		
	24 h	48 h	72 h
TCB 24	40,59 c	50,10 d	19,62 g
TCB 25	35,91 d	54,50 d	35,32 f
TCB 26	28,10 d	41,16 e	12,14 h
Controle (<i>Rhizoctonia solani</i>)	0,00 f	0,00 g	0,00 i
C.V. (%)	34,06	19,30	17,75

*Médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 1% de probabilidade, dados não transformados.

No segundo experimento com *S. sclerotiorum* os maiores halos de inibição (tabela 19) foram obtidos pelos isolados bacterianos, TCB 02 (7,55 mm), TCB 08 (7,90 mm), TCB 10 (7,25 mm) e TCB 19 (8,75 mm), resultado muito similar ao experimento anterior, com excessão do TCB 11 (0,00 mm) que para este experimento não apresentou os mesmos resultados.

Os isolados bacterianos TCB 07 (3,35 mm), TCB 17 (5,85 mm) e TCB 18 (3,70 mm) foram os segundos maiores halos de inibição.

Os isolados TCB 12, e TCB 20, diferiram do tratamento controle apresentando potencial antagonista, como mostra a tabela 19.

Tabela 19 – Halo de inibição promovido por bactérias endofíticas sobre o fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, no segundo experimento realizado, UEPG, Ponta Grossa, 2017.

(continua)

Isolado bacteriano	Halo de inibição (mm)		
	24 h	48 h	72 h
TCB 01	7,15 b	0,00 d	0,00 d
TCB 02	8,50 a	7,70 a	7,55 a
TCB 03	9,10 a	0,25 d	0,00 d
TCB 04	8,90 a	0,30 d	0,00 d
TCB 07	9,95 a	9,55 a	3,35 b
TCB 08	12,15 a	8,50 a	7,90 a
TCB 09	9,90 a	0,35 d	0,00 d
TCB 10	8,50 a	8,50 a	7,25 a
TCB 11	9,90 a	0,50 d	0,00 d
TCB 12	7,00 b	3,25 c	2,50 c
TCB 13	9,75 a	0,85 d	0,70 d
TCB 14	9,70 a	0,00 d	0,00 d
TCB 15	10,20 a	0,00 d	0,00 d
TCB 17	6,45 b	5,85 b	5,85 b
TCB 18	3,95 c	3,80 b	3,70 b
TCB 19	9,00 a	9,00 a	8,75 a
TCB 20	9,00 a	4,40 b	3,25 c
TCB 21	8,40 a	0,20 d	0,00 d
TCB 22	7,60 b	0,00 d	0,00 d
TCB 24	7,50 b	0,45 d	0,40 d
TCB 25	6,35 b	0,00 d	0,00 d
TCB 26	7,70 b	0,00 d	0,00 d

Isolado bacteriano	Halo de inibição (mm)		
	24 h	48 h	72 h
Controle (<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>)	0,00 d	0,00 d	0,00 d
C.V. (%)	12,52	24,52	28,25

(conclusão)

*Médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 1% de probabilidade, dados transformados em $\sqrt{x + k}$, sendo $k=1$.

Os resultados obtidos para área de crescimento de *S. sclerotiorum* no segundo experimento, estão na tabela 20. Observa-se que os isolados bacterianos que mais inibiram o crescimento do fungo foram o TCB 02 (726 mm²), TCB 07 (2.960 mm²), TCB 08 (1.266 mm²), TCB 17 (1.798 mm²), TCB 18 (220 mm²) e TCB 19 (314 mm²).

Os isolados TCB 09, TCB 10, TCB 11, TCB 12, TCB 13, TCB 15 e TCB 20, diferiram do tratamento controle, apresentando potencial antagonista, como mostra a tabela 20.

Tabela 20 – Área da colônia fúngica de *Sclerotinia sclerotiorum*, no segundo experimento realizado, UEPG, Ponta Grossa, 2017.

Isolado bacteriano	Área da colônia (mm ²)		
	24 h	48 h	72 h
TCB 01	1.254 b	20.140 a	22.102 a
TCB 02	534 d	709 e	726 f
TCB 03	789 c	13.331 b	18.611 a
TCB 04	663 c	16.769 b	21.190 a
TCB 07	418 d	753 e	2.960 f
TCB 08	352 d	1.145 e	1.266 f
TCB 09	771 c	10.580 c	16.402 b
TCB 10	1.095 b	1.095 e	5.216 e
TCB 11	696 c	10.125 c	12.716 c
TCB 12	853 c	5.283 d	7.979 d
TCB 13	618 c	6.827 d	9.277 d
TCB 14	725 c	17.311 b	20.776 a
TCB 15	466 d	7.340 d	18.009 b
TCB 17	586 c	1.709 e	1.798 f
TCB 18	179 d	214 e	220 f
TCB 19	296 d	303 e	314 f
TCB 20	759 c	3.839 e	6.065 e
TCB 21	819 c	9.266 c	17.047 b
TCB 22	1.079 b	20.839 a	22.153 a
TCB 24	1.491 b	11.292 c	12.342 c
TCB 25	1.992 a	19.911 a	20.073 a
TCB 26	1.269 b	19.446 a	22.489 a
Controle (<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>)	1.275 b	20.818 a	22.698 a
C.V. (%)	45,84	36,04	23,27

*Médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 1% de probabilidade, dados não transformados.

Os resultados obtidos para a porcentagem de inibição estão apresentados na tabela 21, onde as maiores porcentagens de inibição foram encontradas pelos isolados bacterianos TCB 02 (96,80%), TCB 07 (86,97 %), TCB 08 (94,44 %), TCB 17 (92,09 %), TCB 18 (99,02 %) e TCB 19 (98,63 %).

Os isolados TCB 09, TCB 10, TCB 11, TCB 12, TCB 13, TCB 15, TCB 20 e TCB 24 diferiram do tratamento controle, apresentando potencial antagonista, como mostra a tabela 21.

Tabela 21 – Porcentagem de inibição promovido por bactérias endofíticas sobre o fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, no segundo experimento realizado, UEPG, Ponta Grossa, 2017.

Isolado bacteriano	Porcentagem de inibição (%)		
	24 h	48 h	72 h
TCB 01	1,71 c	3,25 e	2,62 f
TCB 02	58,16 a	96,59 a	96,80 a
TCB 03	38,13 b	35,97 d	17,98 f
TCB 04	47,99 b	19,44 d	6,64 f
TCB 07	67,27 a	96,38 a	86,97 a
TCB 08	72,36 a	94,50 a	94,44 a
TCB 09	39,53 b	49,16 c	27,72 e
TCB 10	14,13 c	94,75 a	77,02 b
TCB 11	45,45 b	51,36 c	43,97 d
TCB 12	33,14 b	74,64 b	64,84 c
TCB 13	51,53 b	67,21 b	59,11 c
TCB 14	43,16 b	16,86 d	8,47 f
TCB 15	63,47 a	64,74 b	20,65 e
TCB 17	54,04 b	91,79 a	92,09 a
TCB 18	85,95 a	98,99 a	99,02 a
TCB 19	76,79 a	98,54 a	98,63 a
TCB 20	40,52 b	81,56 a	73,26 b
TCB 21	35,77 b	55,49 c	24,89 e
TCB 22	15,40 c	-0,11 e	2,40 f
TCB 24	-16,94 c	45,76 c	45,61 d
TCB 25	-56,17 d	4,35 e	11,57 f
TCB 26	0,48 c	6,59 e	0,92 f
Controle (<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>)	0,00 c	0,00 e	0,00 f
C.V. (%)	84,01	30,40	27,44

*Médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 1% de probabilidade, dados não transformados.

5.3 EXPERIMENTO *IN VIVO*

Foram selecionados os isolados bacterianos TCB 02, TCB 7, TCB 08, TCB 10, TCB 11, TCB 17, TCB 18, TCB 19 e TCB 20 por apresentarem mais de 75% de inibição, para pelo menos um dos patógenos nos testes *in vitro*, e os isolados TCB 13 e TCB 24 que obtiveram resultados estáveis (cerca de 50% de inibição) para os 3

patógenos testados. Quando foram realizados os testes *in vivo* não tinha-se ainda a classificação a nível molecular, por isso estes foram selecionados pela morfologia da colônia (coloração e formato da colônia); os isolados TCB 07 e TCB 11 foram retirados do teste por apresentarem as mesmas características da colônia do isolado TCB 10, sendo o TCB 10 o que apresentou maior potencial de inibição; e os isolados TCB 17, TCB 19 e TCB 20 foram retirados por apresentarem as mesmas características do TCB 18, sendo o TCB 18 o que apresentou maior potencial de inibição; o isolado TCB 24 foi retirado do teste por apresentar as mesmas características da colônia do isolado TCB 13, sendo o TCB 13 o que apresentou maior potencial de inibição; os isolados TCB 02 e TCB 08 apresentava características singulares. Assim foram escolhidos os isolados bacterianos TCB 02, TCB 08, TCB 10, TCB 13 e TCB 18 para continuar os testes *in vivo*.

Para *Fusarium solani* não houve diferença estatística para os resultados de emergência como mostra a tabela 22, possivelmente o tempo de inoculação tenha sido muito curto para a completa inoculação da semente pelo patógeno.

Para altura de plantas não houve diferenças estatísticas significativas, pois as diferenças nas avaliações de 7 e 14 dias estabilizaram-se após 21 dias, e não houveram plantas anormais.

Tabela 22 – Emergência, altura e porcentagem de plantas anormais, após tratamento de sementes com bactérias endofíticas em sementes com e sem inoculação de *Fusarium solani*, semeadas em casa de vegetação, UEPG, Ponta Grossa, 2017.

Tratamento		Emergência (%)			Altura (cm)			Plantas anormais (%)		
		7 dias	14 dias	21 dias	7 dias	14 dias	21 dias	7 dias	14 dias	21 dias
com inoculação	TCB 02	94,6 Ns*	98,4 Ns	98,4 Ns	2,0 c**	6,6 a	10,5 Ns	-	-	-
	TCB 08	96,1	100,0	100,0	2,1 c	6,6 a	9,9	-	-	-
	TCB 10	95,4	96,1	96,1	2,4 a	6,6 a	10,5	-	-	-
	TCB 13	93,8	96,1	96,9	2,4 a	6,6 a	10,0	-	-	-
	TCB 18	92,2	96,1	98,4	2,3 b	6,3 a	9,5	-	-	-
	Controle	96,9	98,4	98,4	1,9 d	6,6 a	10,4	-	-	-
	Standak Top	91,4	97,7	97,7	1,7 e	6,6 a	10,3	-	-	-
sem inoculação	TCB 02	93,0	99,2	100,0	2,1 c	5,7 b	9,5	-	-	-
	TCB 08	92,2	97,7	97,7	2,1 c	5,8 b	9,6	-	-	-
	TCB 10	93,8	96,1	96,9	2,1 c	6,5 a	10,0	-	-	-
	TCB 13	91,5	98,4	99,2	2,2 c	6,4 a	10,2	-	-	-
	TCB 18	90,6	98,4	98,4	2,1 c	6,3 a	9,3	-	-	-
	Controle	96,1	99,2	100,0	2,2 b	6,5 a	9,9	-	-	-
	Standak Top	93,0	97,7	99,2	1,8 e	6,5 a	10,4	-	-	-
C.V. (%)		9.17	3.07	6.40	4.49	3.39	5.67	-	-	-

* Ns (dados não significativos entre si pelo teste Scott-Knott a 1% de probabilidade).

**médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 1% de probabilidade, dados em (%) foram transformados em $\arcsen \sqrt{(x/100)}$.

A severidade nos tratamentos acabou sendo muito baixa, poucas plantas apresentaram lesões radiculares e escurecimento de vasos, assim não houve diferenças estatísticas, como mostra a tabela 23.

Com relação ao volume de raízes para o tratamento de sementes sem inoculação de *F. solani* os isolados bacterianos TCB 18 (72,3 mL), TCB 13 (68,8 mL) e TCB 08 (66,5 mL) destacaram-se, sendo superiores ao tratamento controle, e igualando-se ao tratamento com o fungicida Standak Top, demonstrando capacidade de aumento do volume de raízes.

Tabela 23 – Severidade e volume de raízes, após tratamento de sementes com bactérias endofíticas em sementes com e sem inoculação de *Fusarium solani*, semeadas em casa de vegetação, UEPG, Ponta Grossa, 2017.

	Tratamento	Severidade (%)	Volume de raízes (mL)
com inoculação	TCB 02	3,7 Ns*	57,5 b**
	TCB 08	3,6	57,5 b
	TCB 10	2,4	55,8 b
	TCB 13	2,9	61,0 b
	TCB 18	2,8	64,5 a
	Controle	4,3	64,3 a
	Standak Top	2,8	60,0 b
sem inoculação	TCB 02	-	55,8 b
	TCB 08	-	66,5 a
	TCB 10	-	61,8 b
	TCB 13	-	68,8 a
	TCB 18	-	72,3 a
	Controle	-	62,0 b
	Standak Top	-	69,5 a
C.V. (%)		19,33	6,50

* Ns (dados não significativos entre si pelo teste Scott-Knott a 1% de probabilidade).

**médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 1% de probabilidade, dados em (%) foram transformados em $\arcsen \sqrt{(x/100)}$.

Os resultados na tabela 24 mostram a massa fresca e massa seca das plantas, onde pode-se observar que para as sementes inoculadas nenhum dos tratamentos com bactérias endofíticas promoveu aumento de massa fresca e massa seca.

Nos tratamentos com sementes sem inoculação pode-se observar que para a massa fresca de raízes os isolados bacterianos TCB 02 (60,0 g), TCB 08 (61,3 g) e TCB 13 (61,8 g) e TCB 18 (63,9 g), promoveram aumento de massa fresca, diferindo estatisticamente do tratamento controle, o que se reflete também para a massa fresca total, ocorrendo as mesmas diferenças.

Tabela 24 – Massa fresca e massa seca de plantas (raiz, parte aérea e total), após tratamento de sementes com bactérias endofíticas em sementes com e sem inoculação de *Fusarium solani*, semeadas em casa de vegetação, UEPG, Ponta Grossa, 2017.

Tratamento	Massa fresca (g)			Massa seca (g)		
	raiz	parte aérea	total	raiz	parte aérea	total
com inoculação	TCB 02	50,7 c**	57,5 Ns*	108,2 b	3,2 b	6,2 Ns
	TCB 08	51,3 c	60,8	112,0 b	3,1 b	6,6
	TCB 10	49,8 c	59,3	109,2 b	3,0 b	6,3
	TCB 13	57,2 b	59,7	116,8 b	3,3 b	6,4
	TCB 18	57,8 b	60,4	118,3 b	3,2 b	6,3
	Controle	60,3 a	63,1	123,3 a	3,5 a	6,4
	Standak Top	52,8 c	60,8	113,6 b	2,9 b	5,9
sem inoculação	TCB 02	60,0 a	62,0	122,0 a	3,2 b	6,6
	TCB 08	61,3 a	64,2	125,5 a	3,4 a	6,7
	TCB 10	57,8 b	61,2	119,1 b	3,4 a	6,3
	TCB 13	61,8 a	64,0	125,8 a	3,2 b	6,2
	TCB 18	63,9 a	64,4	128,3 a	3,5 a	6,6
	Controle	56,3 b	59,7	116,0 b	3,1 b	6,1
	Standak Top	63,3 a	63,7	127,0 a	3,5 a	6,4
C.V. (%)		5,26	4,84	4,49	6,33	6,92
						5,72

* Ns (dados não significativos entre si pelo teste Scott-Knott a 1% de probabilidade).

**médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 1% de probabilidade, dados em (%) foram transformados em $\arcsen \sqrt{(x/100)}$.

Para o experimento com a inoculação de *S. sclerotiorum* nas sementes, observa-se na tabela 25 que a emergência foi afetada pela inoculação de *S. sclerotiorum*, sendo que todos os tratamentos com bactérias endofíticas sofreram redução na emergência de plantas, com exceção do tratamento com o fungicida Standak Top, que não diferiu do tratamento controle sem inoculação de *S. sclerotiorum*.

Com relação a altura após 21 dias estabilizou-se o crescimento, e não houve diferença estatística. A porcentagem de plantas anormais também não foi significativa pois nenhum dos tratamentos com bactérias endofíticas diferiu do tratamento controle.

Tabela 25 – Emergência, altura e porcentagem de plantas anormais, após tratamento de sementes com bactérias endofíticas com e sem inoculação de *Sclerotinia sclerotiorum*, semeadas em casa de vegetação, UEPG, Ponta Grossa, 2017.

(continua)

(continua)										
Tratamento		Emergência (%)			Altura (cm)			Plantas anormais (%)		
		7 dias	14 dias	21 dias	7 dias	14 dias	21 dias	7 dias	14 dias	21 dias
com inoculação	TCB 02	69,5 b**	59,4 b	51,6 b	2,3 a	6,2 a	8,5 Ns*	0,0 Ns	17,2 a	24,2 a
	TCB 08	69,5 b	60,9 b	53,1 b	2,5 a	6,4 a	9,5	0,0	11,7 a	19,5 a
	TCB 10	73,4 b	61,7 b	60,2 b	2,2 b	5,9 a	9,4	0,0	12,5 a	16,4 a
	TCB 13	71,9 b	57,8 b	53,1 b	2,5 a	6,3 a	9,3	0,0	14,1 a	18,8 a
	TCB 18	69,5 b	56,3 b	54,7 b	2,5 a	6,3 a	8,8	0,0	14,8 a	18,0 a
	Controle	59,4 b	47,7 b	43,8 b	2,3 a	5,9 a	8,9	0,0	12,5 a	16,4 a
	Standak Top	88,3 a	96,9 a	97,7 a	2,3 a	6,1 a	9,3	0,0	0,0 b	0,0 b

(conclusão)

Tratamento		Emergência (%)			Altura (cm)			Plantas anormais (%)		
		7 dias	14 dias	21 dias	7 dias	14 dias	21 dias	7 dias	14 dias	21 dias
sem inoculação	TCB 02	93,0 a	98,4 a	98,4 a	2,2 b	5,4 b	9,3	-	-	-
	TCB 08	91,4 a	96,1 a	97,7 a	2,1 b	5,3 b	8,8	-	-	-
	TCB 10	93,0 a	96,9 a	96,9 a	2,0 b	5,3 b	9,3	-	-	-
	TCB 13	89,8 a	98,4 a	98,4 a	2,2 b	5,6 b	9,1	-	-	-
	TCB 18	93,8 a	99,2 a	99,2 a	2,3 a	6,1 a	9,8	-	-	-
	Controle	91,4 a	94,5 a	96,9 a	2,2 b	5,5 b	9,3	-	-	-
	Standak Top	91,4 a	96,1 a	97,7 a	2,3 a	5,9 a	10,0	-	-	-
C.V. (%)		8,60	8,91	9,05	5,92	5,11	6,68	-	33,17	24,04

* Ns (dados não significativos entre si pelo teste Scott-Knott a 1% de probabilidade).

**médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 1% de probabilidade, dados em (%) foram transformados em $\arcsen \sqrt{(x/100)}$.

Na tabela 26 observa-se que para severidade nenhum dos tratamentos com bactérias endofíticas diferiu estatisticamente do tratamento controle. Com relação ao volume de raízes, com exceção do tratamento com fungicida, todos os tratamentos com inoculação de *S. sclerotiorum* nas sementes sofreram redução do volume de raízes, comparados ao tratamento controle sem inoculação de *S. sclerotiorum* na semente.

Pode-se verificar também que todos os tratamentos com bactérias endofíticas em sementes sem inoculação de *S. sclerotiorum*, obtiveram volume de raízes superiores ao tratamento controle sem inoculação, demonstrando que provavelmente essa bactérias exerçam alguma atividade de estímulo do crescimento radicular.

Tabela 26 – Severidade e volume de raízes, após tratamento de sementes com bactérias endofíticas em sementes com e sem inoculação de *Sclerotinia sclerotiorum*, semeadas em casa de vegetação, UEPG, Ponta Grossa, 2017.

Tratamento		Severidade (%)	Volume de raízes (mL)
com inoculação	TCB 02	16,9 a*	31,3 c
	TCB 08	11,4 a	37,5 c
	TCB 10	7,4 a	39,5 c
	TCB 13	13,8 a	38,0 c
	TCB 18	15,4 a	35,8 c
	Controle	16,1 a	28,0 c
	Standak Top	0,4 b	65,5 a
sem inoculação	TCB 02	-	65,3 a
	TCB 08	-	66,5 a
	TCB 10	-	60,5 a
	TCB 13	-	63,0 a
	TCB 18	-	62,8 a
	Controle	-	50,3 b
	Standak Top	-	59,8 a
C.V. (%)		19,87	11,61

*Médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 1% de probabilidade, dados em (%) transformados em $\arcsen \sqrt{(x/100)}$.

Para todos os resultados de massa fresca e massa seca (tabela 27) das diferentes partes (raízes, parte aérea e total), não houve diferença estatística entre os tratamentos com bactérias endofíticas em sementes inoculadas e o tratamento controle com sementes inoculadas, mostrando que a bactérias endofíticas não conseguiram evitar redução de massa de plantas causada pela inoculação de *S. sclerotiorum*.

Na tabela 27 pode-se observar que para os tratamentos sem inoculação nas sementes não houve diferença estatística entre os tratamentos com bactérias endofíticas e o tratamento controle.

Tabela 27 – Massa fresca e massa seca de plantas (raíz, parte aérea e total), após tratamento de sementes com bactérias endofíticas em sementes com e sem inoculação de *Sclerotinia sclerotiorum*, semeadas em casa de vegetação, UEPG, Ponta Grossa, 2017.

Tratamento		Massa fresca (g)			Massa seca (g)		
		raiz	parte aérea	total	raiz	parte aérea	total
com inoculação	TCB 02	29,6 b	31,3 b	61,0 b	1,7 b	3,1 b	4,9 b
	TCB 08	33,3 b	33,9 b	67,1 b	2,1 b	3,5 b	5,6 b
	TCB 10	37,0 b	36,2 b	73,2 b	2,1 b	3,9 b	6,0 b
	TCB 13	34,3 b	33,4 b	67,7 b	1,9 b	3,5 b	5,4 b
	TCB 18	32,6 b	33,6 b	66,1 b	1,9 b	3,5 b	5,5 b
	Controle	27,7 b	29,2 b	56,8 b	1,6 b	2,7 b	4,4 b
	Standak Top	59,3 a	62,9 a	122,2 a	3,4 a	6,3 a	9,7 a
sem inoculação	TCB 02	60,7 a	65,6 a	126,3 a	3,4 a	6,4 a	9,8 a
	TCB 08	60,7 a	62,7 a	123,5 a	3,5 a	6,5 a	9,9 a
	TCB 10	54,6 a	62,4 a	117,0 a	3,4 a	6,6 a	10,0 a
	TCB 13	59,6 a	60,8 a	120,3 a	3,2 a	6,2 a	9,4 a
	TCB 18	59,0 a	63,4 a	122,4 a	3,3 a	6,1 a	9,4 a
	Controle	49,2 a	58,7 a	107,9 a	3,0 a	5,8 a	8,8 a
	Standak Top	55,5 a	61,7 a	117,2 a	3,1 a	6,0 a	9,1 a
C.V. (%)		10,00	9,49	9,04	11,33	9,54	9,64

*Médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 1% de probabilidade, dados em (%) transformados em $\arcsen \sqrt{(x/100)}$.

Para *Rhizoctonia solani* não foi encontrado diferença estatística entre os tratamentos para a avaliação de emergência, como mostra a tabela 28, já para os resultados de altura de plantas pode-se observar que para as sementes inoculadas com *R. solani* o tratamento com o isolado bacteriano TCB 10 (10,6 cm) foi superior ao tratamento controle (9,7 cm), e igualou-se ao tratamento com o fungicida Standak Top (10,4 cm).

Os tratamentos com os isolados bacterianos TCB 08 (9,5%) e TCB 10 (4,7%), se mostraram eficientes na redução da porcentagem de plantas anormais, diferindo do tratamento controle (25,0%), e igualando-se ao fungicida Standak Top (2,3%).

Tabela 28 – Emergência, altura e porcentagem de plantas anormais, após tratamento de sementes com bactérias endofíticas em sementes com e sem inoculação de *Rhizoctonia solani*, semeadas em casa de vegetação, UEPG, Ponta Grossa, 2017.

Tratamento		Emergência (%)			Altura (cm)			Plantas anormais (%)		
		7 dias	14 dias	21 dias	7 dias	14 dias	21 dias	7 dias	14 dias	21 dias
com inoculação	TCB 02	80,5 Ns*	85,9 Ns	94,5 Ns	2,7 Ns	6,4 b	9,3 b	0,0 ns	16,4 a	14,1 a
	TCB 08	87,5	89,1	89,8	2,9	6,9 a	10,0 b	0,0	8,6 b	9,4 b
	TCB 10	93,0	94,5	95,3	3,0	7,2 a	10,6 a	0,0	5,5 b	4,7 b
	TCB 13	85,2	93,8	93,8	2,8	6,8 a	10,1 b	0,0	14,8 a	14,8 a
	TCB 18	85,9	90,6	91,4	2,8	6,5 b	9,5 b	0,0	26,6 a	27,3 a
	Controle	85,2	90,6	90,6	2,8	6,4 b	9,7 b	0,0	27,3 a	25,0 a
	Standak Top	95,3	97,7	98,4	2,9	6,3 b	10,4 a	0,0	2,3 b	2,3 b
sem inoculação	TCB 02	90,6	98,4	98,4	2,4	6,2 b	10,6 a	-	-	-
	TCB 08	90,6	95,3	96,1	2,7	6,7 a	10,2 b	-	-	-
	TCB 10	94,5	96,9	96,9	2,6	6,7 a	10,3 a	-	-	-
	TCB 13	89,8	96,1	96,1	2,7	6,2 b	10,0 b	-	-	-
	TCB 18	87,5	95,3	96,1	2,8	6,3 b	10,8 a	-	-	-
	Controle	93,8	96,9	97,7	2,8	6,1 b	11,2 a	-	-	-
	Standak Top	91,4	97,7	97,7	2,7	6,2 b	10,9 a	-	-	-
C.V. (%)		9,39	9,71	8,78	5,32	4,31	5,14	-	30,43	27,69

*Médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 1% de probabilidade, dados em (%) transformados em $\sqrt{(x/100)}$.

Na tabela 29 estão os resultados de severidade de *R. solani* em plantas de soja, o tratamento de sementes com o isolado bacteriano TCB 10 (5,75%) foi o único tratamento que apresentou redução de severidade de *R. solani*, diferindo estatisticamente do tratamento controle (16,12%). A redução de severidade encontrada pelo tratamento com o isolado bacteriano TCB 10 (57,0 mL), reflete-se na avaliação de volume de raízes, onde este mesmo tratamento diferiu estatisticamente do tratamento controle (51,0 mL).

Resultados obtidos por El-Meleigi et al. (2017) mostraram que pesos frescos e pesos secos de mudas de alfafa inoculadas com *R. solani* aumentaram em até 21% em resposta a tratamentos de sementes com *Paenibacillus polymyxa* ME6 ou *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*, quando comparado às sementes tratadas com fungicida ou testemunha não tratada, demonstrando o potencial de controle de *R. solani* por bactérias do gênero *Paenibacillus*.

Para o tratamento de sementes com bactérias endofíticas em sementes não inoculadas com *S. sclerotiorum*, pode-se verificar que o tratamento com o isolado bacteriano TCB 10 (66,8 mL), diferiu do tratamento controle (62,8 mL), demonstrando uma provável capacidade de promoção de crescimento radicular.

Tabela 29 – Severidade e volume de raízes, após tratamento de sementes com bactérias endofíticos em sementes com e sem inoculação de *Rhizoctonia solani*, semeadas em casa de vegetação, UEPG, Ponta Grossa, 2017.

	Tratamento	severidade (%)	Volume de raízes (mL)
com inoculação	TCB 02	16,23 a	51,3 c
	TCB 08	24,09 a	51,5 c
	TCB 10	5,75 b	57,0 b
	TCB 13	13,45 a	49,8 c
	TCB 18	20,84 a	44,3 c
	Controle	16,12 a	51,0 c
	Standak Top	0,21 c	72,8 a
sem inoculação	TCB 02	-	61,0 b
	TCB 08	-	59,0 b
	TCB 10	-	66,8 a
	TCB 13	-	62,5 b
	TCB 18	-	63,5 b
	Controle	-	62,8 b
	Standak Top	-	61,8 b
	C.V. (%)	15,74	6,80

*Médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 1% de probabilidade, dados em (%) transformados em $\arcsen \sqrt{(x/100)}$.

Na tabela 30 estão os resultados de massa fresca e massa seca das diferentes partes (raízes, parte aérea e total) de plantas de soja, para as sementes inoculadas com *R. solani* e tratadas com os isolados bacterianos, observa-se para a massa fresca que somente o tratamento com o isolado bacteriano TCB 10 diferiu estatisticamente do tratamento controle para massa fresca de raiz (52,7 g), para massa fresca de parte aérea (57,5 g), e para massa fresca total da planta (110,2 g).

Os isolados bacterianos TCB 02 e TCB 10 diferiram estatisticamente do tratamento controle com sementes inoculadas com *R. solani* para os resultados de, massa seca da parte aérea e para a massa fresca total da planta, provavelmente devido a diminuição dos danos causados as plantas pelo patógeno.

Para todos os resultados de massa fresca e massa seca das diferentes partes (raízes, parte aérea e total), nas sementes não inoculadas, não houve diferença estatística entre os tratamentos.

Tabela 30 – Massa fresca e massa seca de plantas (raíz, parte aérea e total), após tratamento de sementes com bactérias endofíticas em sementes com e sem inoculação de *Rhizoctonia solani*, semeadas em casa de vegetação, UEPG, Ponta Grossa, 2017.

Tratamento		Massa fresca (g)			Massa seca (g)		
		raiz	parte aérea	total	raiz	parte aérea	total
com inoculação	TCB 02	48,1 b	54,5 b	102,6 b	3,0 a	5,6 a	8,5 a
	TCB 08	45,7 b	51,2 b	96,9 b	2,6 b	4,8 b	7,4 b
	TCB 10	52,7 a	57,5 a	110,2 a	2,7 b	5,5 a	8,2 a
	TCB 13	45,2 b	53,2 b	98,4 b	2,7 b	5,0 b	7,7 b
	TCB 18	39,4 b	49,5 b	88,9 b	2,2 b	4,4 b	6,6 b
	Controle	45,6 b	49,5 b	95,2 b	2,4 b	4,7 b	7,0 b
	Standak Top	59,0 a	61,2 a	120,1 a	3,2 a	5,7 a	8,8 a
sem inoculação	TCB 02	52,5 a	63,2 a	115,7 a	3,1 a	5,7 a	8,8 a
	TCB 08	53,7 a	60,8 a	114,6 a	3,0 a	5,6 a	8,6 a
	TCB 10	54,8 a	59,5 a	114,2 a	2,9 a	5,4 a	8,3 a
	TCB 13	55,3 a	61,0 a	116,3 a	3,4 a	4,9 b	8,3 a
	TCB 18	56,4 a	61,0 a	117,5 a	3,5 a	5,5 a	9,0 a
	Controle	57,0 a	60,3 a	117,3 a	3,1 a	5,5 a	8,5 a
	Standak Top	57,5 a	63,8 a	121,3 a	3,2 a	5,8 a	9,0 a
C.V. (%)		7,17	5,30	5,85	8,02	8,33	7,12

*Médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 1% de probabilidade, dados em (%) transformados em $\sqrt{(x/100)}$.

Com os dados obtidos no trabalho, não se pode concluir que os microrganismos endofíticos isolados do cacau promovem realmente o crescimento radicular de plantas de soja, sendo necessário estudos mais aprofundados para a verificação da promoção de crescimento radicular, pois na tabela 24 encontrou-se aumento de massa fresca e seca de plantas de soja, pelo tratamento com bactérias endofíticas, mas este resultado não se repetiu nas tabelas 27 e 30, o que acontece também para os dados de volume de raízes produzido, que não se repetiram em todos os experimentos.

6 CONCLUSÕES

A bactéria endofítica do cacau isolado TCB 10, classificada como *Paenibacillus* apresenta potencial de controle biológico para os fitopatógenos de solo *Fusarium solani* (84,82% de inibição no primeiro experimento e 86,70% no segundo experimento), *Rhizoctonia solani* (61,74% de inibição no primeiro experimento e 79,17% no segundo experimento) e *Sclerotinia sclerotiorum* (86,19% de inibição no primeiro experimento e 77,02% no segundo experimento), devido as altas porcentagens de inibição encontradas nos experimentos de cultura pareada *in vitro*.

A bactéria endofítica do cacau isolado TCB 08, classificada como *Staphylococcus*, apresenta potencial de controle biológico para os fitopatógenos de solo *Fusarium solani* (58,46% de inibição no primeiro experimento e 45,48% no segundo experimento), *Rhizoctonia solani* (82,87% de inibição no primeiro experimento e 79,14% no segundo experimento) e *Sclerotinia sclerotiorum* (88,53% de inibição no primeiro experimento e 94,44% no segundo experimento), devido as altas porcentagens de inibição nos experimentos de cultura pareada *in vitro*.

As bactérias endofíticas do cacau isolados TCB 17, TCB 18 e TCB 19, classificadas como *Bacillus* apresentam potencial de controle biológico para o fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum* (96,84%, 98,48% e 88,05%, de inibição no primeiro experimento e 92,09%, 99,02% e 98,63% no segundo experimento, respectivamente), devido as altas porcentagens de inibição nos experimentos de cultura pareada *in vitro*.

A bactéria endofítica isolada do cacau TCB 10, classificada como *Paenibacillus* apresenta potencial de controle de *Rhizoctonia solani* em experimentos *in vivo*, diminuindo a severidade de *R. solani* em plantas de soja, quando utilizada no tratamento de sementes inoculadas.

Não se pode concluir que as bactérias endofíticas realmente proporcionam o crescimento radicular de plantas de soja, devido aos dados não se repetirem em todos os experimentos.

7 REFERÊNCIAS

- ABCBIO. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS EMPRESAS DE CONTROLE BIOLÓGICO; **Panorama e desafios do controle biológico no Brasil**. São Paulo, fev. 2015.
- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. 1. Ed, New York: John Wiley & Sons, 1996.
- ALMEIDA, A. M. R., et al. **Doença da soja** (*Glycine max* L.). In.: Kimati, H., Amorim, L., Bergamin Filho, A., Camargo, L. E. A., Rezende, J. A. M. **Manual de fitopatologia –doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, v.2, p. 642-64, 1997.
- AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (Ed.). **Manual de Fitopatologia: Princípios e conceitos**. São Paulo: Ceres, 2011. 667 p.
- AOKI, T.; O'DONNELL, K.; SCANDIANI, M. M. Sudden death syndrome of soy bean in South America caused by four species of *Fusarium*: *Fusarium brasiliense* sp. nov., *F. cuneirostrum* sp. nov., *F. tucumaniae*, and *F. virguliforme*. **Mycoscience**.V. 46, p. 162–183, 2005.
- ARAÚJO, W. L. et al. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.4906-4914, 2002.
- ARNOLD, A. E., et al. **Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. v. 100, p. 15649–15654, 2003.
- ARNOLD, A. E.; HERRE, E. A. Canopy cover and leaf age affect colonization by tropical fungal endophytes: ecological pattern and process in *Theobroma cacao* (Malvaceae). **Mycologia**, v. 95, p. 388–398, 2003.
- ASSUMPÇÃO L. C. et al. Diversidade e potencial biotecnológico da comunidade bacteriana endofítica de sementes de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, [s.l.], v. 44, n. 5, p.503-510, maio 2009. <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-204x2009000500010>.
- AYERS, W. A.; ADAMS, P.B. **Mycoparasitism and its application to biological control of plant disease**. In: Crop Production Beltsville Symposium in Agricultural Research, vol. 5. (Papavizas, G.C., ed.). New Jersey: Allenheld, Osmun& Co., p. 91–103, 1981.
- AZEVEDO, J.L. et al. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electron J Biotechnol**, v. 3, p. 40–65, 2000.
- AZEVEDO, J.L. **Microrganismos Endofíticos**. Embrapa Meio Ambiente, 1998. Disponível em: https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/Azevedo_Microrganismosedofiticos_000fdrap80702wx5eo0a2ndxoy089f39n.pdf. Acesso em: 25 ago. 2017.

BASHAN Y.; DE-BASHAN, L.E.; **Bacteria—plant growth-promoting**. In: HILLEL D (ed) Encyclopedia of soils in the environment, v. 1, Elsevier. Oxford, UK, p. 103–115, 2005.

BATEMAN D.F. **Pathogenesis and disease**. In: Sneh B, Jabaji-Hare S, Neate S, Dijst G, eds. Rhizoctonia Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p.161–71, 1970.

BELL, A. A.; WHEELER, M. H. **Biosynthesis and functions of fungal melanins**. Rev. Phytopathol, v. 24, p. 411- 451, 1986.

BETTIOL, W. et al. **Supressividade a fitopatógenos habitantes do solo**. In: PLANTAS, Biocontrole de Doenças de; BETTIOL, Wagner; MORANDI, Marcelo A. B. (Ed.). Biocontrole de doenças de plantas: usos e perspectivas. Jaguariuna: Embrapa, cap. 12, p. 187-190, 2009.

BETTIOL, W; MORANDI, M. A. B..**Biocontrole de doenças de plantas: usos e perspectivas**. V. 1, Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009.

BLOEMBERG, G. V.; LUGTENBERG, B. J. J.; Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. **Curr Opin Plant Biol**, v. 4, p. 343–350, 2001.

BOLAND, G.J.; HALL, R. Index of plant hosts of *sclerotinia sclerotiorum*.**Can. J. Plant Pathol**, v. 16, p. 93–108, 1994.

BOLTON, M. D.; THOMMA, B. P. H. J.; NELSON, B. D; **Pathogen profile Sclerotiniasclerotiorum (Lib .) de Bary**. Biology and molecular traits. v. 7, p. 1–16, 2006.

BOOSALIS, M. G. Studies on the parasitism of Rhizoctonia solani Kuehn on Soybeans. **Phytopathology**, v.40, 9 ed., p.820-831,1950.

BOWMAN, J. E.; SINCLAIR, J. B. Effect of Herbicides on Rhizoctonia Seedling Disease of Soybeans in Glasshouse Experiments. **Journal of Phytopathology**, 124: 267–274, 1989. doi:10.1111/j.1439-0434.1989.tb04923.

BRADLEY, C.A.; HARTMAN, G.L.; WAX, L.M.; PEDERSEN, W.L. Influence of herbicides on *Rhizoctonia* root and hypocotyl rot of soy bean. **Crop Protection**, v. 21, p. 679–87, 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Manual de análise sanitária de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: Mapa/ACS, 2009. 200 p.

CANTERI, M. G. et al. SASM-Agri: Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott-Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, Ponta Grossa, v.1, n. 1, p.18-24, dez./jan, 2001.

COLLMER, A.; KEEN, N. T. The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. **Annual Review of Phytopathology**, v.24, p. 383–409, 1986.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira: grãos**. V.11, ed.Brasília: Conab, 164 p., 2017.

COOK, R. J.; BAKER, K. F. **Nature and practice of biological control of plant pathogens**. St. Paul: APS Press, 1983.

COSTAMILAN, L. M.; LHAMBY, J. C. B.; BONATO, E. R. Sobrevivência de fungos necrotróficos em restos de cultura de soja, em sistema de plantio direto. **Fitopatologia Brasileira**, v.24, n.2, p.175-77, 1999.

DIANESE, A. C. et al. Podridão vermelha da raiz: *Fusarium* spp. In: ALMEIDA, A. M.; SEIXAS, C. **Soja: doenças radiculares e de hastes e inter relação com o manejo do solo e da cultura**. Londrina: Embrapa, Cap. 1, 2010. p. 29-44.

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

DUGGAR, B. M. *Rhizoctonia crocorum* (Pers.) DC. and *R. solani* Kuhn (*Corticium vagum* B. and C.), with notes on other species. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 2, p. 403–58, 1915.

EL-MELEIGE, M. A. et al. Efficacy of Bacilli Strains in Growth Promotion and Biological Control of Soilborne *Rhizoctonia* and *Fusarium* on Alfalfa (*Medicago sativa* L.) and Potato (*Solanum tuberosum* L). **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v.27, n. 1, p. 85-92, 2017.

EVANS, H. C.; HOLMES, K. A; THOMAS, S. E. Endophytes and mycoparasites associated with an indigenous forest tree, *Theobroma gileri*, in Ecuador and a preliminary assessment of their potential as biocontrol agents of cocoa diseases. **Mycological Progress**, v.2, 2 ed., p. 149-160, mai. 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11557-006-0053-4>> Acesso em: 21 ago.2017.

FREITAS, T. M. Q.; MENEGHETTI, R. C.; BALARDIN, R. S. Yield losses due sudden death syndrome in soybean. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 4, p.991-996, ago. 2004.

GAGNE-BOURGUE F. et al. Isolation and characterization of indigenous endophytic bacteria associated with leaves of switchgrass (*Panicum virgatum* L.) cultivars. **Journal of Applied Microbiology**, v. 114, 3. Ed., p.836-853, 2013. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jam.12088/full>> Acesso em: 25 ago.2017.

GASPERI A. C.; PRESTES A. M. ; COSTAMILAN L. M. Reação de cultivares de soja a podridão vermelha da raiz causada por *Fusarium solani*. São Paulo, **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 1, p. 544-547, jan. 2003.

GOMES, F. P. **A estatística moderna na agropecuária**. Piracicaba, Potafos, 162 p., 1984.

HAAS D.; BLUMER C.; KEEL C. Biocontrol ability of fluorescent pseudomonads genetically dissected: importance of positive feedback regulation. **Current Opinion in Biotechnology**. V. 11, 3 ed.,p. 290-297, 2000. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958166900000987>> Acesso em 20 ago. 2017.

HAGGAG W. **The role of biofilm exopolysaccharides on biocontrol of plant diseases**. M. Elnashar (Ed.), ISBN:978-953-307-109-1 Biopolymers, Sciyo, 2010. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/biopolymers/the-role-of-biofilm-exopolysaccharides-on-biocontrol-of-plant-diseases>> Acesso em: 25 ago.2017.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOEPPER, J. W.; Bacterial endophytes in agricultural crops. **Can J Microbiol**, v.43, p. 895–914, 1997.

HARDOIM, P. R.; VAN OVERBEEK, L. S.; VAN ELSAS J.D. Properties of Bacterial Endophytes and Their Proposed Role in Plant Growth. **Trends in Microbiology**, v.16, p.463-471, 2008.

HERRERA, S. D. et al. Wheat seeds harbour bacterial endophytes with potential as plant growth promoters and biocontrol agents of *Fusarium graminearum*. **Microbiological Research**, v. 186-187, p.37-43, maio. 2016. Elsevier BV. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2016.03.002>> Acesso em 25 ago.2017.

HERSHMAN, D. E. et al. Influence of planting date and cultivar on soy bean sudden death syndrome in Kentucky. **Plant Disease**, St. Paul, v.74, p.761-766, out. 1990.

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

HOWELL, C.R.; Understanding the Mechanisms Employed by *Trichoderma virens* to Effect Biological Control of Cotton Diseases. **Phytopathology**, v. 96, p. 178-180, 2006.

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

JACCOUD FILHO, D. S. et al. Avaliação Da Eficácia De Fungicidas E *Trichoderma* No Controle Do “Mofo Branco” (*Sclerotinia Sclerotiorum*). Na Cultura Da Soja. Resumos do XXXI Reunião de Pesquisa de Soja da Região Central do Brasil - Brasília, **Resumos...**, DF, agosto. 2010.

KATARIA, H. R.; GISI, U. **Chemical control of *Rhizoctonia* species**. In: Parmeter J. J. R., ed. *Rhizoctonia Species: Taxonomy, Molecular Biology,*

Ecology, Pathology and Disease Control. Berkeley, CA, USA: California Press, p. 537–47, 1996.

KEIJER J. **The initial steps of the infection process in *Rhizoctonia solani*.** In: Sneh B, Jabaji-Hare S, Neate S, Dijst G, eds. *Rhizoctonia Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control*. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p. 149–62, 1996.

KIM, C. H.; KIM, D.S. Extracellular cellulolytic enzymes of *Bacillus circulans* are present as two multiple-protein complexes. **Appl. Biochem. Biotech**, v. 42, p. 83–94, 1993.

KIMATI, H. et al. **Manual de Fitopatologia, Volume 2: Doenças das Plantas Cultivadas**. São Paulo – SP :Agronômica Ceres Ltda. ed. 4, 2005.

KOENNING, S. R., WRATHER, J. A. Suppression of soybean yield potential in the continental United States by plant diseases from 2006 to 2009. Online. **Plant Health Progress**, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1094/PHP-2010-1122-01-RS>> Acesso em: 20 ago.2017.

LANG C.; DÖRNENBURG H. Perspectives in the biological function and the technological application of polygalacturonases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.53, p. 366–75, 2000.

LAZZARETTI, E.; BETTIOL, W. Tratamento de sementes de arroz, trigo, feijão e soja com um produto formulado à base de células e de metabólitos de *Bacillus subtilis*. **Scientia Agricola**, v. 54, n. 1-2, p. 89-96, jan. 1997. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/s0103-90161997000100013>> Acesso em 18 ago.2017.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The Fusarium laboratory manual**. Ed. 1 Ames: Blackwell, 2006.

LIMA, L. H. C.; DE MARCO, J. L.; FELIX, C.R. Enzimas hidrolíticas envolvidas no controle biológico por micoparasitismo. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed.). **Controle Biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, v. 2, p. 263 – 304, 2000.

LIU, W. W. et al. Antagonistic activities of volatiles from four strains of *Bacillus* spp. and *Paenibacillus* spp. against soil-borne plant pathogens. **Agricultural Sciences in China**, v.7, p.1104–1114, 2008.

LODEWYCKX, C. et al. Endophytic bacteria and their potential applications. **Crit Rev Plant Sci**, v. 21, p. 583–606, 2002.

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

MACHADO, J. C. **Tratamento de sementes no controle de doenças**. 1 ed., Lavras: LAPS/UFLA/FAEPE, 2000.

MACHADO, J. C.; ZANCAN, W. L. A. A importância da qualidade sanitária das sementes no controle do mofo branco. In: JACCOUD FILHO, David de Souza; HENNEBERG, Luciane; GRABICOSKI, Edilaine. **MOFO BRANCO: *Sclerotinia sclerotiorum***. Ponta Grossa: Toda Palavra, cap. 17, p. 193-202, 2017.

MALFANOVA, N. et al. Is l-arabinose important for the endophytic lifestyle of *Pseudomonas* spp.? **Archives Microbiology**, v. 195, 1 ed., p. 9-17, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00203-012-0842-x>> Acesso em: 20 ago. 2017.

MANO, H. et al. Culturable surface and endophytic bacterial flora of the maturing seeds of rice plants (*Oryza sativa*) cultivated in a paddy field. **Microbes and Environments**, Tagajo, v. 21, n. 2, p. 86-100, 2006.

MARIANO, R. L. R. Métodos de seleção “in vitro” para controle microbiológico. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 1, p. 369–409, 1993.

MELO, I. S. Agentes microbianos no controle de fungos fitopatogênicos. In: MELO, I. S. & AZEVEDO, J. L. (Eds.) **Controle Biológico**. Jaguariúna, SP: EMBRAPA, v.1., p.17-67, 1998.

MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; MENEZES, M. (Ed.). **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2005. 400 p.

MILANESI, P. M. **Caracterização, toxicidade e patogenicidade de *Fusarium* spp. em genótipos de soja em sistema de plantio direto**. 91 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria. Centro de Ciências Rurais, Santa Maria, 2009.

MORAES, M. H. D.; HENNEBERG, L. Avaliação dos métodos de detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes. In: JACCOUD FILHO, David de Souza; HENNEBERG, Luciane; GRABICOSKI, Edilaine. **MOFO BRANCO: *Sclerotinia sclerotiorum***. Ponta Grossa: Toda Palavra, cap. 18, p. 203-208, 2017.

MORETINI A.; MELO I. S. Formulação do fungo *Coniothyrium minitans* para controle do mofo-branco causado por *Sclerotinia sclerotiorum*. **Pesq. agropec. bras.** v.42 n.2 Brasília fev. 2007.

MORSHED, M. G. et al. Migratory songbirds disperse ticks across Canada, and first isolation of the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, from the avian tick, *Ixodes Auritulus*. **Journal of Parasitology**, v. 91, p. 780-790, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1645/GE-3437.1>> Acesso em: 22 ago. 2017.

MUKHOPADHYAY K. et al. Identification and characterization of bacterial endophytes of rice. **Mycopathologia**, V. 134, 3 ed., p. 151-159, 1996. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007%2FBF00436723?LI=true>> Acesso em: 23 ago. 2017.

MUTAZ, M. A.; HASNAIN, S. Simple and rapid isolation of a novel antibiotic from *Bacillus subtilis* Mz-7. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, v. 29, p. 639–647, 2006.

NAGORSKA, K.; BIKOWSKI, M.; OBUCHOWSKI, M. Multicellular behaviour and production of a wide variety of toxic substances support usage of *Bacillus subtilis* as a powerful biocontrol agent. **Acta Biochimica Polonica**, Warszawa, v.54, n.1, p. 495–508, mar./apr. 2007.

NAING, X.H. et al. Biocontrol of *Fusarium* wilt disease in tomato by *Paenibacillus ehimensis* KWN38. **World J. Microbiol. Biotechnol.** V.31, p. 165-174, 2015.

NALIM, F. A. et al. New species from the *Fusarium solani* species complex derived from perithecia and soil in the Old World tropics. **Mycologia**, v. 103, p. 1302–1330, 2011.

NARASIMHAN, A.; SHIVAKUMAR, S. Optimization of chitinase produced by a biocontrol strain of *Bacillus subtilis* using Plackett-Burman design. **European Journal of Experimental Biology**, Bangalore, v.4, n.4, p. 861-865, jun./jul. 2012.

NASSER, L. C. B.; SPEHAR, C. R. **Podridão branca**. Revista Cultivar Grandes Culturas. 31 Ed., ago.2001. Disponível em:< <http://www.grupocultivar.com.br/site/content/artigos/artigos.php?id=632>> Acesso em: 17 ago. 2017.

NASSER, L. C.; WETZEL, M. M.; FERNANDES, J. M. **Advanced International Course on Seed Pathology**. Passo Fundo: Abrates, 1987.

NEERGAARD, P. - **Seed Pathology**. London: Macmillan, 1979. 839 p.

NETO J. D. et al. Resposta da cana-de-açúcar, primeira soca, a níveis de irrigação e adubação de cobertura. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. Campina Grande, PB; v.10, n.2, p.283–288, 2006.

O'DONNELL, K. et al. Molecular phylogenetic diversity, multilocus haplotype nomenclature, and in vitro antifungal resistance within the *Fusarium solani* species complex. **J. Clin. Microbiol**, v.46, p. 2477–2490, 2008.

O'DONNELL, K. et al. Phylogenetic analyses of *RPB1* and *RPB2* support a middle Cretaceous origin for a clade comprising all agriculturally and medically important fusaria. **Fungal Genet. Biol**, v. 52, p. 20–31, 2013.

O'DONNELL, K. Molecular phylogeny of the *Nectria haematococca* *Fusarium solani* species complex. **Mycologia**, v.92, p. 919–938, 2000.

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

PETRINI, O.; Fungal endophytes of tree leaves. In: ANDREWS, J. H.; HIRANO, S. S. (Eds.). **Microbial Ecology of Leaves**. New York: Springer-Verlag, p. 179-197, 1991.

QIAN G. L. et al. Reducing *Pectobacterium* virulence by expression of an N-acyl homoserine lactonase gene Plpp-aiiA in *Lysobacter enzymogenes* strain OH11. **Biological Control**, v. 52, 1 ed., p. 17-23, jan.2010.

READING, N. C.; SPERANDIO, V. Quorum sensing: the many languages of bacteria. **FEMS microbiology letters**. Amsterdam, v. 254, n. 1, p. 1-11, jan. 2006. Disponível em: <<https://academic.oup.com/femsle/articlelookup/doi/10.1111/j.1574-6968.2005.00001.x>> Acesso em: 22 ago.2017.

ROMEIRO, R. S. **Controle biológico de doenças de plantas: fundamentos**. Viçosa – MG, Ed. UFV, , 2013a, 269 p.

ROMEIRO, R. S. **Técnica de microgota para contagem de células viáveis bacterianas em uma suspensão**. Viçosa – MG, Ed. UFV, 2013b, 7 p.

ROMERO A. M. et al. Effect of *Azospirillum*-mediated plant growth promotion on the development of bacterial diseases on fresh-market and cherry tomato. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, 4. Ed., p.832-838, 2003. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2672.2003.02053.x/full>> Acesso em: 25 ago.2017.

ROTHROCK, C. S.; PHILLIPS, D. V.; HOBBS, T. W. Effects of cultivar, tillage and cropping system on infection of soybean by *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* and southern stem canker symptom development. **Phytopathology**, v.78, p.266-70, 1988.

RUBINI, M.R. et al. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicios*, causal agent of ‘witches’ broom disease. **International Journal of Biological Sciences**, v. 1, p. 24–33, 2005.

SARTORI, F. F. et al. Análise, distribuição e quantificação do “mofo branco” (*Sclerotinia sclerotiorum*) em diferentes regiões produtoras do estado do Paraná. XX Encontro Anual de Iniciação Científica – EAIC X Encontro de Pesquisa – EPUPEG Anais do XX EAIC – **Anais...** ISSN:1676-0018 UEPG, Ponta Grossa – PR, 2011.

SCHERM, H.; YANG X. B. Development of sudden death syndrome of soy bean in relation to soil temperature and soil water matric potential. **Phytopathology**, v.86, n.6, p.642- 649, 1996.

SCHWARTZ, H.F.; HARVESON, R.M.; STEADMAN, J.R. **Dry Bean Production and Pest Management**.Crop Series|Diseases.Fact Sheet, n. 2. 2011.

SHORT, G. E; LACY, M. L. Germination of *Fusarium solani* f. sp. *pisi* chlamydospores in the spermosphere of pea. **Phytopathology**, v. 64, p. 558–562, 1974.

SINCLAIR, J. B.; BACKMAN, P. A.; **Compendium of Soy bean Diseases**. 3rd edn. St Paul, MN, USA: APS Press, 1989.

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

SRIVIDYA, S., SASIREKHA, B., ASHWINI, N. Multifarious antagonistic potentials of rhizosphere associated bacterial isolates against soil borne diseases of Tomato. **Asian Journal Plant Science Research**, Bangalore, v. 2, n.2, p. 180–186.apr./mai, 2012.

STEADMAN, J. R.; **White Mold – a serious yield – limiting diseases of bean**. Pant Disease, v.67, n.4, p.346-350, 1983.

STEENHOUDT, O.; VANDERLEYDEN, J. Azospirillum, a free-living nitrogenfixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiol Ver**; v. 24, p. 487–506, 2000.

SUNDARAMOORTHY, S.; BALABASKA P. Evaluation of Combined Efficacy of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* in Managing Tomato Wilt Caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol). **Plant Pathology Journal**, v.12, p. 154-161, 2013.

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

TRIGIANO, R. N.; WINDHAM, M. T.; WINDHAM, A. S. **Fitopatologia: conceitos e exercícios de laboratório. 2. ed.** Porto Alegre: Artmed, 2010. 576 p.

VAN KAN J. A. Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. **Trends in Plant Science**, v.11, 5 ed., p. 247-253, mai. 2006. Disponível: < <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2006.03.005>> Acesso em: 19 ago. 2017.

WESELOWSKI, B. et al. Isolation, identification and characterization of *Paenibacillus polymyxa* CR1 with potentials for biopesticide, biofertilization, biomass degradation and biofuel production. **BMC Microbiology**: series, v. 16, 2016. Disponível em:< <https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12866-016-0860-y>>. Acesso em 29 ago. 2016.

WILSON, D. **Environmental and Microbial Relationships**. Springer- Verlag Berlin Heidelberg 1997, 2007. 2. Ed, p. 214.

WYLLIE T.D. Effect sof metabolic by-product of *Rhizoctonia solani* on roots of Chippewa soy bean seedings. **Phytopathology**, v.52, p. 202–6, 1962.

YOSHIDA, S. et al. Antimicrobial activity of culture filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 isolated from Mulberry leaves. **Phytopathology**, v.91, p. 181–187, 2000.

YU, Q. et al. Characterization and evaluation of *Staphylococcus* sp. Strain LZ16 for the biological control of rice blast caused by *Magnaporthe oryzae*. **Biological Control**, Elsevier BV. v. 65, n. 3, p.338-347, jun. 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2013.03.016>.

ZHANG S. et al. Growth and Survival of Fusarium solani-F. oxysporum Complex on Stressed Multipurpose Contact Lens Care Solution Films on Plastic Surfaces In Situ and In Vitro. **Cornea**, v. 25, 10 ed., p. 1210-1216, dez. 2006.