



**PAUL ESTEBAN PHEREZ PERRYNY**

**IMPACTOS DE TRATAMENTOS FOLIARES NA  
ABUNDÂNCIA DE BACTÉRIAS E FUNGOS DO FILOPLANO  
E SEU POTENCIAL NO CONTROLE DE *Fusarium  
verticillioides* EM MILHO**

**LAVRAS-MG**

**2018**

**PAUL ESTEBAN PHEREZ PERRYNY**

**IMPACTOS DE TRATAMENTOS FOLIARES NA ABUNDÂNCIA DE  
BACTÉRIAS E FUNGOS DO FILOPLANO E SEU POTENCIAL NO CONTROLE DE  
*Fusarium verticillioides* EM MILHO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia para obtenção de título de Mestre.

Prof. Dr. Flávio H. V. Medeiros  
Orientador

**Lavras, MG  
Março/2018**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Pherez Perrony, Paul Esteban.

Impactos de tratamentos foliares na abundância de bactérias e fungos do filoplano e seu potencial no controle de *Fusarium verticillioides* em milho / Paul Esteban Pherez Perrony. - 2018.  
80 p. : il.

Orientador(a): Flávio Henrique Vasconcelos De Medeiros.

.  
Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. *Bacillus subtilis*. 2. Controle biológico. 3. Abundância. I. Vasconcelos De Medeiros, Flávio Henrique. . II. Título.

**PAUL ESTEBAN PHEREZ PERRYNY**

IMPACTOS DE TRATAMENTOS FOLIARES NA ABUNDÂNCIA DE BACTÉRIAS E FUNGOS DO FILOPLANO E SEU POTENCIAL NO CONTROLE DE *Fusarium verticillioides* EM MILHO

IMPACTS OF DIFFERENT FOLIAR TREATMENTS ON FUNGI AND BACTERIA OF THE PHYLLOPLANE AND THEIR POTENTIAL TO CONTROL *Fusarium verticillioides* IN MAIZE

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia para obtenção de título de Mestre.

APROVADA em 9 de março de 2018.

Dr. Flávio Henrique V. Medeiros \_\_\_\_\_ UFLA

Dr. Whasley Ferreira Duarte \_\_\_\_\_ UFLA

Dr. Daniel Henrique Ribeiro \_\_\_\_\_ UFLA

Dr. Henrique Monteiro Ferro \_\_\_\_\_ BIOVALENS

Prof. Dr. Flávio H. V. Medeiros

Orientador

**Lavras, MG**

**Março/2018**

A Deus, o desenhador inteligente  
que por meio de sua intervenção na natureza  
e seus milagres na minha vida confirmo sua existência,

OFEREÇO

Aos meus pais Gustavo Pherez e Decsi Perrony  
por sua inspiração em meus estudos e exemplo na ciência.  
A minha amada esposa, por sua confiança, fidelidade e apoio à distância durante este tempo,

DEDICO

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Fitopatologia junto ao seu corpo docente, por proporcionarem a realização deste curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro concedido para a realização do curso.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico (CNPq) pelo apoio financeiro no projeto de pesquisa.

Ao professor e amigo Flávio Henrique Vasconcelos De Medeiros, por acreditar em mim, oferecer sua confiança e ser fonte de inspiração e apoio nos momentos que precisei de uma palavra de ânimo.

À técnica de laboratório Luísa Reis pela sua ajuda e amizade e aos outros técnicos do Departamento de Fitopatologia da UFLA, pelo apoio durante a pesquisa.

Aos companheiros Leonardo Silva de EMBRAPA meio ambiente e Silvino Moreira do laboratório de Microscopia Eletrônica da UFLA pela colaboração durante a pesquisa.

Aos diversos companheiros de graduação por oferecer-me apoio no laboratório e no campo.

Ao meu grande amigo Cesar Correa por sua sincera amizade e ajuda sempre que precise apoio na estatística.

À minha amiga Rafa, quem ofereceu sua ajuda sempre que lhe procurei e dava para mim sua contribuição com sua autêntica forma de ser.

A todos aqueles que me contribuíram dando sugestões e apoio nos meus trabalhos, meus únicos e sinceros agradecimentos.

**MUITO OBRIGADO!**

A Ciência sem a religião é manca, a Religião sem ciência é cega”

**(Albert Einstein, 1941)**

## RESUMO

Nas regiões tropicais e subtropicais onde o milho é produzido têm se perdas quantitativas e qualitativas dos grãos associados ao fungo *Fusarium verticillioides* (*Fv*). Dentre as estratégias de manejo, o controle químico é a mais utilizada. Entretanto, estudos mostram vários produtos registrados para o controle do fungo não apresentando nenhum efeito na incidência do patógeno e redução de fumonisinas. O uso de agentes de biocontrole (BCAs) pode amenizar ou reduzir este problema, atuando com diferentes mecanismos de ação ainda pouco estudados. O objetivo deste trabalho foi avaliar o impacto de diferentes tratamentos foliares na diversidade de fungos e bactérias do filoplano e seu potencial no controle de *Fv* em milho. A coleção microbiana foi obtida a partir de amostras do filoplano (folhas e espiga) de plantas de milho inoculadas com *Fv* e tratadas anteriormente em dois estágios fenológicos distintos (V9 e R1) com um fungicida - Azoxystrobin + Ciproconazole (Az), um agente de biocontrole - *Bacillus subtilis* (*Bs*) BIOUFLA2 e os tratamentos controle (água e meio de cultura bacteriano YPD). Verificou-se que quando são feitas duas aplicações de *Bs*, a porcentagem de bactérias e fungos antagonistas nativos do filoplano contra *Fv* aumentou em 25 e 27,3% respectivamente. Entretanto, as duas aplicações do fungicida em diferentes estágios fenológicos no milho reduziu as comunidades de antagonistas (11,6 e 9%). Dos testes conduzidos no campo, foram selecionados e preservados 100 fungos e 140 bactérias. Sob condições controladas (*in vitro*) foi avaliada a incidência e severidade de *Fv* em grãos de milho canjica, inoculadas com os possíveis antagonistas sete dias antes do patógeno e simultaneamente. Trinta e quatro bactérias e treze fungos foram selecionados por terem atividade inibitória contra *Fv*, a maioria oriunda do tratamento exclusivo com *Bs*. Estes isolados foram avaliados para conhecer os mecanismos de ação envolvidos no biocontrole. A produção de antibióticos pelo método de confrontação direta contra patógeno e o índice de sobreposição do nicho (NOI) foram conduzidos para selecionar os melhores antagonistas no ensaio. Para visualização da interação em microscopia de varredura foram usados discos de 5 mm oriundos da zona de inibição entre os antagonistas e o patógeno, estes foram fixados em Karnovsky até processamento padrão para microscopia eletrônica de varredura. Foram obtidas e identificadas duas bactérias, (*Bacillus amyloliquefaciens* B45,2) e (*Burkholderia gladioli* B100) como produtoras de antibióticos e três fungos (*Phomopsis* sp F42, *Epicoccum* sp. F46 e *Trichoderma* sp F8) com evidência de micoparasitismo e produção de metabolitos contra *Fv*. Deste isolados, F8, F46 e B100 competiram pelo espaço e os nutrientes no milho contra *Fv*. Os resultados comprovam o uso potencial de *Bs* no manejo integrado de *Fv* em campo, atuando na seleção, conservação e proliferação dos microrganismos antagonistas nativos da filosfera de milho. Assim, deve-se investigar o potencial destes isolados em campo, no tratamento de sementes ou em aplicações foliares no manejo de grãos ardidos.

**Palavras chaves:** *Bacillus subtilis*. Filosfera. Controle biológico. Controle Químico. Microbioma cultivável. Abundância

## ABSTRACT

In the tropical and subtropical regions where maize is produced there are quantitative and qualitative losses of the grains associated to the fungus *Fusarium verticillioides* (*Fv*). Among management strategies, chemical control is the most used. However, studies show several products registered for the fungus control, showing no effect on the incidence of the pathogen and reduction of fumonisins. The use of biocontrol agents (BCAs) can soften or reduce this problem, acting with different mechanisms that is still little studied. The goals of this work was to evaluate the impact of different foliar treatments on fungi and bacteria of the phylloplane and their potential to control *Fv* in maize. The microbial collection was obtained from maize leaves and spike inoculated with *Fv* and previously treated in two different phenological stages (V9 and R1) with fungicide - Azoxystrobin + Ciproconazole (Az), BCAs - *Bacillus subtilis* BIOUFLA2 (*Bs*) and control treatments (water and bacterial culture medium YPD). It was found that when two applications of *Bs* are made, the percentage of native antagonistic bacteria and fungi of the phylloplane against *Fv* increased 25 and 27.3% respectively. However, the two applications of the fungicide at different phenological stages in maize reduced the communities of antagonists. From the field assays, 100 fungi and 140 bacteria were selected and preserved. Under controlled conditions the incidence and severity of *Fv* were evaluated in maize grains inoculated with the selected antagonists seven days before and simultaneously with the pathogen. Thirty-four bacteria and thirteen fungi were selected for having inhibitory activity against *Fv*, the majority coming from the exclusive treatment with *Bs*. These isolates were evaluated concerning their mechanisms of action. Antibiosis and niche overlap index (NOI) tests were conducted to select the best antagonists. For electronic microscopy analysis, 5 mm discs were used from the zone of interaction between the antagonists and the pathogen and these were fixed in Karnovsky until standard processing. Two bacteria (*Bacillus amyloliquefaciens* B45,2) and (*Burkholderia gladioli* B100) were obtained and identified as antibiotics producers. Three fungi (*Phomopsis* sp F42, *Epicoccum* sp. F46 and *Trichoderma* sp F8) showed evidence of mycoparasitism and production of metabolites against *Fv*. Among these isolates, F8, F46 and B100 competed for space and nutrients in maize against *Fv*. The results confirmed the potential use of *Bs* in the integrated management of *Fv* in the field, acting in the selection, conservation and proliferation of the antagonistic microorganisms native to the maize phyllosphere. Thus, the potential of these isolates in the field, in the treatment of seeds or in foliar applications in the management of rotten grains should be investigated.

**Key words:** *Bacillus subtilis*. Phyllosphere. Biological control. Chemical Control. Cultivated microbioma. Abundance.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO .....	4
2.1 <i>Fusarium verticillioides</i> e sua importância na cultura do milho .....	4
2.2 Controle químico e biológico como estratégia de manejo do <i>Fusarium verticillioides</i> .....	5
2.3 Mecanismos de ação dos agentes de biocontrole .....	7
2.4 Efeito dos tratamentos químicos e biológicos na diversidade microbiana .....	11
3. OBJETIVOS .....	14
3.1 Objetivos específicos.....	14
3.2 Hipótese científica.....	14
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	15
4.1 Locais de instalação do experimento, preparo do solo e tratamentos culturais .....	15
4.2 Ensaio 1 - Composição e inoculação dos tratamentos no campo .....	15
4.2.1 Inoculação do patógeno <i>Fusarium verticillioides</i> .....	16
4.3 Coleta de amostras de folhas e espigas .....	17
4.4 Ensaio 2 – Isolamento de fungos e bactérias do filoplano .....	18
4.4.1 Fungos totais .....	18
4.4.2 Bactérias totais .....	18
4.4.3 Bactérias produtoras de endósporos .....	18
4.5 Purificação e preservação de microrganismos .....	19
4.6 Ensaio 3 – Seleção e avaliação <i>in vitro</i> dos possíveis agentes de biocontrole em grãos de milho canjica .....	19
4.6.1 Inoculação do patógeno uma semana após do antagonista .....	19
4.7.1 Avaliação da produção de possíveis antibióticos pelos microrganismos antagonistas .....	21
4.8 Alterações celulares nos antagonistas e o patógeno por microscopia de varredura no teste de antibioses e competição.....	23
4.9 Caracterização filogenética e identificação das bactérias antagonistas.....	25
4.9.1 Caracterização filogenética e identificação dos fungos antagonistas .....	26
4.10 Análises estatísticas .....	26
5.1 Isolamento de fungos e bactérias do filoplano .....	27
5.2 Seleção e avaliação <i>in vitro</i> dos possíveis agentes de biocontrole em grãos de milho canjica .....	27
5.3 Identificação dos principais mecanismos de ação envolvidos pelos microrganismos .....	37
5.3.3 Alterações celulares observadas por microscopia de varredura no teste de antibioses e identificação molecular .....	46
6. CONCLUSÕES.....	63

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o terceiro maior produtor de milho (*Zea mays L.*) do mundo, com uma produção em 2016 de 97,84 milhões de toneladas e as estimativas para as próximas safras são maiores (99 milhões de toneladas) (CONAB, 2018). A importância da cultura é devida à multiplicidade de usos alimentícios que favorecem o desenvolvimento socioeconômico e segurança alimentar (CASA et al., 2006; FANCELLI & DOURADO, 2000). Mas com o aumento da produção, incrementam também os problemas fitossanitários, onde os fungos filamentosos são os mais importantes, comprometendo o rendimento da cultura, reduzindo a qualidade dos grãos devido à produção de metabólitos secundários (micotoxinas) que têm efeito comprovado na formação de células cancerígenas esofágicas no homem e na proliferação de doenças gastrointestinais nos animais (CHU & LI, 1994; FREIRE et al., 2007; RHEEDER et al., 1992; WANG et al., 1992; MUNKVOLD & DESJARDINS, 1997; CARVALHO, 2010).

Entre os principais patógenos nas regiões produtoras tropicais e subtropicais úmidas na cultura de milho, *Fusarium verticillioides* é responsável pelas maiores perdas de grãos mundialmente (LOPEZ et al., 2016; RODRIGUEZ et al., 2007; MARASAS et al., 1984). *F. verticillioides* é um fungo filamentoso, pertencente ao Filo Ascomycota, Ordem Hypocreales e faz parte do complexo de espécies de *Fusarium fujikuroi* (FFSC) (COVARELLI et al., 2012; LOGRIECO et al., 2002). Os principais problemas do patógeno na cultura estão relacionados a podridão de espiga (que conseqüentemente acarretam a produção de grãos ardidos) e do colmo. Outra característica deste patógeno é a sobrevivência saprofítica em resíduos culturais (MADRIGAL et al., 2015).

As micotoxinas produzidas por *F. verticillioides* são as fumonisinas dos tipos FB1, FB2 e FB3 (COSTA et al., 2013; SMITH & SEDDON, 1998) sendo a FB1 a mais produzida (80%) e recorrente (GORYACHEVA et al., 2007). Durante o ano de 2015, as perdas por grãos ardidos no planeta chegaram próximo a 100 milhões de toneladas (FAO, 2015). Por esta razão foram estabelecidos limites máximos permitidos de micotoxinas (2 µg/g de fumonisinas) nos grãos destinados à alimentação e produção de rações no mundo. No entanto, para o Brasil são permitidos limites de 4 µg/g de fumonisinas em grãos para processamento (KIM et al., 2011; DOU, 2011).

Uma das principais estratégias no controle do grão ardido é o uso de fungicidas (MIGUEL et al., 2015; OLOTUAH et al., 2016). Para o Brasil, existem 17 produtos químicos registrados para o controle de grão ardido, dos quais mais da metade são para tratamento da semente (AGROFIT, 2017), sendo ainda necessário aplicações de outros produtos nos estádios de desenvolvimento da planta (DEISING et al., 2008). No entanto, o uso de agrotóxicos gera contaminação ambiental, fitotoxicidade, aumentos nas taxas residuais e principalmente desenvolvimento de resistência do patógeno ao princípio ativo, além de gasto econômico (YOON et al., 2013; AKTAR et al., 2009). Os fungicidas químicos agem no campo formando um vácuo biológico (ausência de vida), na área onde foram aplicados, permitindo a rápida multiplicação e livre colonização do primeiro microrganismo que chegue ao órgão, onde quase sempre o mais exitoso é o patógeno (GHINI & BETTIOL, 2005). O aumento no número de aplicações de um mesmo fungicida no milho para o controle de *F. verticillioides*, não tem tido efeito no controle dos grãos ardidos, mas sim para as principais doenças foliares que se apresentam no milho (MUNHOZ et al., 2015). Estas aplicações podem aumentar a incidência do patógeno nos grãos, como também o teor de fumonisinas (LANZA et al., 2016). No entanto, as combinações de uma primeira aplicação do fungicida em conjunto a uma segunda aplicação de *Bacillus* sp, podem resultar na redução da incidência do patógeno no campo como também no teor de fumonisinas totais. (ZANOTTO et al., 2016).

O controle biológico é uma estratégia alternativa promissora no manejo dos patógenos da filosfera e rizosfera, já que os microrganismos antagonísticos não geram taxas residuais de resistência no tratamento da planta e contam com diferentes mecanismos de ação no controle, além de conseguirem induzir o crescimento vegetal até ativar o sistema de defesa na planta (BATSON et al., 2000; KERRY, 2000; EHRLICH et al., 2004). O uso de diferentes gêneros de bactérias antagonistas tem sido relatado no milho (BOLSONI-SILVA et al., 2008), dos quais os mais predominantes são: *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp. e representantes da família Enterobacteriaceae. O gênero *Bacillus* se diferencia das outras bactérias pela capacidade de formação de endósporos e produção de antibióticos com amplo espectro, fato que atua na redução do teor de micotoxinas (DE JENSEN et al., 2002; BACON et al., 2001; CAVAGLIERI et al., 2005; ZANOTTO et al., 2016; PEREIRA et al., 2010)

O uso de estratégias de controle (químicas ou biológicas) para diversos patógenos nas plantas, geram efeitos nas comunidades microbianas nativas associadas à filosfera e

rizosfera (FIGUEROA et al., 2016). A compreensão da ecologia microbiana da filosfera e rizosfera no milho e os mecanismos de ação envolvidos pelos antagonistas, podem contribuir no desenvolvimento de novas estratégias no manejo integrado de doenças, diminuindo a dependência de produtos químicos, melhorando a sanidade das plantas, conservando a diversidade microbiana e protegendo a saúde humana (FILION et al., 2004; BENEDEZI et al., 2012).

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o impacto de tratamentos foliares na abundância de bactérias e fungos do filoplano e seu potencial no controle de *Fusarium verticillioides* em milho.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 *Fusarium verticillioides* e sua importância na cultura do milho

No começo do século XX as doenças ocasionadas por fungos começaram a ser mais importantes, com perdas nas áreas mais produtivas do Brasil (COSTA et al., 2009). Os fungos *Aspergillus flavus*, *Penicillium oxalicum*, *Stenocarpella maydis*, *Stenocarpella macrospora* e o agrupamento de quatro espécies diferentes de *Fusarium* (*F. nygamai*, *F. thapsinum*, *F. andiyazi* e *F. verticillioides*) que pertencem ao complexo de espécies de *Fusarium fujikuroi* (FFSC) são os principais patógenos que atacam esta cultura (MADRIGAL et al., 2015). Podendo produzir micotoxinas (grão ardido), podridão de espiga e caule (FANTINI & DUARTE, 2009), sendo que *F. verticillioides* é principal responsável por gerar as maiores perdas de grãos no milho em todo o planeta (LOPEZ et al., 2016; RODRIGUEZ et al., 2007).

O patógeno *F. verticillioides* é um habitante natural do solo, sendo a espécie comumente mais reportada na cultura do milho nas regiões tropicais e subtropicais úmidas (COVARELLI et al., 2012; LOGRIECO et al., 2002; MARASAS et al., 1984, LESLIE, 1990). Esse patógeno pode ser encontrado sobrevivendo nos resíduos culturais de plantas de milho, no caule, espiga e nos grãos. Muitas vezes os sintomas que se apresentam no campo podem ser variados, até incluso se podem apresentar de forma assintomática, fato que impossibilita o manejo adequado da doença no tempo (BACON et al., 1996).

Segundo Oren et al., (2003) a infecção de *F. verticillioides* no milho pode acontecer de duas formas diferentes: a mais comum e mais importante é pela liberação dos conídios ao meio ambiente seguido pela disseminação dos mesmos pelo vento. A infecção começa quando o conídio chega ao estilo-estigma conseguindo assim a colonização e infecção do grão, mas apenas uma pequena parte dos grãos pode manifestar os sintomas. Outra forma de infecção do fungo é pela contaminação nas sementes do milho, desta forma o fungo pode se movimentar pelos vasos condutores da planta afetando o caule, até conseguir a infecção dos grãos. Porém, muitos grãos podem ficar assintomáticos e embora essa estratégia seja muito eficiente é a menos utilizada pelo patógeno (HEADRICK, & PATAKY, 1991; MUNKVOLD & CARLTON, 1997; KEDERA et al., 1992; GELDERBLUM et al., 1998; LESLIE et al., 1990).

No ano 2015 as perdas de grãos por micotoxinas chegaram próximas de 100 milhões de toneladas (FAO, 2015). As micotoxinas produzidas por *F. verticillioides* são as fumonisinas dos tipos FB1, FB2 e FB3 (COSTA et al., 2013; SMITH & SEDDON, 1998) sendo a FB1 a mais produzida seguida da FB2 (GORYACHEVA et al., 2007). Devido à problemática gerada pela produção de micotoxinas em grãos de milho, departamentos internacionais estabeleceram no ano 2006 limites máximos permitidos (2 µg/g de fumonisinas nos grãos) em grãos destinados à alimentação e produção de rações (KIM et al., 2011). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) no ano 2014 estabeleceu um limite máximo de 4 µg/g de fumonisinas em grãos para processamento (DOU, 2011).

A importância das micotoxinas, além das perdas econômicas é pela capacidade em gerar intoxicações nos animais, como leucoencefalomalácia nos cavalos, edemas pulmonares nos suínos até problemas hepatocarcinogênico nos ratos (SYDENHAM et al., 1992; HOWARD et al., 1999; NELSON et al., 1993; MYUNG et al., 2009; GELDERBLOM et al., 2002). Em humanos foi encontrada a proliferação de células cancerígenas no esôfago, toxicidade hepática e renal (FANDOHAN et al., 2005; UENO, 2000; SWAMY et al., 2002; MYUNG et al., 2012).

## **2.2 Controle químico e biológico como estratégia de manejo do *Fusarium verticillioides***

Uma das principais estratégias de controle para o grão ardido (*Fusarium verticillioides*) é o uso de fungicidas. No Brasil para o manejo desta doença, estão registrados 17 produtos, dos quais mais da metade são para o tratamento da semente (AGROFIT, 2017). Mas, os tratamentos da semente no começo do plantio nem sempre se refletem na proteção completa da planta e garante altos índices de produtividade, sendo necessárias aplicações aéreas após o aparecimento de sintomas da doença na cultura (GODOY & HENNING, 2008; GOULART, 1999). O Brasil utiliza grandes quantidades de produtos químicos para o controle de grãos ardidos, apesar do uso desses produtos gerarem contaminação ambiental, toxicidade residual e o mais importante, o desenvolvimento de resistência do patógeno ao princípio ativo (YOON et al., 2013; AKTAR et al., 2009; DEISING et al., 2008). Juliatti et al., (2007) obtiveram resultados positivos no controle de *Fusarium verticillioides* com a aplicação do controle químico foliar no campo quando foram combinados os Triazóis às Estrobirulinas

(Piraclostrobin + Epoxiconazole, Azoxystrobin + Ciproconazole e Azoxystrobin) e uso de híbridos resistentes, ocasionando um aumento na produtividade. No entanto, o aumento no número de doses do produto não favoreceu o controle da doença, mas incrementou a porcentagem de grãos ardidos no campo (FANTINI & DUARTE et al., 2009). Miguel et al., (2015) comprovaram o efeito de fludioxonil + metalaxyl-M na morfologia micelial de *F. verticillioides*, onde aplicações do produto geraram hifas mortas, alterações na parede celular, proliferação de hifas com septos até inibição micelial. Porém, as aplicações do produto químico favoreceram a esporulação do patógeno e produção de micotoxinas (FB1), assemelhando-se aos resultados de ZANOTO et al., (2016). Um dos principais produtos usados (quase 100% nos casos) para tratamentos de sementes e cobertura de grãos para plantio direto de milho em campo é o fungicida “Fludioxonil”, sendo que alguns estudos têm relatado que não existe efeito significativo no controle do patógeno *F. verticillioides* quando foi avaliado *in vitro* (RODRIGUEZ, 2008).

O controle biológico é uma estratégia promissora no manejo de patógenos da fitosfera em plantas de milho (BATSON et al., 2000; KERRY, 2000; EHRLICH et al., 2004). Gêneros de bactérias antagonistas com maior predominância no campo tem sido relatada por BOLSONI-SILVA et al., (2008), das quais: *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp. e representantes da família Enterobacteriaceae são os mais importantes.

Neste contexto o gênero *Bacillus* sp se diferencia das outras bactérias, pela capacidade de formação de endósporos e pela produção de antibióticos com amplo espectro (DE JENSEN et al., 2002; KIM et al., 1997; BACON et al., 2001; LEIFERT,1995; DOUMBOU, 2001). Cavaglieri et al., (2005) conseguiram reduzir a colonização de *F. verticillioides* no rizoplano com aplicações de *B. subtilis* numa concentração de  $10^8$  UFC ml<sup>-1</sup> em casa de vegetação e *in vitro* encontraram inibição do crescimento do patógeno em até 78%, identificando a antibiose como o principal mecanismo de ação. Outra característica desta bactéria é a redução na produção de micotoxinas (Fumonisinias), diminuindo até 50% *in vitro* (CAVAGLIERI et al., 2005; BACON et al., 2001; LIU et al., 2010; PEREIRA et al., 2010).

Além do gênero *Bacillus* sp; existem outras bactérias antagonistas de *F. verticillioides*. FIGUEROA et al., (2016), conseguiram selecionar 42 isolados associados à microbiota de plantas de milho, onde os gêneros: *Pseudomona* sp., *PaeniBacillus* sp. e

*Bacillus* sp, foram os mais eficientes, conseguindo inibir o crescimento de *F. verticillioides* até 45%. Chandra et al., (2009) reduziram a incidência do patógeno com aplicações de *Pseudomona flourescens* em condições tanto *in vitro* como em *in vivo*, resultando em um incremento no vigor da planta, aumentando a germinação e peso das plantas além de reduzir o teor de fumonisinas. De forma similar Cavaglieri et al., (2004) encontraram inibição do patógeno até 80% em condições *in vitro* por parte da espécie *Azotobacter armenicus* e redução da colonização das raízes em casa de vegetação.

O tratamento de sementes com microrganismos é uma estratégia eficiente para a introdução de agentes antagônicos (DAWAR et al., 2008; CORREA et al., 2009). Pereira et al., (2007) verificaram que os isolados de *B. amyloliquefaciens* e *Microbacterium oleovorans*, reduzindo significativamente os propágulos de *F. verticillioides* e o teor de fumonisinas em grãos de milho, quando foram comparados em relação às aplicações de tratamento das sementes com produtos químicos.

Alguns fungos têm sido relatados também como antagonistas de *F. verticillioides*. Castro del angel, (2013) avaliou três espécies diferentes de *Trichoderma* spp, onde foi observado a redução da incidência e severidade do patógeno em 67% em condições de campo. De forma similar FERRIGO et al., (2014) encontraram o isolado de *T. harzianum* reduzindo os sintomas do patógeno, além da ativação do sistema de defesa na planta.

### **2.3 Mecanismos de ação dos agentes de biocontrole**

O conhecimento dos mecanismos de ação no controle biológico permite obter novas estratégias que possibilitam o controle alternativo dos patógenos. Muitas das estratégias que um agente de biocontrole usa contra o patógeno são baseadas nas interações ecológicas no nicho, tais como parasitismo ou micoparasitismo, competição por espaço e nutrientes, antibiose, indução de resistência nas plantas e promoção de crescimento (HALFELD-VIEIRA et al., 2015).

A competição é uma interação indireta resultante pela demanda do mesmo recurso (nutriente ou espaço) entre duas ou mais populações de microrganismos (DROBY & CHALUTZ, 1994). O biocontrole existe quando o agente antagônico reduz a disponibilidade da substância requerida pelo patógeno no espaço, limitando assim seu crescimento. A maioria

das vezes o agente antagônico sempre é mais eficiente em capturar os nutrientes (HANDELSMAN & PARKE, 1989). Por exemplo Castro del angel (2013) encontrou redução da colonização de *F. verticillioides* no colmo de plantas de milho quando foram feitas aplicações de *Trichoderma harzianum*, *T. longibrachiatum* e *T. asperellum*, além de reduzir a severidade da doença em 78 %. De outra forma Chandra et al., (2009) conseguiram aumentar o rendimento e diminuir a incidência da doença, com o tratamento de sementes no milho com *P. flourescens*, atribuindo o efeito antagônico à rápida colonização no solo e consequente colonização das raízes, prevenindo a multiplicação do patógeno *F. verticillioides*. Medeiros et al., (2012) concluíram que a competição por nutriente e pelo espaço é o modo de ação mais aceito dos agentes antagônicos existentes na natureza.

A antibiose é a produção por parte de um microrganismo antagônico de metabólitos específicos ou inespecíficos, agentes líticos ou enzimas de baixo peso molecular que geram destruição ou inibição de um agente patogênico (MELIN et al., 2007). Para que o metabólito seja eficiente no controle, ele deverá ser produzido *in situ* pelo microrganismo antagônico no momento exato à interação com o patógeno e nas quantidades suficientes (EL GHAOUTH et al., 2002). O antagonismo direto exercido por *B. subtilis* foi relatado por Leelasuphakul et al., (2008), onde 23 estirpes diferentes de *Bacillus* spp. isoladas no solo mostraram inibição *in vitro*, mas só nove estirpes inibiram até 80% a doença. A síntese de Substâncias antimicrobianas e a produção de compostos voláteis são os mecanismos de ação envolvidos no controle da doença por *B. subtilis*. Substâncias inibitórias relatadas pelo mesmo autor foram encontradas como: iturina A, amicoumacina A, surfactina e fengicina. Estas famílias de peptídeos são compostas de sete ou dez  $\alpha$ -aminoácidos ligados a um único  $\beta$ -amino (iturinas) ou  $\beta$ -hidroxi (surfactinas e fengicinas) ácido graxo e podem ter atividade antifúngica e antibacteriana intensa quando estão juntas ou separadas (MAGET-DANA et al., 1992). Palazzini et al., (2016) descreveram que isolados de *B. subtilis* exercem controle de *F. graminearum*, identificando o mecanismo de ação usado principalmente pelo agente antagônico como antibiose devido aos lipopeptídeos.

O aproveitamento e uso de um organismo como fonte de alimento é conhecido como parasitismo. O parasitismo gera destruição direta do patógeno e lise estrutural celular (BULL et al., 1998). Fungos alimentando-se de outros fungos são conhecidos como micoparasitas (BAKER & COOK, 1974). Muitos micoparasitas possuem uma ampla gama de hospedeiros,

possibilitando o desenvolvimento de produtos biológicos formulados (ADAMS, 1990). O micoparasitismo começa com o crescimento quimiotrópico em direção aos fungos alvos que estão produzindo compostos químicos. Depois, o microrganismo passa por uma fase de reconhecimento celular onde lectinas produzidas pelo patógeno e receptores de carboidratos do agente de biocontrole estão envolvidas. Continuando com a aderência e a degradação da parede celular, onde o fungo antagonico pode produzir enzimas quitinolíticas (quitinases e a  $\beta$  1,3 glucanase) ou enrolar-se no patógeno alvo. O último passo é a penetração e o parasitismo do agente de biocontrole com ajuda de estruturas miceliares chamadas apressórios, causando a morte do organismo alvo (INBAR & CHET, 1994; LORITO et al, 1993; AHANGER et al., 2014). A esporulação de isolados de *T. pseudokoningii* na massa micelial do *F. verticillioides* e a consequente distorção do crescimento do patógeno, foi relatado por SABOWALE et al., (2005) relatando o micoparasitismo como o mecanismo supressor do crescimento. Foi observado também, além disso foi observado o fungo *Clonostachys rosea* exercendo micoparasitismo no patógeno *F. verticillioides in vitro* (CHATTERJEE et al., 2016).

As plantas respondem de forma contínua a uma ampla gama de estímulos gerados pelo ambiente (luz, estresse físico, disponibilidade de nutrientes e água) e por estímulos químicos influenciados por microrganismos associados ao solo e à presença de outras plantas. Estes estímulos condicionam à planta a uma mudança bioquímica, favorecendo sua resistência contra agentes injuriantes e condições ambientais adversas. Este modo de ação é conhecido como indução de resistência vegetal, e pode apresentar-se de forma local ou sistêmica transloucando-se pelos feixes vasculares da planta (PAL & GARDENER, 2006).

A indução de resistência influenciada por microrganismos pode-se apresentar de duas formas: Resistência Sistêmica Adquirida (SAR) ou Resistência Sistêmica Induzida (ISR). A produção do ácido salicílico é dirigida por SAR, este composto é produzido pela planta após infecção dos microrganismos patogênicos ou ativadores químicos. A produção desta molécula influencia o desenvolvimento de proteínas relacionadas à patogenicidade (PRPs), atuando diretamente no patógeno, ocasionando lise celular, indução de morte controlada no ponto da infecção e até reforço na parede celular para futuras infecções. Já a ISR é produzida na planta pela influência da colonização de microrganismos não patogênicos. Esta resistência emprega outro tipo diferente de sinalização mediada pela produção do ácido jasmônico ou etileno e não existe participação de proteínas relacionadas à patogênese e a

amplitude da indução é geralmente generalizada (STICHER et al.,1997; PAL & GARDENER, 2006; ROMEIRO, 2007).

Neste tipo de mecanismo, Ferrigo et al., (2014) avaliaram a eficácia de *Trichoderma harzianum* como indutor de resistência em plantas de milho inoculadas com cepas de *F. verticillioides*, obtendo redução da severidade da doença e gerando sintomas diferentes daqueles característicos do patógeno na planta. Além disso, foi descrito pelos autores a produção de ácido salicílico correlacionando-se com o ácido jasmônico e etileno ativando o sistema de defesa das plantas estudadas. Outros autores têm relacionado estes resultados à ISR, como o principal mecanismo envolvido no controle de *F. verticillioides* quando foram feitas as aplicações de *B. subtilis* no campo em diferentes concentrações ( $10^4$  e  $10^6$ ) reduziram a severidade da doença até 76% (PALAZZINI et al., 2016). *Pseudomonas flourescens* também já foi reportada como agente na indução de ISR contra *F. verticillioides* (CHANDRA et al., 2009). Muitas bactérias também têm sido relatadas como precursoras na ativação de ISR em diferentes plantas para o controle de distintos patógenos: *P. flourescens* contra *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* em tomate (M'PIGA et al., 1997), *Bacillus pumilus* contra *F. oxysporum* f. sp. *pisi* em ervilha (BENHAMOU et al., 1996), *Bacillus subtilis* contra *Penicillium digitatum* em citros (LEELASUPHAKUL et al., 2008).

As rizobactérias promotoras de crescimento vegetal ou Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) são habitantes comuns do solo especializadas na colonização de raízes nas plantas (ROMEIRO, 2007). Elas podem exercer controle do patógeno pela ativação da Indução de Resistência Sistêmica (ISR) ou pela promoção de crescimento vegetal (BENEDUZI et al., 2012). Diferentes mecanismos estão envolvidos na promoção de crescimento, tais como; fixação de nitrogênio (VESSEY, 2003), solubilização de fosfatos (DEY et al., 2004), produção de sideróforos para captação e absorção de ferro (WANG et al., 1993) e produção de fitohormônios (LUCY et al., 2004). Bactérias dos gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus* são as mais estudadas e catalogadas como as mais importantes, pois geram efeito antagônico notório no controle de patógenos desencadeando ISR e ativando a produção do ácido jasmônico ou etileno ambiente (BENEDUZI et al., 2012).

## 2.4 Efeito dos tratamentos químicos e biológicos na diversidade microbiana

Segundo Rastogi et al., (2013) as condições ambientais adversas na parte aérea da planta (filosfera), tais como radiação UV, flutuações constantes de temperatura, disponibilidade de água e nutrientes além das competições biológicas contra outros microrganismos pela obtenção do espaço e nutrientes, permitem que microrganismos epifíticos se adaptem no tempo a este habitat desfavorável, atuando como uma barreira na planta impedindo o estabelecimento de organismos patogênicos indesejáveis. O conjunto desses fatores permitem que estas populações de microrganismos se estabeleçam conforme de correm as estações do ano e o ciclo fenológico da folha (JACOB, 1997). Estas comunidades estão tendo importância nos últimos anos por seu papel em desenvolver benefícios nas plantas como estimulação fisiológica, biofertilizantes e controladores de agentes injuriantes (MÜLLER & RUPPEL, 2014). No entanto uns dos principais problemas que se apresentam no uso destas comunidades microbianas para o controle de doenças foliares são a baixa capacidade de sobrevivência e viabilidade para manter essas comunidades em altas densidades (ANDREWS & HIRANO, 2012). Por outro lado, microrganismos endofíticos têm vantagem ecológica sobre os epifíticos já que as condições internas são mais favoráveis e proporcionam um ambiente mais seguro para seu desenvolvimento, potencializando na planta possíveis estratégias de controle contra fitopatógenos e induzindo o crescimento vegetal (HALLMANN et al., 1997). Os microrganismos endofíticos são originados na rizosfera ou filosfera da planta, sendo a rizosfera sua principal forma de entrada (DONG et al., 1994).

Em relação à riqueza microbiana nas plantas, Figueroa et al., (2016) avaliaram 11,520 microrganismos associados à rizosfera em plantas de milho sintomáticas e assintomáticas com o patógeno *F. verticillioides*. Foram selecionadas 42 espécies dos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas* e *PaeniBacillus* que inibiram o crescimento do *F. verticillioides* em mais de 45%. Foi identificado *Bacillus cereus* como o maior agente de biocontrole já que conseguiu inibir o crescimento *in vitro* e reduzir a severidade da doença em casa de vegetação. Os mecanismos de ação sugeridos foram os seguintes: produção de compostos como glucanases, proteases, quitinases, sideróforos e o desenvolvimentos de auxinas na planta. Isto demonstra a abundância de microrganismos associados às culturas agrônomicas, além da importância na conservação destas populações, já que podem ser possíveis agentes de

biocontrole. Assim é necessário o uso de práticas sustentáveis para permitir o estabelecimento dos microrganismos benéficos nas plantas.

Pereira et al., (2007) avaliaram o efeito de aplicações na semente de milho de Carboxin + Thiram e bactérias endofíticas (*Bacillus amyloliquefaciens* e *Microbacterium oleovorans*) no desenvolvimento de *F. verticillioides* e o impacto nos microrganismos associados à rizosfera. Eles encontraram diferenças significativas nos tratamentos comparados com o controle. As aplicações dos microrganismos benéficos aumentaram o número de bactérias formadoras de endósporos do gênero *Bacillus* e bactérias Gram positivas com formato de bastões irregulares. Isto demonstra a recuperação dos microrganismos após à aplicação no campo e seu desenvolvimento durante o crescimento fisiológico do milho. Os agentes de biocontrole relatados anteriormente conservaram a riqueza e diversidade bacteriana. *B. amyloliquefaciens* não permitiu o desenvolvimento de *F. verticillioides* enquanto *M. oleovorans* não teve nenhum efeito no controle do patógeno.

Os defensivos químicos agem no campo formando um vácuo biológico sem vida na área onde foram aplicados, permitindo a rápida multiplicação e livre colonização do primeiro microrganismo que chegue ao órgão, onde quase sempre o mais exitoso é o patógeno (GHINI & BETTIOL, 2005). Zanotto et al. (2016) observaram que com o aumento no número de aplicações (de uma para duas) do fungicida “PrioriXtra” (azoxistrobina + ciproconazole) no milho para o controle de *F. verticillioides*, não se encontrou resposta no controle de grãos ardidos, mas observou-se aumento na porcentagem de grãos colonizados por *F. verticillioides*, além do aumento no teor de fumonisinas (FB1e FB2). No entanto diferenças significativas foram encontradas quando combinações de uma primeira aplicação do fungicida “PrioriXtra” em conjunto a uma segunda aplicação de *Bacillus subtilis*, resultaram na redução da colonização do patógeno no grão como também diminuição no conteúdo de fumonisinas totais.

Por tanto uma compreensão mais completa da ecologia microbiana associada à filosfera e rizosfera do milho poderá permitir o desenvolvimento de estratégias eficientes no controle biológico de patógenos associados à cultura, além de diminuir a dependência de produtos químicos, melhorando assim a sanidade das plantas, conservando a diversidade microbiana e protegendo a saúde humana (FILION et al., 2004). O impacto de práticas (químicas ou biológicas) para o controle de diversos patógenos e sua correlação no

efeito das comunidades microbianas nativas das plantas tem sido estudada por muitos autores (SOUZA et al., 2015). Algumas conclusões são que a introdução de microrganismos antagônicos e aplicações de produtos químicos no ecossistema associado à filosfera e rizosfera das plantas poderá gerar impactos positivos (PEREIRA et al., 2009; FIGUEROA et al., 2016) ou negativos (JACKMAN et al., 1992) no desenvolvimento das doenças.

### 3. OBJETIVOS

Determinar o impacto do tratamento foliar com fungicidas químicos e biológicos na abundância de bactérias e fungos do filoplano e seu potencial no controle de *Fusarium verticillioides* no milho.

#### 3.1 Objetivos específicos

Isolar fungos e bactérias do filoplano em plantas de milho.

Selecionar e avaliar *in vitro* possíveis agentes de biocontrole de *F. verticillioides*.

Identificar os principais mecanismos de ação dos possíveis agentes de controle biológico.

Selecionar os melhores microrganismos antagonicos contra *F. verticillioides*.

#### 3.2 Hipótese científica

As aplicações de produtos químicos, biológicos ou a combinação de ambos são capazes de alterar a abundância de fungos e bactérias do filoplano em plantas de milho na presença do patógeno *F. verticillioides*, possibilitando a obtenção de agentes de controle biológico contra o mesmo.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Locais de instalação do experimento, preparo do solo e tratos culturais

Os ensaios em campo foram conduzidos em dois locais diferentes na área experimental da fazenda Muquém (21°12'13.7"S, 44°58'50.3"W e 21°12'11.6"S 44°59'10.8"W) da Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, com altitude média de 918 m, temperatura e umidade relativa média de 24,85 °C e 69,89 % e uma precipitação média acumulada durante os meses de dezembro-março de 954 mm. Foi avaliada uma área durante o ano 2016 e duas áreas diferentes no ano 2017. Em cada área, o solo foi preparado para o plantio com aração e gradagem. Foram feitas duas aplicações de adubo, no plantio com NPK (08-28-16) na quantidade de 500 kg/ha e uma adubação de cobertura parcelada em duas nos estádios V3 e V6 com NPK (20-00-20) na quantidade de 140 kg/ha. Além disso, foram feitas aspersões de herbicidas pós-emergentes para eliminação de plantas competidoras e aplicações de inseticidas para o controle de insetos. Foram semeadas sementes de milho híbrido DKB 390 PRO 2 no começo do período chuvoso na região. As parcelas experimentais foram compostas por 12 m<sup>2</sup> totalizando 4 linhas com comprimento de 5 metros e espaçamento entre linhas de 0,6 metros. O delineamento experimental foi em blocos casualizados.

### 4.2 Ensaio 1 - Composição e inoculação dos tratamentos no campo

Se estabeleceram 6 tratamentos (Tabela 1) com 4 repetições, cada tratamento foi aplicado duas vezes (Figura 1): um no estágio vegetativo (V9-V10) e outro no estágio reprodutivo (R1).

Foi utilizado o isolado BioUFLA-2 (*Bacillus subtilis*), como agente de controle biológico. Este foi reativado em meio YPD sólido (10 g extrato de levedura, 20 g peptona bacteriológica, 20 g dextrose, 20 g ágar e 1 L de água destilada) até sua respectiva formação de colônias típicas em dois dias a 28 °C. Em seguida o isolado foi incubado em meio líquido YPD (10 g extrato de levedura, 20 g peptona bacteriológica, 20 g dextrose e 1 L de água destilada) por 72 horas sob agitação de 150 RPM a 27 °C. O produto obtido foi diluído com água destilada estéril até conseguir uma concentração de 10<sup>8</sup> endósporos/mL com ajuda de uma câmara de Neubauer. O produto concentrado foi aplicado em campo com volume de calda de 200 L/ha.

Foi usado o fungicida comercial “PrioriXtra” da Syngenta Proteção de Cultivos, que têm como ingrediente ativo a mistura de duas moléculas químicas (Azoxistrobina + Ciproconazol). A aplicação do produto em campo foi com o volume de 250 mL/ha do princípio ativo e o volume de aplicação em 200 L/ha.

Para os tratamentos controle foi aplicado água destilada durante os dois estádios fenológicos, no entanto também se usou o meio de crescimento líquido da bactéria YPD estéril como um controle positivo.

Todos os tratamentos foram aplicados com um cilindro compressor de CO<sup>2</sup> por aspersão em jato de bico cone. Antes da aplicação dos tratamentos no campo, foram adicionados 0,5% de óleo mineral em cada volume final.

**Tabela 1-** Tratamentos aplicados no campo e estádios fenológicos correspondentes.

TRATAMENTOS	ESTÁDIOS FENOLÓGICOS	
	V9-V10	R1
T1 – (Água + Água)	Água	Água
T2 – (Fungicida. + <i>Bacillus subtilis</i> )	Fungicida	BioUFLA2
T3 – (Fungicida + Fungicida)	Fungicida	Fungicida
T4 – ( <i>Bacillus subtilis</i> + <i>Bacillus subtilis</i> )	BioUFLA2	BioUFLA2
T5 – ( <i>Bacillus subtilis</i> + Fungicida)	BioUFLA2	Fungicida
T6 – (YPD + YPD)	YPD	YPD

#### 4.2.1 Inoculação do patógeno *Fusarium verticillioides*

Foi selecionado o isolado F425 de *F. verticillioides* da coleção micológica da Embrapa Milho e Sorgo (LANZA et al., 2014). O patógeno foi reativado em meio BDA (Batata-Dextrose-Agar) e incubado em BOD até sua respectiva formação de micélio típico a 27 °C durante sete dias. A inoculação do patógeno (FIGURA 1) se realizou dez dias após a emissão do estilo-estigma. Foi calibrada a concentração de 1x10<sup>5</sup> conídios/mL do patógeno em câmara de Neubauer e com uma seringa e agulha foram aplicados 5 mL da suspensão na base do estilo estigma de cada planta de milho em todos os tratamentos (MENDES, 2009).

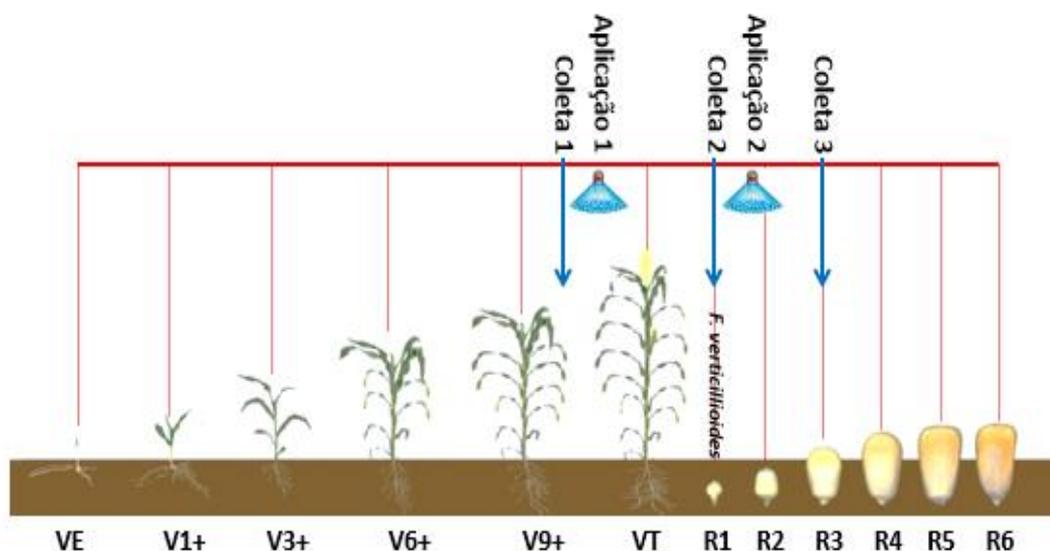
### 4.3 Coleta de amostras de folhas e espigas

Foram realizadas três coletas (FIGURA 1) para cada uma das áreas avaliadas durante o ano 2016-2107; a primeira foi feita antes da aplicação do primeiro tratamento, entre os estágios fenológicos V9-V10. A segunda coleta foi realizada antes da segunda aplicação do segundo tratamento no estágio fenológico R1. Nestas duas coletas foram amostradas as folhas de inserção mais alta das espigas em três pontos distintos (três plantas) nas duas linhas centrais de cada parcela. Com ajuda de um molde de 5 cm<sup>2</sup> foram coletadas amostras no centro das folhas nos dois lados da nervura central até completar 10 g.

A terceira coleta foi feita aproximadamente 40 dias antes da colheita das espigas, entre o estágio fenológico R3-R4. Foram selecionadas as últimas espigas em três pontos distintos (três plantas) nas linhas do meio de cada bloco, utilizando um perfurador de meia polegada (20 mm<sup>2</sup>) como molde. Em cada espiga dois pontos opostos da mesma foram amostrados até atingir o sabugo (FIGURA 1).

Em cada coleta, foram selecionadas diferentes plantas para a obtenção das amostras, sendo as plantas da segunda coleta diferente à primeira coleta e a terceira coleta diferente à segunda e primeira coleta. Cada planta foi selecionada de forma aleatória e as amostras recolhidas foram processadas e armazenadas no laboratório de controle biológico da Universidade Federal de Lavras do departamento de Fitopatologia.

**Figura 1** - Época de aplicação dos tratamentos, coleta das amostras nos diferentes estádios fenológicos da cultura e inoculação de *F. verticillioides*.



## **4.4 Ensaio 2 – Isolamento de fungos e bactérias do filoplano**

### **4.4.1 Fungos totais**

Foram pesados com auxílio de uma balança analítica 10 g de folhas de cada amostra coletada e num almofariz de cerâmica adicionaram-se 5 mL de água destilada autoclavada. Posteriormente, cada amostra foi macerada com um pistilo desinfestado com álcool 70 % e flambado.

Do produto macerado, partindo de uma concentração inicial ( $10^{-1}$ ) foram feitas diluições seriadas até chegar a uma concentração de  $10^{-4}$  onde 100  $\mu$ L de cada diluição foram plaqueados em triplicata no meio BDA + Sulfato de Estreptomicina (1000 ppm). As placas foram incubadas em temperatura ambiente durante cinco dias. Após o período de incubação um número similar de colônias fúngicas diferentes (cor, formato da colônia) cultiváveis em meio BDA foram selecionadas ao acaso em cada tratamento (ZANOTTO et al., 2016).

### **4.4.2 Bactérias totais**

Foram pesados com auxílio de uma balança analítica 10 g de folhas de cada amostra coletada e em um almofariz de cerâmica adicionaram-se 5 mL de água destilada autoclavada. Posteriormente, cada amostra foi macerada com um pistilo desinfestado com álcool 70 % e flambado.

Do produto macerado, partindo de uma concentração inicial ( $10^{-1}$ ) foram feitas diluições seriadas até chegar a uma concentração de  $10^{-6}$  onde 100  $\mu$ L de cada diluição foram plaqueados em triplicata no meio NA (Nutriente Agar). As placas foram incubadas em temperatura ambiente durante dois dias, finalizado este período foram repicadas e selecionadas ao acaso colônias diferentes (cor, formato da colônia) cultiváveis em meio NA em cada tratamento (ZANOTTO et al., 2016).

### **4.4.3 Bactérias produtoras de endósporos**

Foram pesados com uma balança analítica 10 g de folhas de cada amostra coletada e em um almofariz de cerâmica adicionaram-se 5 mL de água destilada autoclavada.

Posteriormente, cada amostra foi macerada com ajuda de um pistilo desinfestado com álcool 70 % e flambado.

Do produto macerado, partindo de uma concentração inicial ( $10^{-1}$ ) foram feitas diluições seriadas até chegar a  $10^{-4}$ , logo as amostras foram levadas ao banho de maria durante 10 minutos a uma temperatura de 80 °C. Da concentração  $10^{-4}$ , 100 µL de cada diluição foram plaqueados em triplicata no meio NA (Nutriente Agar). As placas foram incubadas em temperatura ambiente durante dois dias, finalizado este período foram, repicadas e selecionadas colônias diferentes (cor, formato da colônia) cultiváveis em meio NA ao acaso em cada tratamento (ZANOTTO et al., 2016).

#### **4.5 Purificação e preservação de microrganismos**

Terminado o isolamento e seleção dos fungos e das bactérias cultiváveis do filoplano de plantas de milho, foi feita a preservação de cada microrganismo. Para fungos foi utilizado o meio BDA + sulfato de estreptomicina (1000 ppm) e para bactérias meio NA. Estes microrganismos foram incubados durante sete e três dias respectivamente em temperatura ambiente. Finalizado este período as bactérias foram criopreservadas e armazenadas no freezer a -80 °C em meio Peptona – Glicerol 15% em tubos eppendorf de 1,5 mL (ALMEIDA, 1998). Para os fungos foram extraídos discos de 5 mm do meio BDA com o micélio e armazenados em tubos eppendorf de 1,5 mL na geladeira a 4 °C até o posterior uso e avaliação.

#### **4.6 Ensaio 3 – Seleção e avaliação *in vitro* dos possíveis agentes de biocontrole em grãos de milho canjica**

##### **4.6.1 Inoculação do patógeno uma semana após do antagonista**

Os isolados obtidos na etapa anterior foram avaliados no laboratório de controle biológico da Universidade Federal de Lavras, onde se realizaram testes para conhecer a possível atividade antagônica contra *F. verticillioides* (F425) em grãos de milho canjica. Os microrganismos foram reativados e cultivados em placas de Petri 90 mm com meio de cultura para fungos e leveduras (BDA + Sulfato de Estreptomicina a 100 ppm) e para bactérias (YPD solido). Foram usados 100 µL de cada bactéria criopreservada anteriormente no meio Peptona

– Glicerol (15%) e plaqueadas no meio YPD sólido. As bactérias foram incubadas a 27 °C durante dois dias numa BOD sem fotoperíodo. Para os fungos e o patógeno, discos de BDA com micélio, os quais foram pre-severados e armazenados na geladeira, foram reativados no meio BDA + Sulfato de Estreptomicina (1000 ppm), incubados a 27 °C durante 5 dias com um fotoperíodo de 12 horas.

Grãos de milho canjica foram desinfestados superficialmente em álcool (70% v/v) por 30 segundos, seguido por uma imersão em hipoclorito de sódio (2,0% v/v) durante 2 minutos e finalizando com três lavagens em água destilada autoclavada. Após a desinfestação, os grãos foram secados em uma câmara de fluxo laminar horizontal durante 12 horas e armazenados em sacolas de papel esterilizadas até o momento da utilização.

Para o início do ensaio, 40 grãos de milho canjica previamente desinfestados foram transferidos a cada placa de Petri de 90 mm contendo o possível agente de biocontrole (fungos ou bactérias). Logo, cada placa foi agitada manualmente durante 10 segundos e dez grãos de milho canjica foram transferidos para quatro placas de petri de 90 mm contendo ágar água (5%) e um papel filtro estéril umedecido. Foram estabelecidas quatro repetições para cada microrganismo, as placas foram armazenadas numa BOD durante 7 dias a uma temperatura de 28°C sem fotoperíodo. Ao completar o último dia incubação, se aplicou em cada grão do milho canjica 100 µL do patógeno *F. verticillioides* a uma concentração 10<sup>5</sup> conídios/mL contendo uma gota de Tween ® 80 (para cada 100 mL do volumem aplicado). As placas foram deixadas por 7 dias na BOD a uma temperatura de 28 °C sem fotoperíodo. Para evitar a perda de umidade cada placa foi fechada com papel filme.

Para as bactérias e leveduras uma semana depois da inoculação do patógeno, foi avaliada a severidade em cada grão de milho canjica, atribuindo uma nota de infecção de 0 até 4, sendo 0 ausência de micélio, 1 para 1% a 25%; 2 para 26% a 50%; 3 para 51% a 75% e 4 para 76% a 100% (MACHADO et al., 2013).

Para os fungos, uma semana depois da inoculação do patógeno foi avaliada a incidência (número de conídios) de *F. verticillioides* em cada repetição, os dez grãos de milho canjica foram transferidos para um tubo de ensaio contendo 5 mL de água seguido de uma agitação manualmente durante 10 segundos, após agitação foi feita uma diluição a 10<sup>-1</sup>. A

diluição foi homogeneizada durante 20 segundos com um Vortex e uma alíquota de 200 µL foi transferida para uma câmara de Neubauer, onde foi feita a contagem dos conídios de *F. verticillioides* presente na amostra e transformados a escala de Log 10. Nesta etapa os melhores isolados que tiveram a maior atividade de biocontrole do patógeno, foram selecionados para continuar com o próximo teste.

#### **4.6.2 Inoculação simultânea do antagonista e o patógeno**

Neste teste os isolados que tiverem a maior atividade de biocontrole no *screening* anterior, foram avaliados de forma mais rigorosa em um teste de inoculação simultânea junto ao patógeno. A metodologia foi seguida conforme ao item anterior 4.6.1, onde apenas a inoculação do patógeno e antagonistas aconteceu ao mesmo tempo (simultaneamente). Neste teste os isolados que tiveram a melhor resposta de controle do patógeno foram selecionados para continuar com o próximo teste.

### **4.7 Ensaio 4 – Identificação dos principais mecanismos de ação envolvidos pelos microrganismos**

Finalizada a etapa anterior foi identificado o principal mecanismo de ação envolvido pelos antagonistas selecionados, seja pela capacidade de produção de antibióticos ou competição pelo espaço e nutrientes.

#### **4.7.1 Avaliação da produção de possíveis antibióticos pelos microrganismos antagônicos**

A capacidade de produção de antibióticos *in vitro* por parte dos antagonistas, foi avaliada mediante o confronto direto dos microrganismos em meio de cultivo BDA. As bactérias, fungos e leveduras obtidas no teste anterior, foram selecionadas e reativadas novamente a partir de culturas puras em cada meio de cultura diferencial sólido (BDA e YPD).

As bactérias e leveduras foram cultivadas em meio YPD e BDA respectivamente, por 48 h a 28 °C sem fotoperíodo. Finalizado este tempo uma amostra de cada colônia bacteriana e das leveduras foram transferidas com alça de platina para um Erlenmeyer contendo 50 mL

do meio líquido YPD e incubadas a 28 °C durante 24 h em Shaker rotativo a 250 rotações/min. Finalizado este período, foi ajustada a concentração de 10<sup>4</sup> células/mL, com uma Câmara de Neubauer para leveduras e para bactérias uma absorbância de 0,4 medida em espectrofotômetro a 620 nm.

Para as bactérias e leveduras em uma placa de Petri de 9 mm, 10 mL do meio BDA foram vertidos, e após o resfriamento do meio, 100 µL do patógeno *F. verticillioides* na concentração 1x10<sup>5</sup> conídios/mL calibrados em uma Câmara de Neubauer e plaqueados com alça de Drigalski. Após secagem da suspensão, 5 µL de cada microrganismo foram inoculados em nove partes diferentes em cada placa de Petri e incubados em BOD a 25 °C com um fotoperíodo de 12 h durante sete dias. Ao final do sétimo dia, foi avaliada a existência de formação do halo de inibição por parte dos microrganismos quando são comparados com o controle (inoculação com 5 µL de água destilada autoclavada na mesma placa), foram estabelecidas 4 repetições para cada microrganismo com duas réplicas no tempo.

Para os fungos, um disco de 5 mm de cada antagonista de forma individual foi transferido para um extremo de cada placa de Petri contendo 10 mL do meio BDA, no outro extremo foi posicionado um disco do patógeno *F. verticillioides*. As placas foram incubadas em BOD a 25 °C com fotoperíodo de 12 h durante 10 dias. Após o último dia, foi avaliada a formação de halo de inibição e a existência de micoparasitismo por parte dos microrganismos quando são comparados com o controle (placas apenas com o patógeno). Foram estabelecidas três repetições para cada tratamento com três réplicas no tempo (DA SILVA, 2007).

#### **4.7.2 Determinação do NOI entre os antagonistas e *F. verticillioides***

O índice de sobreposição do nicho (NOI), foi determinado para avaliar a capacidade de utilização de 17 fontes diferentes de carbono e nitrogênio (dextrin, D-fructose; D-galactose; a-D-glucose; D-raffinose; D-melobiose; sucrose; L-aspartic acid; L-glutamic acid; L-histidine; L-phenylalanine; L-leucine; L-proline; L-threonine; L-alanine; L-serine; and L-arginine) presentes no milho (nicho), entre os antagonistas selecionados anteriormente no teste de antibioses e o patógeno *F. verticillioides* (MARIN et al., (1998) e avaliadas por CAVAGLIERI et al., (2004) e KRAUS et al., (2004).

Os microrganismos antagônicos foram cultivados em meio de cultura YPD para bactérias a 28 °C durante 2 dias sem fotoperíodo e para os fungos e o patógeno BDA por 12 dias a 25 °C com fotoperíodo de 12h. De cada fonte de carbono e nitrogênio 33,33 µL foram incorporados individualmente nos poços de uma placa ELISA a uma concentração de 10 mM, além disso uma alíquota de 300 µL de cada agente de biocontrole foi inoculado separadamente em cada poço numa concentração tanto para bactérias e fungos de 0,4 de absorbância medida num espectrofotômetro a 620 nm. Para o patógeno *F. verticillioides* uma suspensão de 300 µL a uma concentração de  $1 \times 10^6$  conídios/mL foi inoculado individualmente em cada poço da placa contendo as diferentes fontes de nutrientes (CAVAGLIERI et al., 2004; FOX, 1980). As placas foram fechadas e incubadas a 25 °C em BOD em escuro durante 3 dias e foram feitas leituras de absorbância usando um leitor de microplaca no começo do ensaio e depois de 24, 48 e 72 h a 490 nm (atividade mitocondrial) e 750 nm (crescimento micelial). Os testes foram realizados em triplicata e os valores de absorbância foram analisados separadamente (KRAUS et al., 2004).

Para conhecer a similaridade do nicho ecológico dos microrganismos pela captação das diferentes fontes de carbono e nitrogênio, foi utilizado a seguinte fórmula:

$$NOI: \frac{\text{número de fontes de carbono e nitrogênio em comum entre o antagonista e } F. \text{ verticillioides}}{\text{número total das fontes utilizadas por } F. \text{ verticillioides}}$$

Se no resultado o NOI for  $> 0,9$  representará competição por nutrientes e espaço entre os microrganismos antagônicos e o patógeno. Mas se o NOI for  $< 0,9$  representará ocupação de nichos separados (MARIN et al., 1998; CAVAGLIERI et al., 2004 e KRAUS et al., 2004).

#### **4.8 Alterações celulares nos antagonistas e o patógeno por microscopia de varredura no teste de antibioses e competição**

As bactérias e fungos obtidos no teste de confrontação direta dos antagonistas e o patógeno foram selecionados e reativados novamente a partir de culturas puras em cada meio de cultura sólido. As bactérias foram cultivadas em meio YPD e os fungos e o patógeno em

BDA por 48 h a 28 °C sem fotoperíodo. Uma amostra de cada colônia bacteriana foi transferida com alça de platina para um Erlenmeyer contendo 50 mL do meio líquido YPD e incubadas a 28 °C durante 24 h em Shaker rotativo a 250 rotações/min. Finalizado este período, nas bactérias foi ajustada uma concentração a 0,4 medida em espectrofotômetro a 620 nm. Em uma placa de Petri de 9 mm, 10 mL do meio BDA foram vertidos, e após do resfriamento do meio, 100 µL do patógeno *F. verticillioides* na concentração  $1 \times 10^5$  conídios/mL calibrados em uma Câmara de Neubauer foram plaqueados com alça de Drigalski. Após secagem da suspensão, 10 µL da concentração de cada bactéria foram inoculados em três em posições diferentes numa placa de petri e incubados em BOD a 25 °C com fotoperíodo de 12 h durante sete dias. Para os fungos, um disco de 5 mm de cada antagonista de forma individual foi transferido para um extremo de cada placa de Petri contendo 10 mL do meio BDA e no outro extremo foi posicionado um disco do patógeno *F. verticillioides*. As placas foram incubadas em BOD a 25 °C com fotoperíodo de 12 h durante sete dias estabelecendo três repetições para cada tratamento.

Ao final do sétimo dia, foi confirmada a existência de formação do halo de inibição por parte dos microrganismos quando são comparados com o controle (inoculação com 10 µL de água destilada autoclavada numa placa de petri contendo meio BDA) e a zona de interação do micélio nos fungos. Estas placas foram levadas para preparação e observação em microscópio eletrônico de varredura, no Laboratório de Microscopia de Precisão do Departamento de Fitopatologia, da Universidade Federal de Lavras, MG.

Para cada microrganismo foram cortados discos de 0,5 cm do meio BDA contendo o antagonista e o patógeno ao redor da zona de interação do micélio dos fungos e o halo de inibição das bactérias. Esses discos foram fixados em solução de Karnovsk modificado (glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2% em tampão de cacodilato de sódio 0,05 M, CaCl<sub>2</sub> 0,001 M, pH 7,2) durante 24 h antes da preparação e lavadas duas vezes em água destilada autoclavada.

Todas amostras foram desidratadas usando acetona em serie a uma concentração de: 30%, 50%, 70%, 90% e 100% por três vezes e depois levadas para o aparelho de ponto crítico. As amostras obtidas foram montadas em suportes de alumínio tipo stubs contendo uma fita de carbono dupla face posicionada sobre uma porção de papel de alumínio e coberto

com ouro. Essas amostras foram armazenadas em caixas plásticas contendo sílica para reter a umidade até posterior avaliação. As observações foram feitas em microscópio eletrônico de varredura LEO EVO 40XVP e diversas imagens foram geradas e registradas digitalmente em aumentos variáveis para cada amostra nas condições de trabalho de 20Kv e distância de trabalho de 9 a 11 mm (VINEET & GUPTA, 2004; ALVES, 2003; MEDEIROS et al., 2012).

#### **4.9 Caracterização filogenética e identificação das bactérias antagônicas**

A caracterização filogenética das bactérias B100 e B45,2 foi determinada pela análises de sequencias do gene 16S rRNA no laboratório de biologia molecular da EMBRAPA meio ambiente em Jaguariúna-SP. Uma amostra de cada bactéria foi transferida para uma placa de petri contendo meio YPD e incubada em BOD a 28 °C com fotoperíodo de 12 h por 48 horas. De colônias puras de cada bactéria foi feita a extração do DNA genômico usando o kit de extração com o protocolo estabelecido pela Invitrogen (PureLink Genomic DNA Mini Kit).

O gene 16S rRNA foi amplificado por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) usando um conjunto de primers 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-TACGGCTACCTTGTTACGAC-3'). A PCR foi realizada usando um termo ciclador Veriti™ de 96 poços (Applied Biosystems) contendo as reações (25 µL) de: 1 µL do DNA (10 ng) extraído anteriormente, 2.5 µL do buffer PCR 10x (200 mM Tris-HCl) com pH 8.4, 500 mM de KCl, 1.5 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 0.25 µL da mistura de dNTP (10 mM de cada dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 0.5 µL de cada primer (10 µM), 0.3 µL da *Taq* DNA polimerase e finalizando com 18.45 µL de água ultrapura. O ciclo da PCR foi estabelecido da seguinte forma: (1) 94 °C por 2 min.; (2) 35 ciclos a 94 °C por 1 min., 55 °C por 1 min e 72 °C por 2 min e (3) 72 °C por 10 min (WHITE et al., 1990).

Os produtos obtidos pela PCR foram purificados pelo kit estabelecido com o protocolo da Wizard SV Gel e pelo Kit da PCR Clean-Up System (Promega) e finalmente quantificados usando um fluorímetro Qubit 2.0 da Invitrogen. Os fragmentos da PCR obtidos anteriormente foram sequenciados utilizando Sanger Sequencing – 3500 Genetic Analyze, usando o kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems). Cada reação continha (10 µL): 1.0 µL da PCR template (35 µg), 2 µL do 5x BigDye Terminator

Sequencing Buffer, 1.6 µL de cada primer (5 pmol), 1 µL de Ready Reaction Premix Big Dye e finalmente 4.4 mL de água ultrapura. Os parâmetros do ciclo foram estabelecidos da seguinte forma: (1) 96 °C por 1 min, (2) 35 ciclos a 96 °C por 15 seg, 50 °C por 15 seg e 60 °C por 4 min. O conjunto de primers usados foram: 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'), 357R (5'-CTGCTGCCTYCCGTA-3'), 704R (5'-AGATTTTCCGACGGCAGGTT-3'), 704F (5'-GTAGCGGTGAAATGCGTAGA-3'), 1114R (5'-GGGTTGCGCTCGTTGC-3') e 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3').

Para o alinhamento das sequências do gene 16S rRNA foi usado o programa CLUSTALW e para a construção da árvore filogenética foi utilizado o software MEGA 7.0 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016). Estas sequências foram comparadas com outras sequências correspondentes ao gênero *Bacillus* e *Burkholderia* estabelecidas no banco de dados do GenBank usando o servidor EzBioCloud (YOON et al., 2017). As árvores filogenéticas foram feitas usando os métodos de máxima parsimonia (MP) (FITCH, 1971), máxima verossimilhança (ML) (FELSENSTEIN, 1981), e junção vizinha (NJ) (SAITOU; NEI, 1987) com o software MEGA (versão 7.0).

#### **4.9.1 Caracterização filogenética e identificação dos fungos antagonistas**

Para cada fungo foi realizada a caracterização morfológica (dados não inclusos) no laboratório de Micologia do departamento de fitopatologia da UFLA, identificando as principais características morfológicas de cada microrganismo. A identificação filogenética ainda está sendo realizada.

#### **4.10 Análises estatísticas**

Os valores obtidos em diferentes experimentos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as variáveis significativas no teste F foram comparadas pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ) e pelo teste de Scott Knott ( $P < 0,001$ ).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Isolamento de fungos e bactérias do filoplano

Foram isolados 140 bactérias e 100 fungos provenientes do campo durante os dois anos de avaliação da pesquisa (2016 - 2017). Estes foram preservados em meio seletivo específico para cada microrganismo. Estes microrganismos foram selecionados ao acaso por características morfológicas diferentes (cor, formato da colônia) e um número homogêneo de microrganismos foi escolhido em cada tratamento. Foi atribuído uma identificação específica a cada fungo e bactéria obtida no campo, permitindo conhecer o tipo de tratamento aplicado que deu a origem ao microrganismo isolado. O efeito de diferentes aplicações foliares (químicas e/ou biológicas) para o controle de doenças em diferentes plantas, como milho (PEREIRA et al., 2010), cacau (MELNICK et al., 2008), uva (HAIDAR et al., 2016), abacate (DUNLAP et al., 2017) e pepino (DU et al., 2017) tem sido estudadas. Alguns desses trabalhos tem demonstrado que comunidades microbianas de fungos e bactérias nativas presentes no filoplano e rizoplano podem controlar de forma natural diferentes doenças nas plantas (MELNICK et al., 2008; HAIDAR et al., 2016; FIGUEROA et al., 2016). No entanto poucos estudos têm comprovado o efeito que tem essas aplicações foliares na diversidade de fungos e bactérias do filoplano e a possível capacidade de biocontrole e seleção desses microrganismos antagônicos nativos a *Fusarium verticillioides* e a outras doenças (PEREIRA et al., 2010).

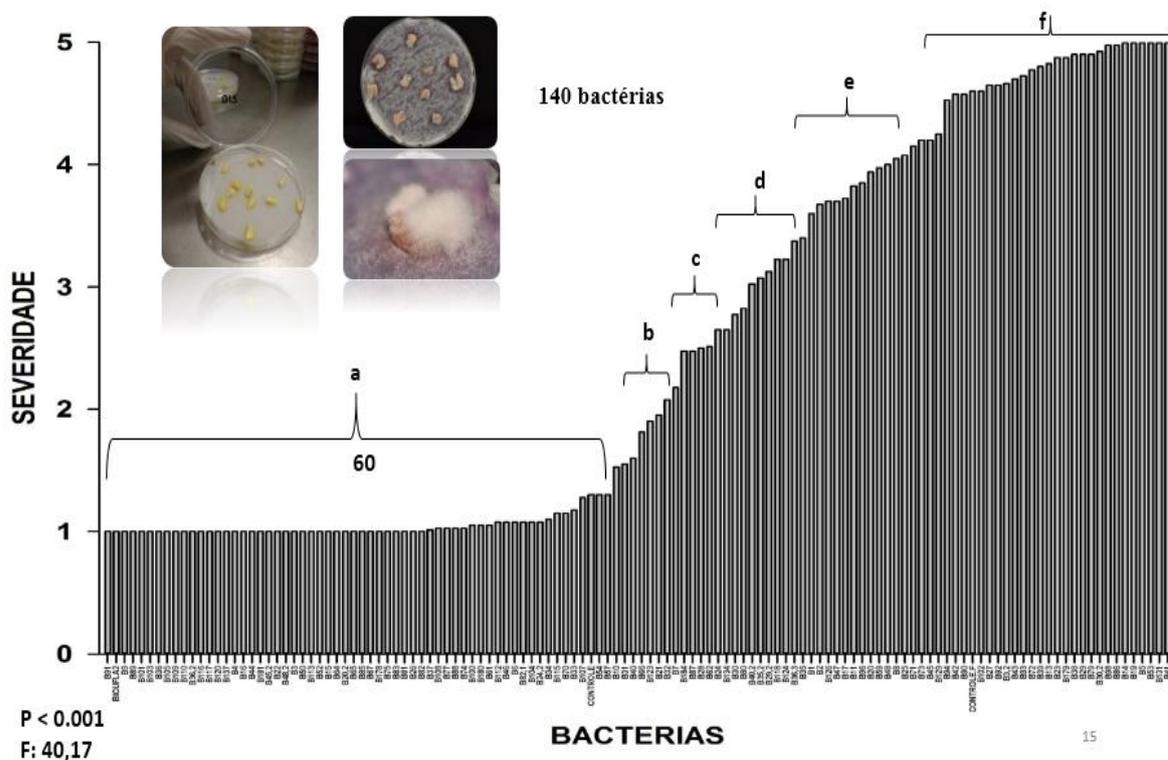
### 5.2 Seleção e avaliação *in vitro* dos possíveis agentes de biocontrole em grãos de milho canjica

Neste estudo, os melhores microrganismos foram selecionados por meio de um agrupamento de medias pelo teste de Scott-Knott. Uma técnica de *screening* nova e pouco adotada foi usada para testar diferentes microrganismos isolados do filoplano no milho e que tem como origem as combinações de diferentes tratamentos foliares (químico e/ou biológico) e que foram avaliados em sementes de milho canjica (ETHUR et al., 2014; SARAVANAKUMAR et al., 2017). Esta técnica de isca permitiu isolar microrganismo de folhas, espigas e grãos com efeito de controle a *F. verticillioides* de forma rápida e simples.

No entanto outros tipos de *screening* têm sido eficientes para o isolamento de microrganismos com bioprospecção de controle a *F. verticillioides* e a outras doenças, porém muito deles são demorados e difíceis de realizar sendo necessários reagentes e equipamento de alto custo (FIGUEROA et al., 2014; CAVAGLIERI et al., 2004). Por outro lado, poucos estudos têm usado isto como técnica inicial de *screening* e têm comprovado a capacidade real de biocontrole que tem os antagonistas diretamente no nicho (semente) quando são testados contra o patógeno (ZANOTTO et al., 2016; VERA et al., 2016). Duas técnicas de *screening* foram avaliadas, uma foi a inoculação do patógeno uma semana depois dos antagonistas e a outra foi a inoculação simultânea dos antagonistas e o patógeno nas sementes. Foi observado que a segunda técnica é muito mais eficiente, rígida e mais exigente ao possível antagonista, permitindo conhecer microrganismos que no primeiro *screening* mostraram-se bons, mas que no segundo *screening* não conseguiram controlar ao patógeno. Além disso foi possível evidenciar que os microrganismos que conseguiram controlar a *F. verticillioides* nos dois tipos de *screening* são os melhores antagonistas, pois geram uma ação preventiva (quando inoculado anteriormente ao patógeno) e competitiva por nutrientes (quando inoculado juntamente com o patógeno).

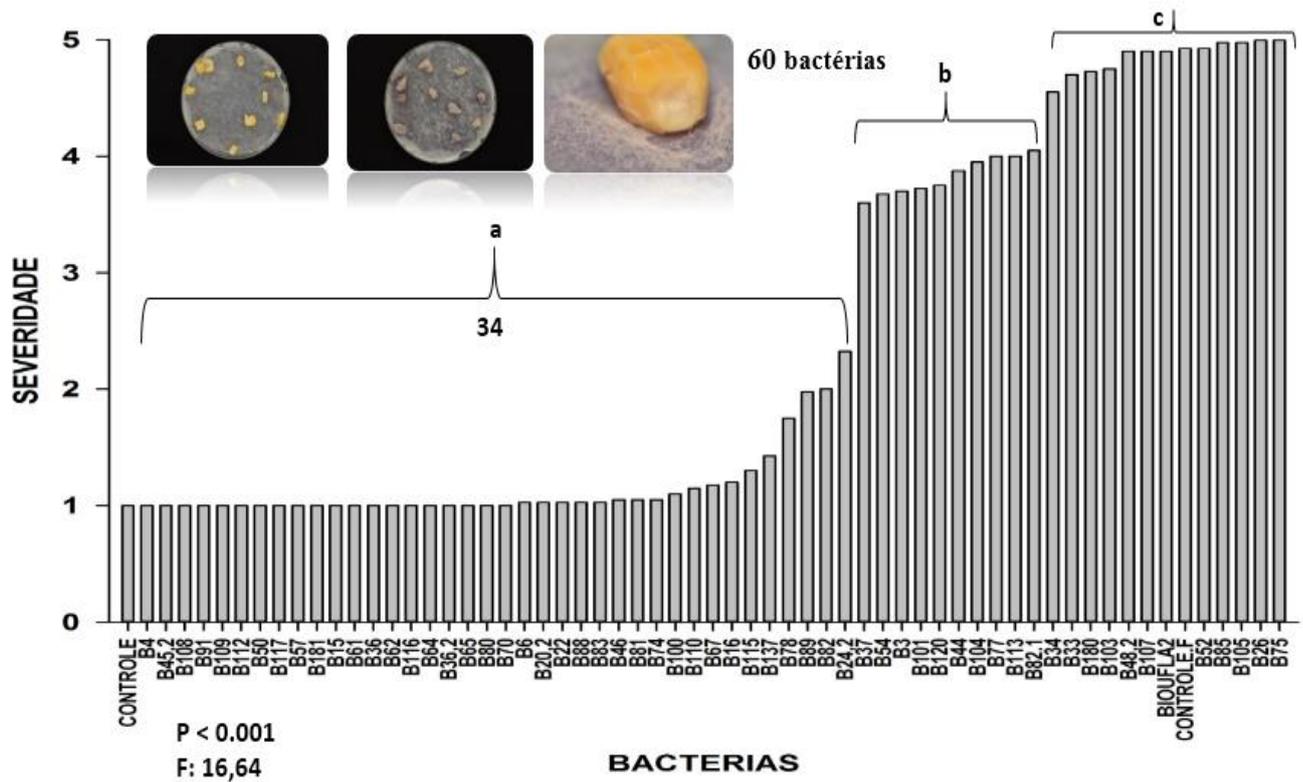
No primeiro *screening* das bactérias (FIGURA 2) foram gerados seis tipos distintos de agrupamentos de medias (a-f) com  $P < 0.001$  e  $F: 40,17$ . No entanto só foi escolhido o agrupamento (a) com escala de severidade de  $\leq 1.5$ . Neste agrupamento 60 bactérias foram selecionadas. Dentro deste agrupamento foi encontrado o controle positivo *B. subtilis* (BIOUFLA2) inibindo o crescimento do patógeno.

**Figura 2** - Separação de médias nas bactérias isoladas no teste Scott-Knott no primeiro *screening* de inoculação de *F. verticillioides* sete dias após à inoculação dos antagonistas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott com valor de  $p < 0.001$ .



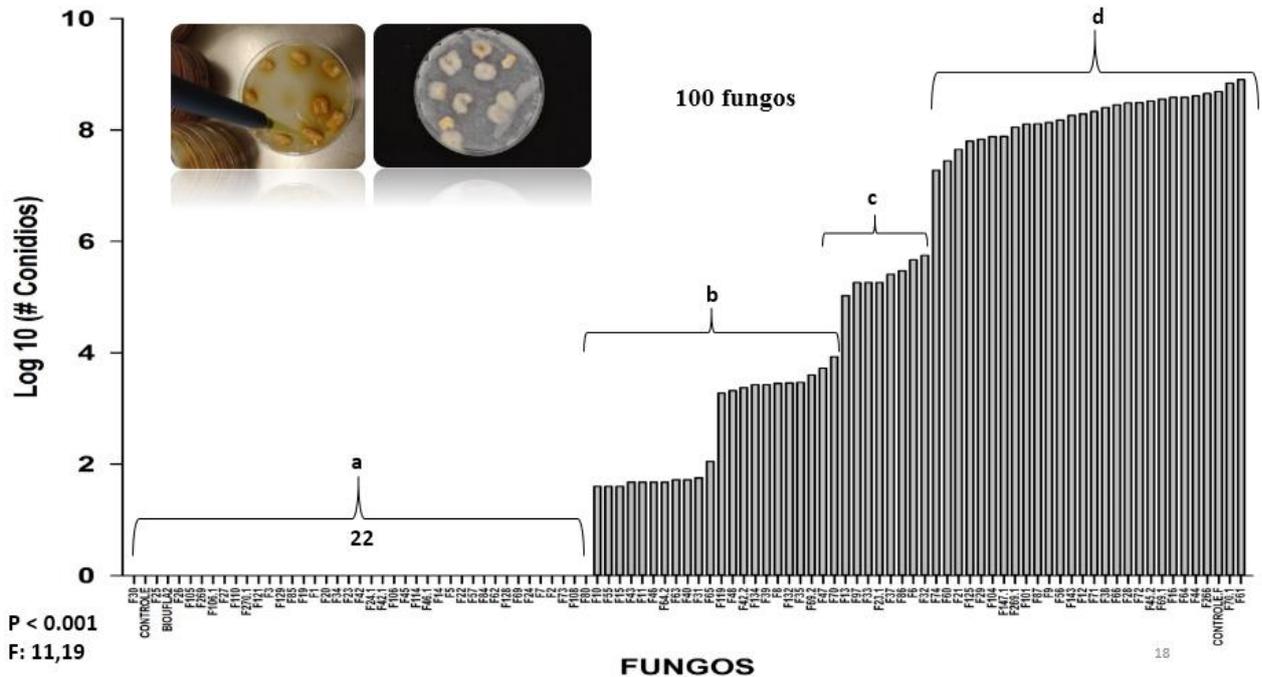
Estas bactérias foram levadas ao seguinte *screening* de inoculação simultânea. As 60 bactérias selecionadas foram tratadas simultaneamente com o patógeno nos grãos de milho canjica. No entanto agora neste teste só 34 foram capazes de controlar a *F. verticillioides*. No teste de Scott-Knott foram gerados três agrupamentos distintos (a-c) com  $P < 0.001$  e  $F: 16,64$  (FIGURA 3), no entanto só foi escolhido o agrupamento “a”, com severidade de 1 até 2,2. Neste segundo *screening* observou-se que o controle positivo BIOUFLA2 não teve efeito no controle de *F. verticillioides* recebendo como nota de severidade 5. No entanto este resultado nos permitiu corroborar que as bactérias que tiveram efeito de controle do patógeno e que tem como origem a aplicação do tratamento usando *B. subtilis* são distintas à bactéria aplicada, sendo então estas novas bactérias isoladas com efeito comprovado de controle a *F. verticillioides*. No que concerne ao tempo de aplicação do agente antagônico (BIOUFLA2) observa-se que é necessário um tempo de estabelecimento da bactéria na semente antes de inibir o crescimento do patógeno. Sendo isto uma medida preventiva que permite o estabelecimento do microrganismo para que assim consiga controlar à doença.

**Figura 3** - Separação de médias nas bactérias isoladas no teste Scott-Knott no segundo *screening* de inoculação do antagonista simultaneamente a *F. verticillioides*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott com valor de  $P < 0.001$ .



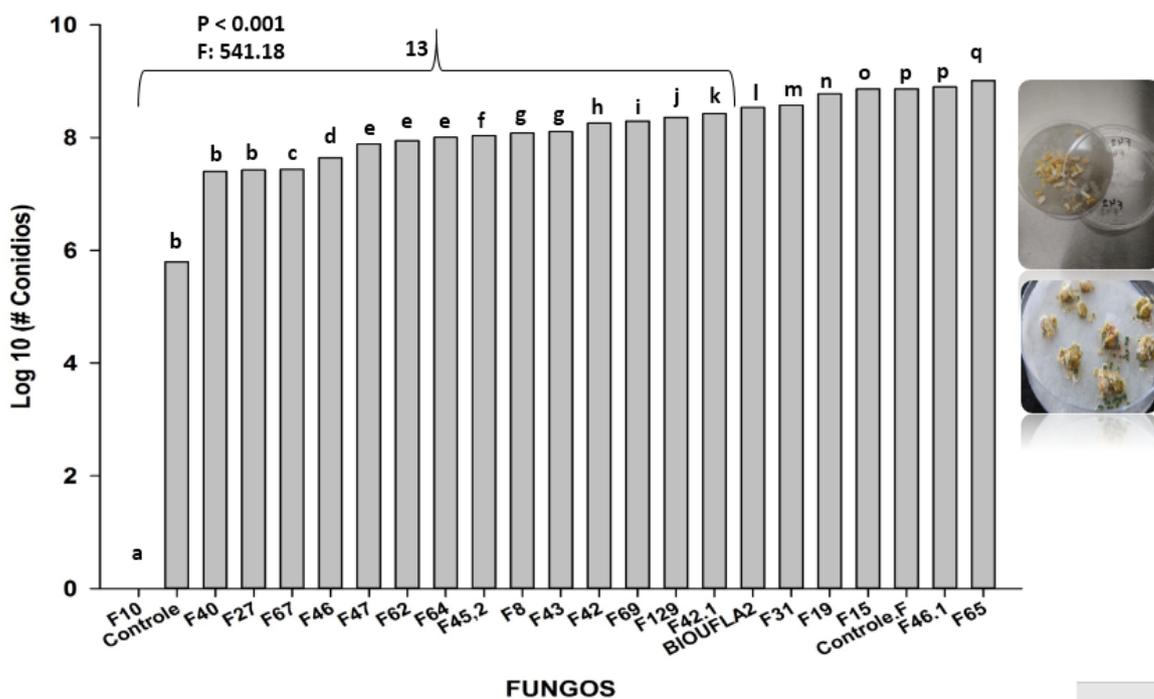
Foram isolados 100 fungos e no primeiro *screening* resultaram quatro tipos de agrupamentos distintos (a-d) no teste de Scott-Knott, com  $P < 0.001$  e  $F: 11,19$  (FIGURA 4). No entanto, só 22 fungos conseguiram controlar ao patógeno e tiveram um número de conídios igual a zero na escala de Log 10. Estes microrganismos foram selecionados e levamos para o segundo *screening*.

**Figura 4** - Separação de médias nos fungos isolados no teste Scott-Knott no primeiro *screening* de inoculação de *F. verticillioides* sete dias após dos antagonistas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott com valor de  $P < 0.001$ .



Já quando foram inoculados simultaneamente esses 22 fungos com *F. verticillioides*, foram selecionados apenas 13 fungos que controlaram ao patógeno com  $P < 0.001$  e  $F: 541,18$  (FIGURA 5). Foram gerados 17 agrupamentos distintos (a-q) em número de conídios na escala de Log 10, no entanto só foram escolhidos os agrupamentos até a letra K. Isto ocorreu devido a que depois desse grupo foi tomado o controle positivo BIOUFLA2 como limite de padrão de escolha, já não teve efeito de controle do patógeno quando é comparado com os outros agrupamentos. Encontrando-se de novo que é necessário um tempo de estabelecimento da bactéria na semente para que possa ter efeito de controle do patógeno na semente.

**Figura 5** - Separação de medias nos fungos isolados no teste Scott-Knott no segundo *screening* de inoculação do antagonista simultaneamente a *F. verticillioides*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott com valor de  $P < 0.001$ .

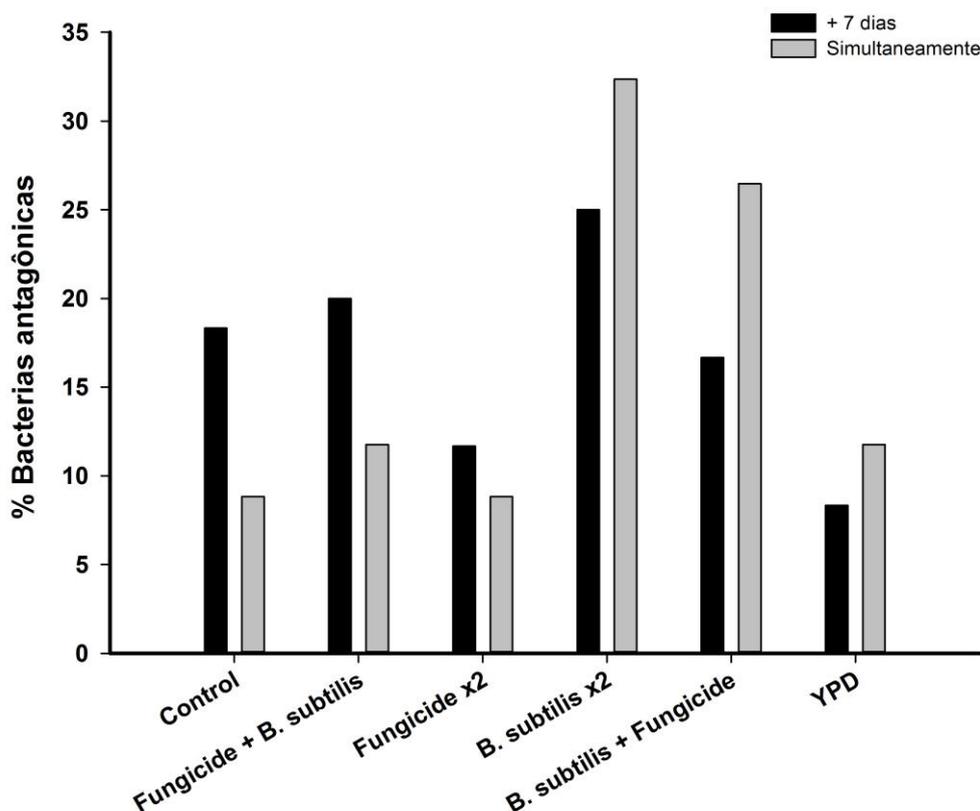


Os resultados de seleção *in vitro* dos agentes antagonísticos contra *F. verticillioides* mostraram que dentro de um grupo de microrganismos pertencentes à filosfera de plantas de milho, existem bactérias e fungos com capacidade inibitória ao patógeno de forma natural. Sendo estes microrganismos nativos ocupantes do nicho biológico na planta em diferentes períodos fenológicos e que podem ter efeito deletério ao patógeno. No entanto existem outros tipos de microrganismos que não tem efeito nenhum ao patógeno, muitas vezes sendo estes microrganismos oportunistas do nicho na planta de milho.

Por outro lado, todas as aplicações dos diferentes tratamentos foliares permitiram o estabelecimento, surgimento ou diminuição das bactérias antagonísticas nativas a *F. verticillioides* (FIGURA 6) nas plantas de milho. Foi observado que a porcentagem das bactérias antagonísticas a *F. verticillioides* foi menor quando é aplicado duas vezes o fungicida químico nas plantas de milho. Tanto no primeiro (11%) como no segundo (8%) *screening* isto quando é comparado com o controle (18 e 8%). Mas quando foi aplicado o tratamento que

tem como combinação duas vezes a *B. subtilis*, foi gerado a maior porcentual de bactérias antagonicas nativas contra *F. verticillioides* tanto no primeiro (25%) como no segundo (33%) *screening*, isto quando é comparado com o controle, sendo então este o tratamento que gerou a maior porcentagem de bactérias antagonicas além da aplicação (*B. subtilis*) contra o patógeno. Já para os tratamentos que tem como combinação o fungicida químico e *B. subtilis* resultaram semelhantes quando são comparados com o controle, no entanto a primeira aplicação do *B. subtilis* e depois do fungicida químico permitiram também o surgimento de bactérias antagonicas tanto no primeiro (16%) e segundo (26%) *screening* (FIGURA 6).

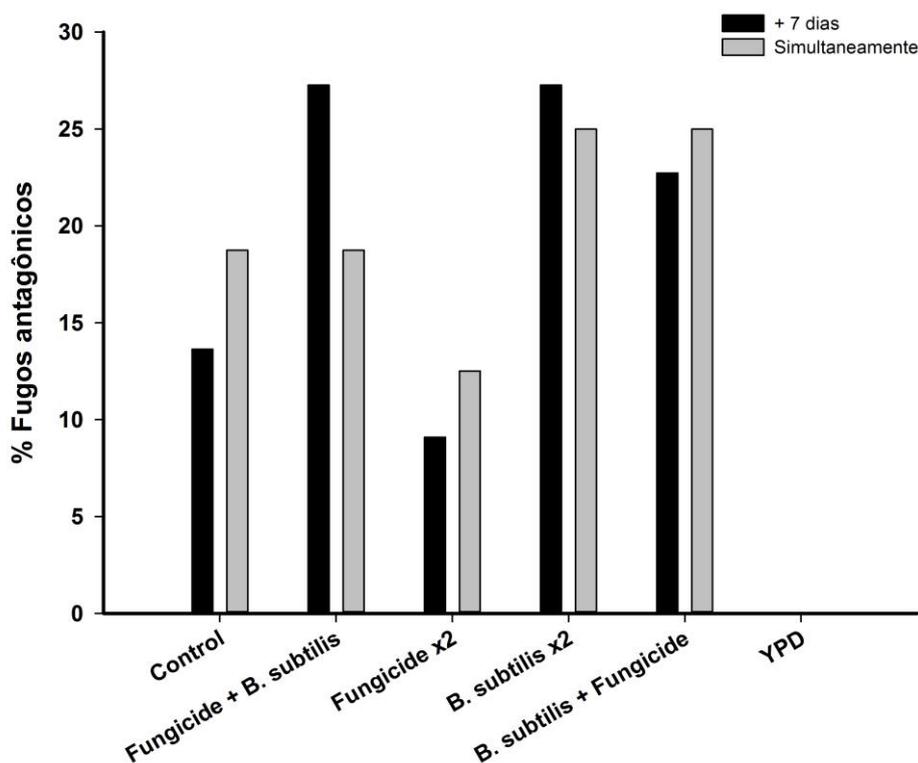
**Figura 6** - Porcentagem de bactérias antagonicas a *F. verticillioides* presentes no primeiro *screening* (inoculação de *F. verticillioides* sete dias após dos antagonistas) e segundo *screening* (inoculação simultânea dos antagonistas e o patógeno) em cada tratamento aplicado no campo.



A composição de fungos antagonistas (FIGURA 7) teve um comportamento similar ao anteriormente descrito nas bactérias. A maior porcentagem de fungos micelogénicos e

leveduras com atividade inibitória a *F. verticillioides* se apresentou nos tratamentos que tem como aplicação duas vezes *B. subtilis*, tanto no primeiro (27%) e no segundo (25%) *screening*, como também o tratamento que tem como composição: uma primeira aplicação de *B. subtilis* e depois do fungicida químico, gerando 22 e 24% de microrganismos antagonísticos respectivamente. Esta proporção de antagonistas sempre foi maior quando se compara com o controle (13 e 18%) (Figura 7). As aplicações do fungicida químico em duas ocasiões geraram as menores porcentagens de antagonistas presentes nas plantas milho contra *F. verticillioides* (Figura 7) no primeiro (8%) e segundo *screening* (12%) comparados com o controle e os outros tratamentos. Já os tratamentos que tem como combinação o fungicida químico com *B. subtilis* tiveram um comportamento similar ao controle (FIGURA 7).

**Figura 7** - Porcentagem de fungos antagonísticos a *F. verticillioides* presentes no primeiro *screening* (inoculação de *F. verticillioides* sete dias após dos antagonistas) e segundo *screening* (inoculação simultânea dos antagonistas e o patógeno) em cada tratamento aplicado no campo.



É possível evidenciar que dentro de um conjunto de microrganismos presentes no filoplano do milho, muitos deles não tem um efeito significativo de controle a *F.*

*verticillioides*. No entanto existem outros microrganismos nativos que de forma natural podem controlar o patógeno com diversos mecanismos de ação que neste trabalho foram identificados (HAICHAR et al. 2008). Essas alterações nas composições microbianas são devidas a fatores bióticos ou abióticos influenciados nas plantas ou no nicho pela ação do homem ou natureza (PÉREZ et al., 2016; MILLER et al., 1995).

Foi observado que quando foram feitas duas aplicações de *B. subtilis* nas plantas de milho a porcentagem de microrganismos antagônicos nativos (fungos e bactérias) a *F. verticillioides* aumentou. Isto possivelmente é devido ao manejo do patógeno alvo no campo (dados não quantificados) e à atuação do produto biológico gerando um menor impacto nos microrganismos nativos da filosfera que tem capacidade de controlar ao patógeno (SARAVANAKUMAR et al., 2017). A capacidade antagônica com *B. subtilis* é geralmente relatada com a produção de compostos microbianos inibitórios de alto espectro (DE JENSEN et al., 2002). Cavaglieri et al., (2005) conseguiram reduzir a incidência de *F. verticillioides* até 78% quando foram feitas aplicações de *B. subtilis* numa concentração de  $10^8$  UFC ml<sup>-1</sup>. As substâncias inibitórias produzidas principalmente por esta bactéria são os lipopeptídeos: iturina-A, amicoumacina-A, surfactina e fengicina. Estes compostos podem ter atividade antifúngica e antibacteriana intensa quando utilizadas em conjunto ou separadas (MAGET-DANA et al., 1992).

O gênero de *Bacillus* têm sido estudados por ter a capacidade de produzir compostos que permitem o estabelecimento de *quorum sensing* nas plantas entre bactérias do mesmo gênero ou de forma interespecífica com outras bactérias de gênero distinto (VLAMAKIS et al., 2013). Este mecanismo está baseado na produção, secreção e resposta de pequenos compostos chamados autoindutores (AI-2, a furanosyl-borate-diester) que geram sinais de comunicação entre os microrganismos e que podem ter efeito de controle a doenças nas plantas. Este autoindutor é comumente produzido por *B. subtilis* e pelas bactérias gram positivas (DUANIS et al., 2016). O *quorum sensing* modula vários processos celulares tais como fatores de virulência, esporulação, motilidade, produção de toxinas e o mais importante, a formação de estruturas multicelulares entre as células bacterianas e com outros microrganismos conhecido como biofilme (KOLTER & GREENBERG, 2006). Na formação do biofilme existe a produção de cadeias celulares bacterianas que possibilitam a união de matrizes extracelulares permitindo que estas fiquem juntas uma com outra, gerando uma

comunicação interespecífica entre os microrganismos, permitindo que agentes antagônicos possam-se estabelecer no nicho que compartilham favorecendo o controle de doenças nas plantas (KOBAYASHI, 2007). Essas matrizes consistem em dois componentes: polissacarídeos extracelulares (EPS) e as fibras amiloides (VLAMAKIS et al., 2013). Foi possível observar a presença qualitativa dessas matrizes de conexões de *B. subtilis* sobre as estruturas celulares (hifas e conídios) de *F. verticillioides* na leitura de microscopia de varredura (FIGURA 22).

A principal estratégia de controle de *F. verticillioides* em milho é o uso de fungicidas químicos. No entanto a adoção desta estratégia não é eficiente, já que além de não exercer controle quando se compara com outros tratamentos, pode aumentar a incidência o teor de fumonisinas nos grãos do milho (ZANOTTO et al., 2016; JULIATTI et al., 2007). Encontrou-se que quando eram feitas duas aplicações do fungicida químico a porcentagem de microrganismos benéficos (fungos e bactérias) no milho diminuíram notavelmente. Esses dados no presente trabalho indicam que a implementação desta estratégia de controle atua gerando uma redução drasticamente desses microrganismos nas áreas onde foram aplicadas, eliminando microrganismos nativos que poderiam controlar e ser promissores contra o patógeno. Permitindo a rápida multiplicação e livre colonização de outros tipos de microrganismos que muitas vezes podem ser outros patógenos (GHINI & BETTIOL, 2005). O uso de produtos químicos para o controle de doenças em plantas frequentemente gera redução dos fitopatógenos, no entanto também produz um impacto negativo nas comunidades microbianas que estão associadas às plantas. Essas comunidades microbianas possuem um papel importante na qualidade e fertilidade do solo e no desenvolvimento de barreiras de entradas contra patógenos na filosfera (SARAVANAKUMAR et al., 2017). Alguns trabalhos têm demonstrado que comunidades microbianas presentes no filoplano ou rizoplano podem favorecer de forma natural o controle dessas doenças quando existe um equilíbrio no microbioma das plantas (DUBEY et al., 2007; GADERER et al., 2015).

Os tratamentos que tiveram a aplicação de *B. subtilis* em combinação com o fungicida químico e vice-versa, influenciaram no surgimento de possíveis microrganismos antagônicos ao patógeno. Isto provavelmente devido a que o produto químico atua na filosfera reduzindo todo tipo de microrganismos benéficos como também a *Fusarium verticillioides*, permitindo que após à aplicação de *B. subtilis*, células bacterianas colonizem rapidamente

esses espaços sem vida gerados pelo fungicida e permita o estabelecimento de possíveis microrganismos competidores ao patógeno. No entanto quando foi aplicado primeiro a bactéria e logo o fungicida se produz um menor impacto na comunidade microbiana, devido a que microrganismos que tinham colonizado anteriormente pela aplicação do agente antagônico, conseguiram recolonizar novamente esses espaços intracelulares favorecidos pela aplicação do produto químico. Sendo esta uma característica de sinergia desejada num pacote integrado de manejo de doenças. Resultados similares foram encontrados por Dubey et al., (2007), onde aplicações de *Trichoderma harzianum* ou em combinação a um fungicida químico (Carboxin) tiveram o mesmo efeito de controle a *Fusarium oxysporum*.

As comunidades microbianas benéficas conseguem metabolizar rapidamente estes compostos químicos permitindo que novas colônias possam-se estabelecer ou que estas se recuperem e possam ter um efeito de controle aos possíveis patógenos. O produto químico atua levando a doença até um limiar econômico de dano permitindo que as populações microbianas atuem rapidamente controlando os vestígios do patógeno restantes e latentes na planta (JACOBSEN et al., 2004). De igual forma foi encontrado em um estudo que quando *B. subtilis* é aplicado com oxiclureto de cobre ou oxiclureto de benomilo, este fornece muito mais controle à mancha preta em abacate causado por *Pseudocercospora purpurea* que quando são aplicados separados (KORSTEN et al., 1997). Porém estudos com *Bacillus* sp, em combinação a produtos químicos para o manejo de doenças foliares são muito escassos e a explicação a esse tipo de comportamento ainda não é conhecido.

### **5.3 Identificação dos principais mecanismos de ação envolvidos pelos microrganismos**

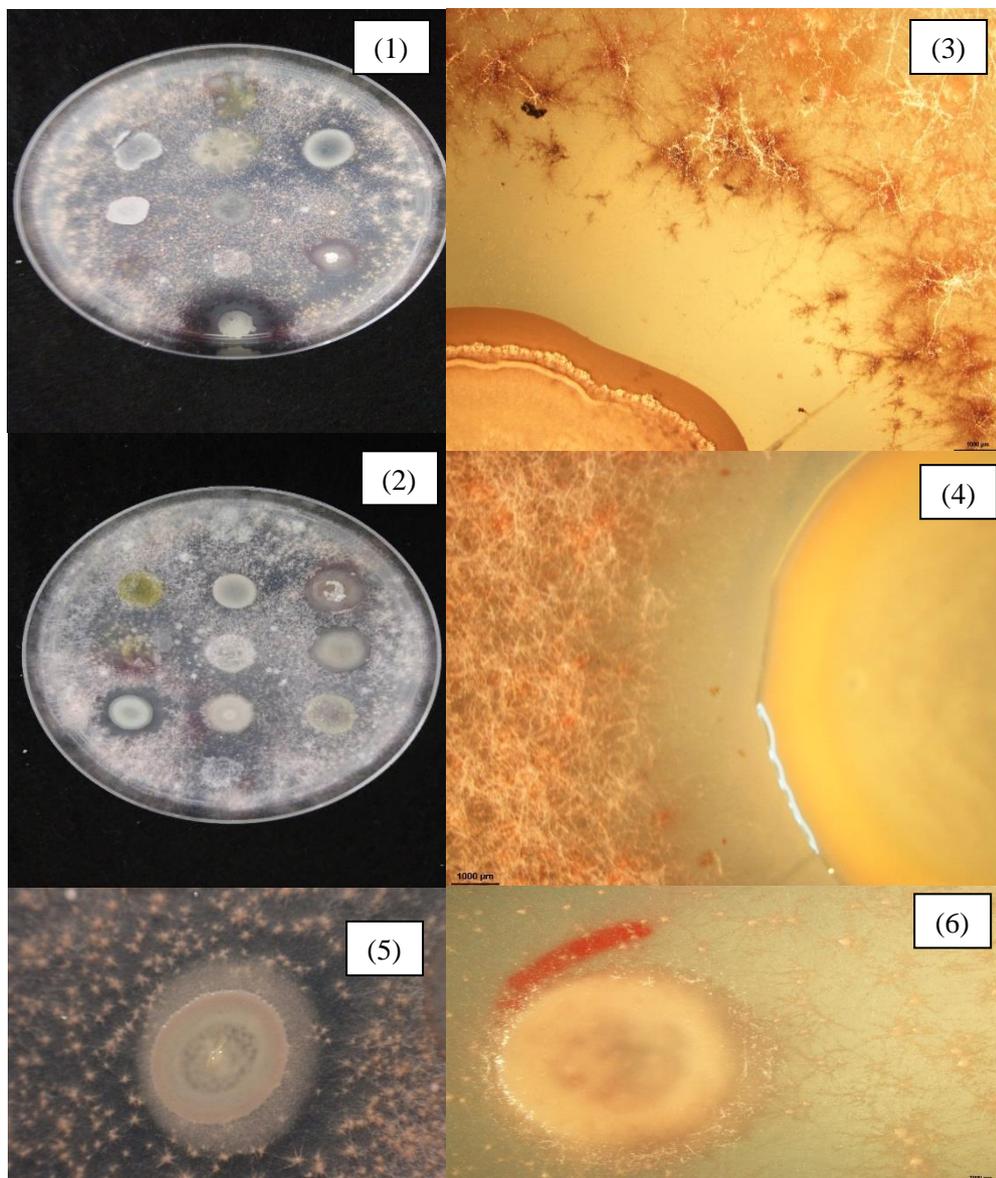
Os microrganismos resultantes no final do segundo *screening* (inoculação simultânea dos agentes antagônicos em conjunto ao patógeno) foram selecionados e o principal mecanismo de ação envolvido pelo microrganismo para o controle de *F. verticillioides* foi identificado.

### 5.3.1 Avaliação da produção de possíveis antibióticos pelos microrganismos antagônicos

Ao final do segundo *screening* foram selecionadas 34 bactérias por ter a capacidade de controlar a *F. verticillioides* em sementes de milho canjica quando aplicadas uma semana antes e simultaneamente ao patógeno. Estas bactérias foram levadas a um teste qualitativo de confrontação direta junto ao patógeno e foi avaliada a produção de antibióticos.

Das 34 bactérias isoladas só duas bactérias (B45,2 e B100) conseguiram produzir halo de inibição (FIGURA 8.1 e 8.2) contra *F. verticillioides*. Estas bactérias apresentaram características morfológicas bem distintas como também a origem do tratamento aplicado em campo. A coloração da bactéria B45,2 é branca, seca, opaca e gerou um halo de inibição com morte celular do micélio do patógeno de cor vermelho visível (FIGURA 8.3). Este halo foi superior ao da bactéria B100, e teve como origem o tratamento T5, o qual é primeiro a aplicação de *Bacillus subtilis* e depois do fungicida químico. Por outra parte, a bactéria B100 teve uma coloração amarela, viscosa e brilhante. A bactéria apresentou um halo com circunferência perfeita (FIGURA 8.4) e teve como origem o tratamento T3, o qual são duas vezes a aplicação do fungicida. O controle positivo a base de *B. subtilis* (BIOUFLA2), gerou um tipo de pseudo-halo de inibição tendo como formato dois tipos de halos (um maior e outro menor) e apresentou uma cor branco com roxo, viscoso de formato irregular (FIGURA 8.5).

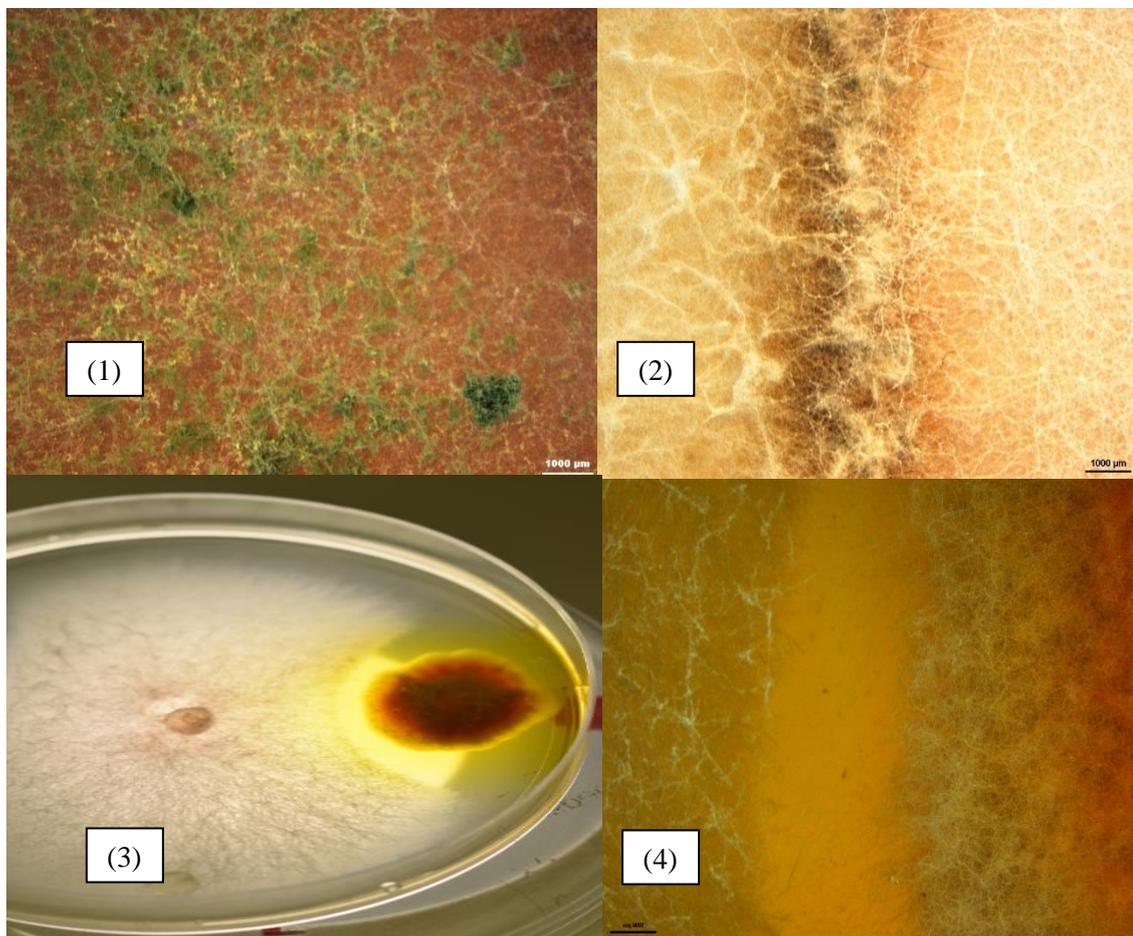
**Figura 8** - Resultado do teste de antibioses nas bactérias (1). Halo de inibição gerado pela bactéria B45,2 (2) e B100 (3). Pseudo-halo gerado por *Bacillus subtilis* (4 e 5).



Em relação aos fungos, dos 13 microrganismos selecionados logo após o segundo *screening*, só três fungos geraram um tipo de resposta de controle visível contra o patógeno. Os fungos F8 e F42 (FIGURA 9.1 e 9.2) geraram um ponto de interseção com o patógeno, o qual poderia ser explicado com um mecanismo de micoparasitismo. Já o fungo F46 (FIGURA 9.3) produz um halo de inibição visível possivelmente à base de antibióticos. O fungo F8 (FIGURA 9.1) apresentou uma coloração micelial verde e um tipo de esporulação granular amarela. As características do fungo F42 (FIGURA 9.2) foram diferentes apresentando uma massa micelial de cor branca e no ponto de intersecção com o patógeno uma coloração escura.

O halo de inibição gerado pelo fungo F46 (FIGURA 9.4) sempre foi acompanhado pela produção de uma substância amarela forte brilhante, a massa micelial foi alaranjada e amarela e o espaço entre o patógeno e o antagonista sempre foi bem distante quando se compara com o controle (apenas crescimento do patógeno em cultura pura).

**Figura 9** - Resultado do teste de antibiotes e competição nos fungos F8 (1) e F42 (2). Halo de inibição gerado pelo fungo F46 (3) e (4) contra *F. verticillioides*.



Foram identificadas duas bactérias e um fungo no teste placa dual por ter a capacidade de produzir antibióticos contra *Fusarium verticillioides* e dois fungos foram encontrados gerando um tipo de micoparasitismo ao patógeno no ensaio os quais foram corroborados na electromicrografia de varredura.

### 3.2 Determinação do NOI entre os antagonistas e *F. verticillioides*

O uso das diferentes fontes de carbono e nitrogênio foi diferente em cada microrganismo. Dentre as bactérias só BIOUFLA2 conseguiu usar as mesmas fontes de nutrientes durante os três dias (24, 48 e 72h) de avaliação semelhante a *F. verticillioides*, portanto o Índice de Sobreposição do Nicho (NOI) foi 1 na absorbância a 490 nm (TABELA 2.1). A bactéria B100 a partir do terceiro dia (72h) de avaliação conseguiu ter um NOI de 0,94 (TABELA 2.1) sendo este o único dia no qual a bactéria compete contra *F. verticillioides* pelos nutrientes e o espaço. Já a bactéria B45,2 não conseguiu usar as mesmas fontes de nutrientes (TABELA 2.1) do patógeno, por tanto durante os três dias de avaliação esta bactéria representa só ocupação de nicho separados. Nos fungos o resultado do NOI foi diferente, dos três fungos avaliados só F42 não conseguiu usar o total das diferentes fontes de nutrientes (TABELA 2.2), representando então ocupação de nicho diferentes. Os fungos F46 e F8 conseguiram a partir do primeiro dia (24h) até o ultimo dia de avaliação (72h) usar as mesmas fontes de carbono e nitrogênio ao igual que *F. verticillioides*, sendo então o NOI 1 na absorbância a 750 nm (TABELA 2.2) representando competição de nicho pelos nutrientes e o espaço.

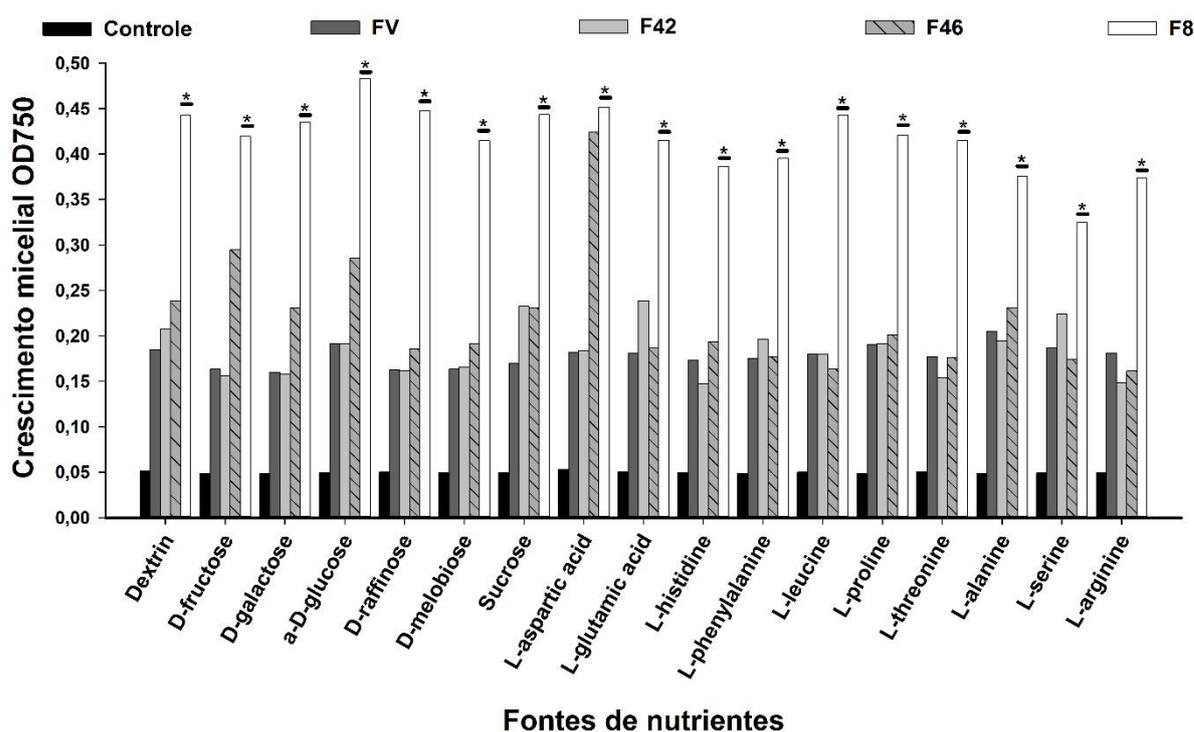
**Tabela 2** - Resultado do NOI a 490 nm nas bactérias (1) e nos fungos a 750nm (2) durante os três dias de avaliação.

(1)					(2)				
	NOI			490		NOI			490
<b>Bactéria</b>	<b>24</b>	<b>48</b>	<b>72</b>		<b>Fungo</b>	<b>24</b>	<b>48</b>	<b>72</b>	
<b>B100</b>	0,88	0,88	0,94		<b>F42</b>	0,23	0,23	0,52	
<b>B45,2</b>	0,05	0,11	0,59		<b>F46</b>	1	1	1	
<b>BIOUFLA2</b>	1	1	1		<b>F8</b>	1	1	1	
	NOI			750		NOI			750
<b>Bactéria</b>	<b>24</b>	<b>48</b>	<b>72</b>		<b>Fungo</b>	24	48	72	
<b>B100</b>	0,7	0,88	0,88		<b>F42</b>	0,11	0,17	0,35	
<b>B45,2</b>	0	0,17	0,65		<b>F46</b>	1	1	1	
<b>BIOUFLA2</b>	0,41	0,7	1		<b>F8</b>	1	1	1	

Analisando os 17 poços individualmente nas placas ELISA pôde-se observar que cada microrganismo utilizou diferentes fontes de nutrientes entre eles e o patógeno, logo após

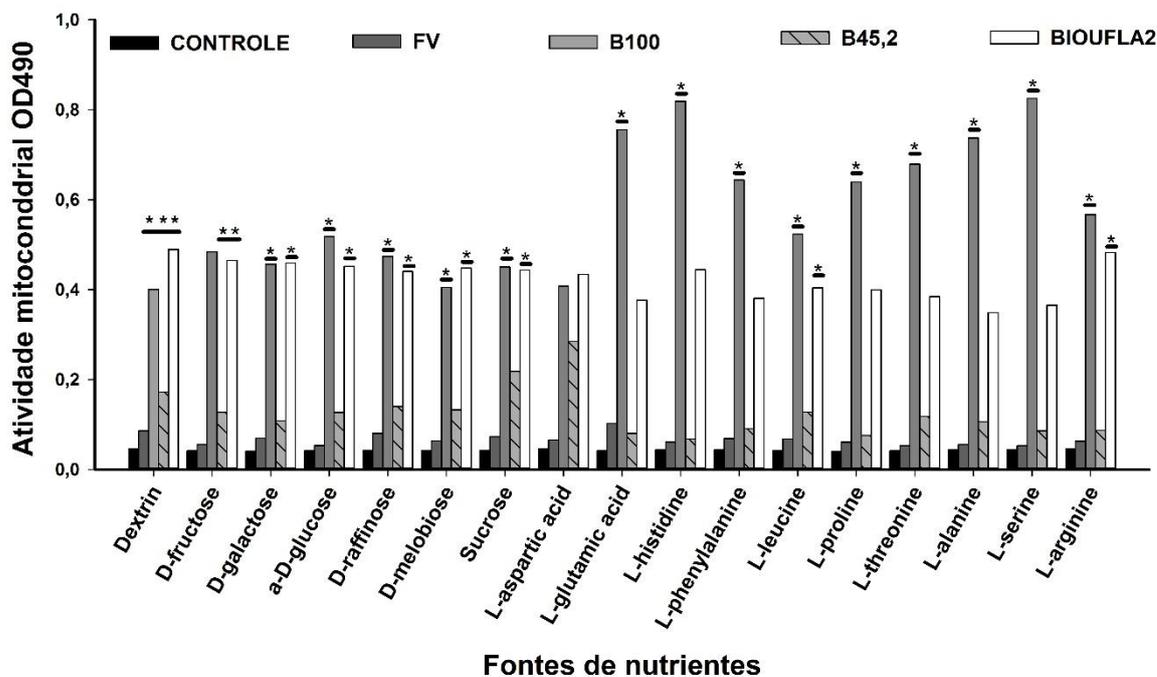
24 horas de avaliação (FIGURA 10). Diferenças significativas foram encontradas no crescimento do isolado F8 (FIGURA 10) em comparação com outros fungos e o patógeno. Este isolado conseguiu usar todos os nutrientes (Dextrin, D-fructose, D-galactose, a-D-glucose, D-raffinose, D-melobiose, Sucrose, L-aspartic acid, L-glutamic acid, L-histidine, L-phenylalanine, L-leucine, L-proline, L-threonine, L-alanine, L-serine e L-arginine) em comum a *F. verticillioides* para seu crescimento, no entanto ele foi muito mais eficiente e rápido em capturar e usar esses nutrientes num período de 24 horas em comparação ao patógeno e os outros fungos avaliados. Este espaço de tempo é o mais importante devido a que em condições naturais, quem consiga crescer mais rápido e colonize o nicho de forma mais eficiente assegura o estabelecimento do microrganismo contra outros futuros hospedeiros (competidores) pelo espaço e os nutrientes, sendo esta uma ótima estratégia no controle biológico de doenças foliares e em grãos. Da mesma forma o fungo F46 usou todas as fontes de carbono e nitrogênio (FIGURA 10) presentes nas placas ELISA num período de 24h, no entanto só nos nutrientes Dextrin e D-fructose existiram diferença significativas quando é comparado com o patógeno e o fungo F42. Não se encontrou significância no fungo F42 em comparação com o patógeno na utilização das diferentes fontes de carbono e nitrogênio.

**Figura 10** - Uso das diferentes fontes de nutrientes por cada fungo avaliado em 24h a 750 nm. Médias seguidas com asteriscos diferem estatisticamente pelo teste de Tukey com valor de  $P < 0.05$ .



Avaliando os 17 poços individualmente nas placas ELISA pode-se observar que nas bactérias cada microrganismo utilizou diferentes fontes de nutrientes logo após de 24 horas de avaliação (FIGURA 11). Diferenças significativas foram encontradas no uso das fontes de nutrientes nos tratamentos BIOUFLA2 e B100 quando são comparados com o controle, B45,2 e *F. verticillioides* (FIGURA 11). Pode-se observar que estas duas bactérias utilizaram muito mais rápido os nutrientes (Dextrin, D-fructose, D-galactose, a-D-glucose, D-raffinose, D-melibiose, Sucrose, L-glutamic acid, L-histidine, L-phenylalanine, L-leucine, L-proline, L-threonine, L-alanine, L-serine e L-arginine) e foram mais eficientes em crescer nessas condições que os outros tratamentos, no entanto não foram encontradas diferenças significativas no aminoácido L-aspartic acid entre os tratamentos e quando são comparados com o controle. Estes resultados demonstram que além destas bactérias serem altamente eficientes em competir pelos nutrientes presentes no nicho (milho) podem também produzir antibióticos que inibem o crescimento do patógeno *F. verticillioides in vitro*. Já na bactéria B45,2 diferenças significativas só foram encontradas nos nutrientes: Dextrin (em comparação a *F. verticillioides* e o controle) e Sucrose (quando comparado com o controle). Estes resultados mostram que o principal mecanismo de biocontrole desta bactéria não é a competição pelos nutrientes presentes no milho, mas sim pela produção de compostos secundários (antibióticos) com efeito comprovado de inibição no crescimento de *F. verticillioides* (FIGURA 11). Além disso é possível evidenciar a preferência e a rápida utilização dos aminoácidos por parte do isolado B100, quando se compara com as outras fontes de nutrientes(açúcares) presentes na placa de Elisa entre os outros microrganismos.

**Figura 11** - Uso das diferentes fontes de nutrientes por cada bactéria avaliada em 24h a 490 nm. Médias seguidas com asteriscos diferem estatisticamente pelo teste de Tukey com valor de  $P < 0.05$ .



O estudo do NOI sugere que o crescimento e uso das fontes de nutrientes (carboidratos e aminoácidos) entre os antagonistas isolados, *B. subtilis* e o patógeno são diferentes. Foi observado que *F. verticillioides* conseguiu utilizar todas as fontes de nutrientes avaliadas *in vitro* e que estão presentes no milho. Além disso, foi evidenciado que não existe uma correlação entre a produção de compostos antimicrobianos e os mecanismos de competição envolvidos pelos antagonistas (CAVAGLIERI et al., 2004a). Porém, foi encontrado que o isolado de referência como controle positivo BIOUFLA2 e o fungo *Epicoccum nigrum* (F46) além de produzir halo de inibição no teste de antibioses, foram capazes de competir pelo espaço e os nutrientes contra *F. verticillioides* a partir do primeiro dia de avaliação (24h) até o último (72h). Estes resultados estão de acordo aos achados por Cavaglieri et al., (2004b) onde um isolado de *B. subtilis* foi capaz de gerar um alto índice de sobreposição de nicho quando foi testado contra *F. verticillioides*. Se constatou também a fonte de preferência do crescimento do isolado B100 foram os aminoácidos, isto quando se compara com as outras fontes de nutrientes (açúcares) presentes no milho. Este isolado conseguiu crescer muito mais rápido nas fontes de aminoácidos que os outros fungos

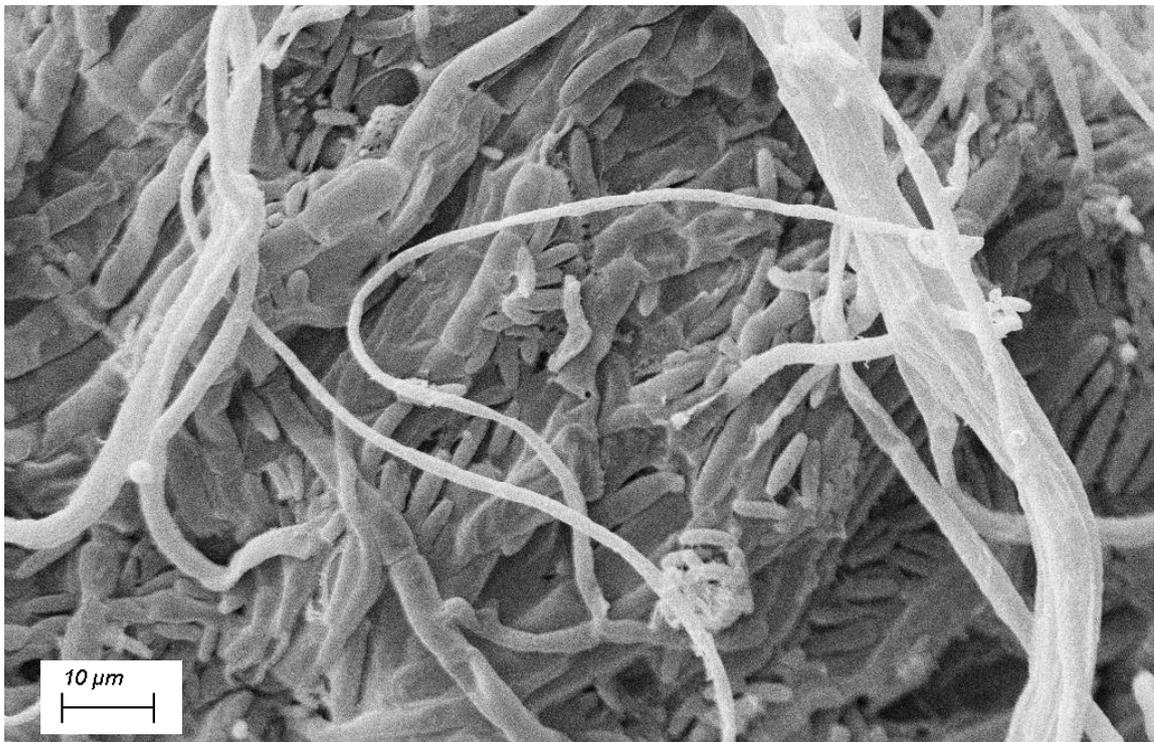
antagonistas. Isto se assemelha ao achado por Morris, (1982) onde comunidades de bactérias epifíticas apresentaram preferência pelos aminoácidos e não pelas fontes de carboidratos. A medida que o tecido ia ficando mais senescente os microrganismos eram capazes de usar a maioria das fontes de carbono e nitrogênio em feijão. Esta característica nos indica que microrganismos do filoplano estão associados a condições fenológicas e meio ambientais que se apresentam no milho em condições de campo. Seu ciclo de vida junto ao desenvolvimento de mecanismos de ação para o controle de doenças está correlacionado a fatores externos que podem favorecer seu crescimento (VIEIRA et al., 2009; DEACON, 1997).

Já nos resultados obtidos com *E. nigrum*, Lopez et al., (1998) evidenciaram a alta capacidade de competitividade deste fungo quando foi testado com *Monilinia laxa* pois este usou a maioria dos nutrientes avaliados, tendo como NOI 0.98. De igual forma o isolado F8 *Trichoderma* além de gerar micoparasitismo teve um alto NOI: Este mecanismo de competição tem sido encontrado em diferentes espécies de *Trichoderma* contra diversos fitopatógenos. Altos níveis de competitividade estão relacionados ao tipo espécie que possa ser encontrada, sendo esta uma característica essencial na seleção massal de microrganismos (KRAUS et al., 2004). Além do NOI servir como um teste de identificação e caracterização dos compostos usados por possíveis antagonistas e o patógeno, ele pode ser uma estratégia de *screening* que permite identificar novos microrganismos promissores com capacidade de controle de fitopatógenos na filosfera (GEANGE et al., 2011; PAMPHILE et al., 2008). Diferentes estudos com microrganismos fitopatogênicos tem sido conduzido para encontrar novos microrganismos promissores em diferentes condições ambientais de nicho da filosfera e rizosfera (LA PENNA et al., 2004; MUNIMBAZI & BULLERMAN, 1998; MARIN et al., 1998). A importância é devida a que os microrganismos que tem um alto índice do NOI > 0.9, são microrganismos que quando entram em contato com o nicho antes que o patógeno, vão ter a capacidade competitiva de colonização nas plantas (MEHL et al., 2011). Por este motivo no ambiente do filoplano a capacidade de competição será maior quando se apresenta uma sobreposição do agente antagônico e do fitopatógeno pelas mesmas fontes de nutrientes que estão presentes no hospedeiro. Por tanto a coexistência entre os microrganismos será afetada quando existir maior grau de similaridade filogenética na utilização dos nutrientes. Isto gera um maior grau de sobreposição e os microrganismos que apresentam esta característica poderão ser um objeto importante de estudo (VIERA et al., 2009).

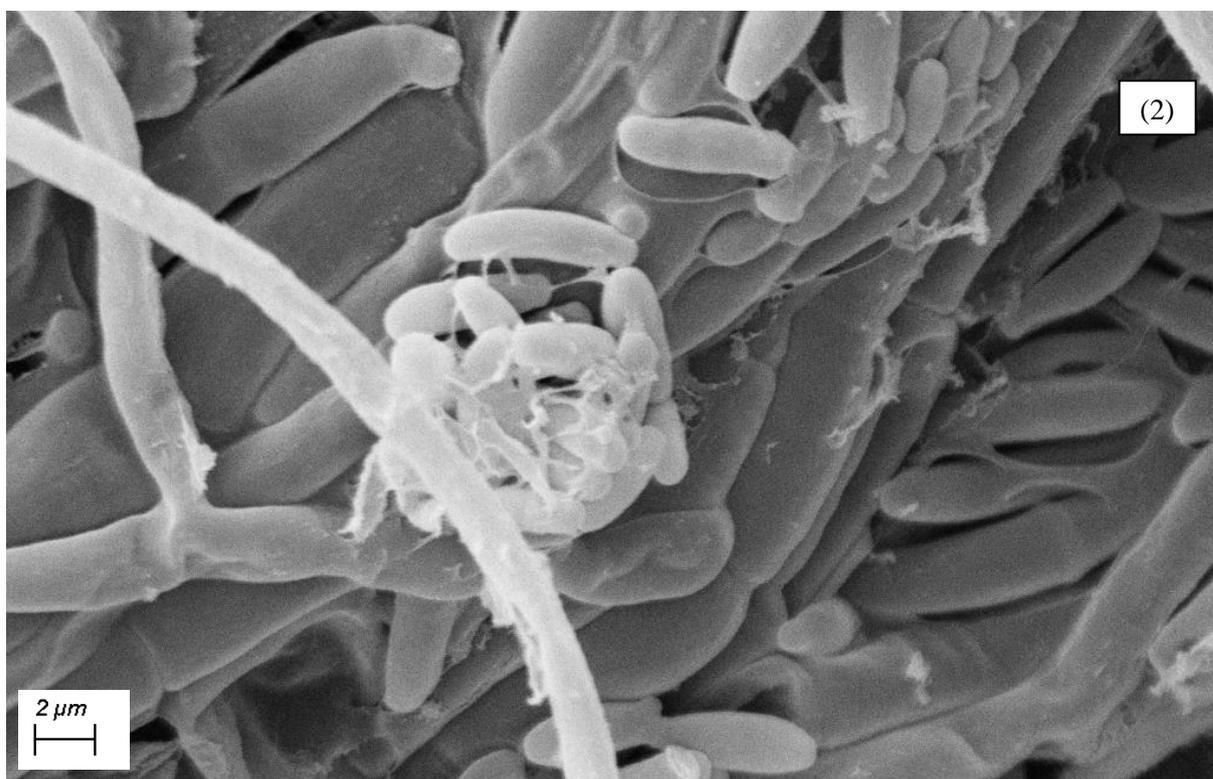
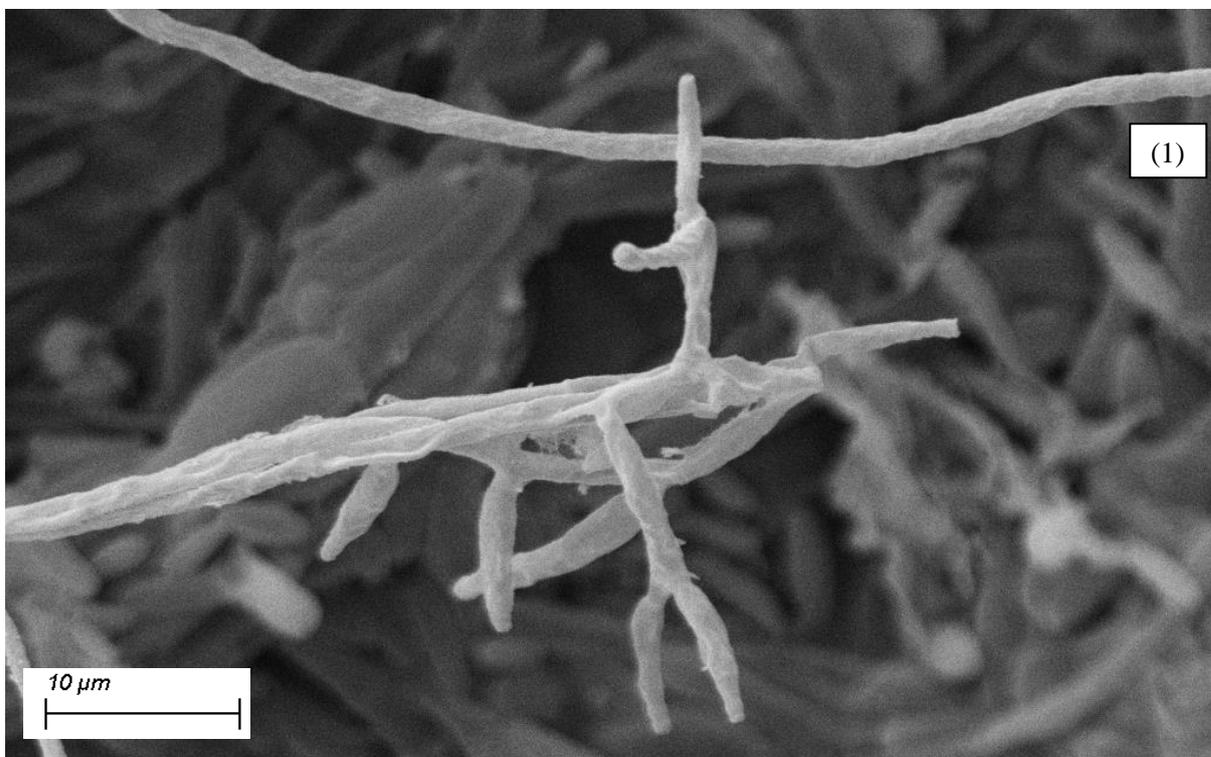
### 5.3.3 Alterações celulares observadas por microscopia de varredura no teste de antibioses e identificação molecular

No estudo de microscopia de varredura, os fungos e as bactérias geraram alterações celulares no patógeno, inibindo o seu crescimento e produzindo morte celular das hifas quando comparadas com o controle (só *F. verticillioides* em cultura pura). Na Figura 12, pode-se observar o crescimento micelial normal de *F. verticillioides* em colônias puras no meio BDA sem a presença dos antagonistas. Se apresenta a formação de massas de conídios e hifas sem nenhuma alteração celular visível do patógeno. Na Figura 13.1 se observa a estrutura de um conidióforo em mono e polifiálide de *F. verticillioides* e na Figura 13.2 o desenvolvimento de uma falsa cabeça que tem como agrupamento uma massa de micro conídios.

**Figura 12** – Electromicrografia de varredura em close mostrando uma massa de conídios (A) e hifas (B) do patógeno *F. verticillioides*. Barra de escala: 10  $\mu\text{m}$ .



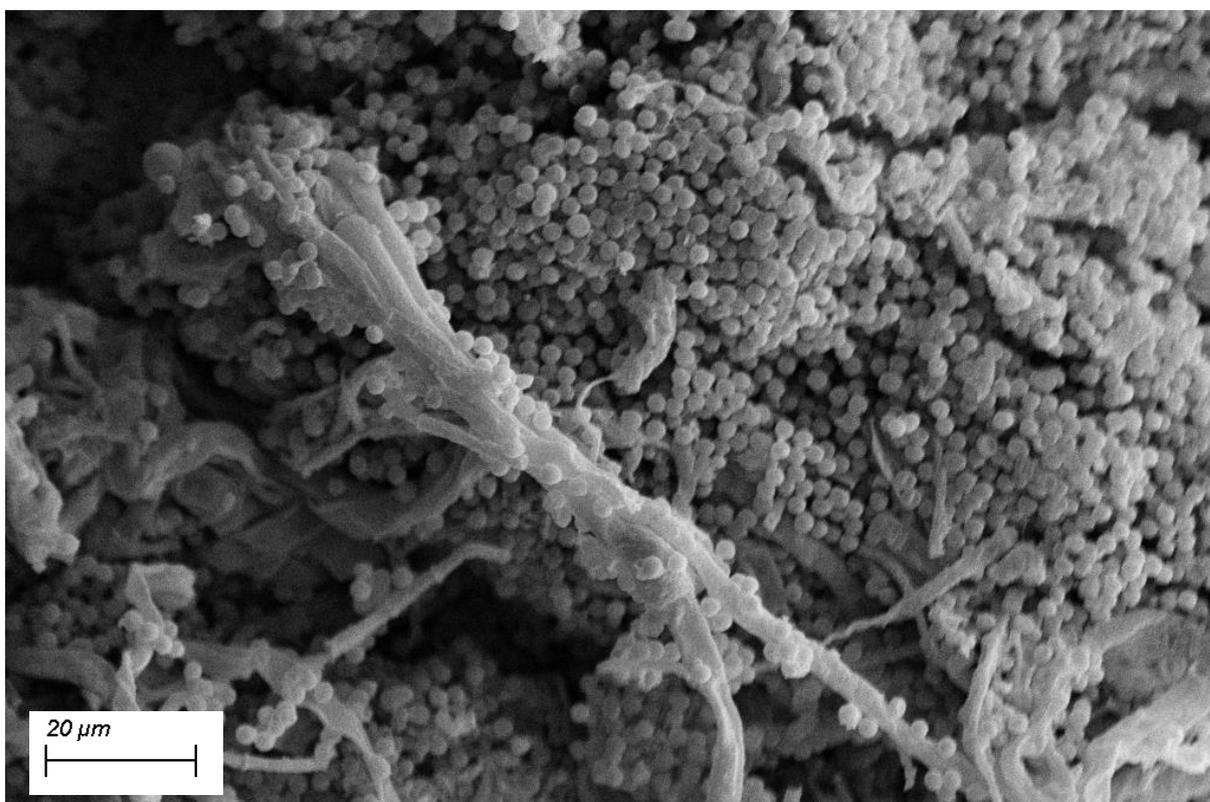
**Figura 13** – Electromicrografia de varredura em close de um conidióforo em mono e polifialide (1) com barra de escala: 10  $\mu\text{m}$ ., e a formação de uma falsa cabeça (2) de *F. verticillioides*, com barra de escala: 2  $\mu\text{m}$ ..



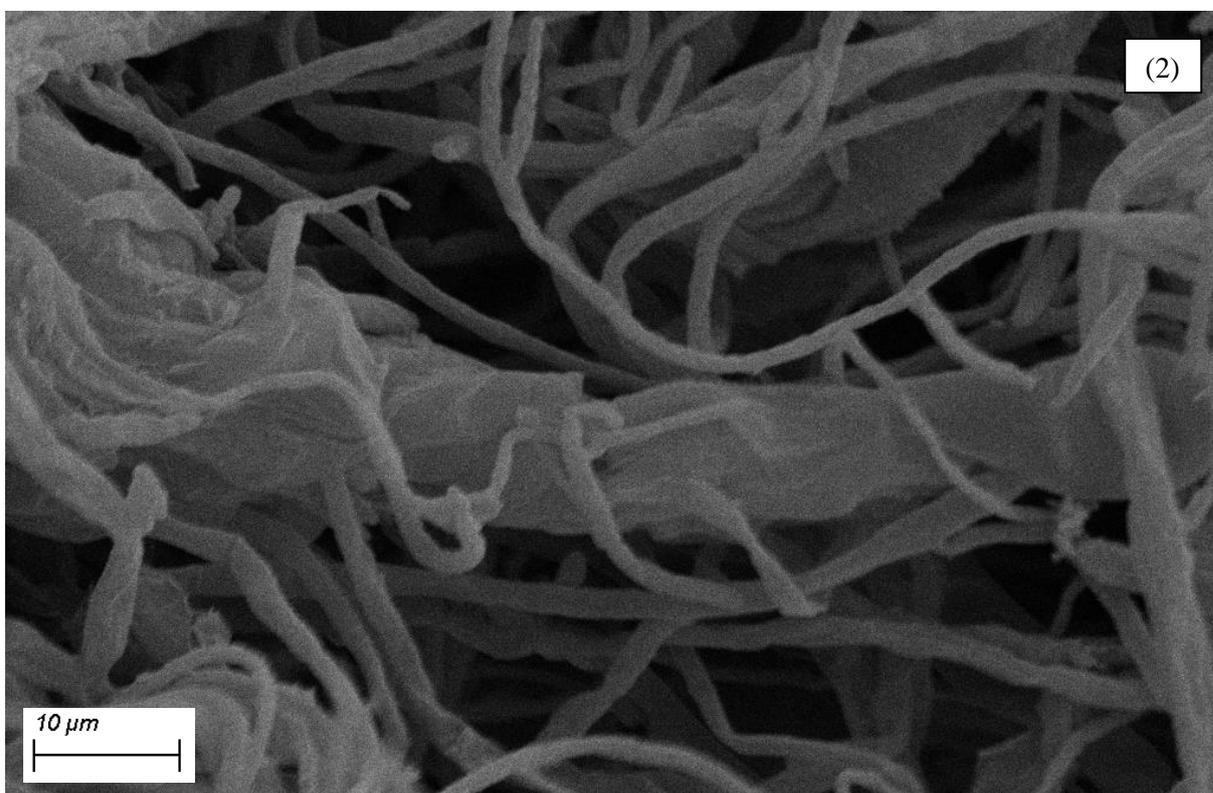
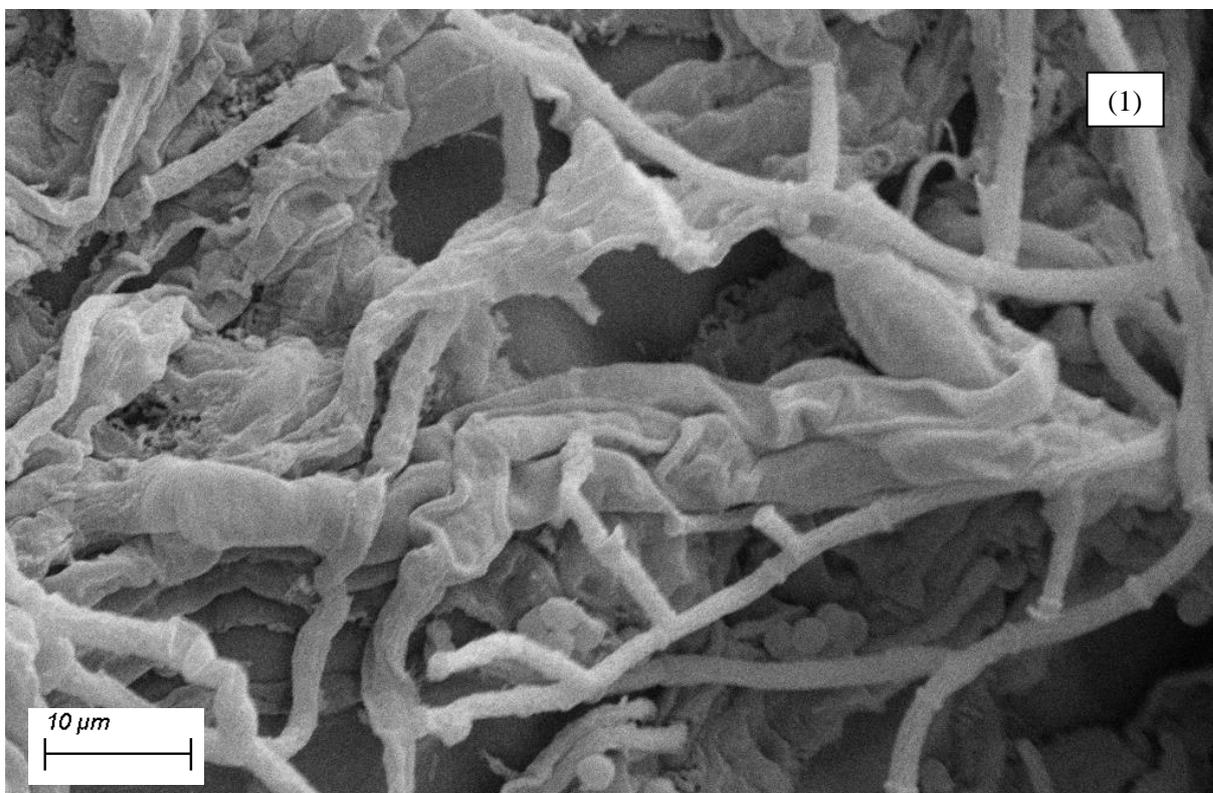
Foi realizada a caracterização morfológica deste fungo (dados não inclusos) no laboratório de Micologia do departamento de fitopatologia da UFLA. Este isolado foi identificado como *Trichoderma* sp. A identificação filogenética ainda está sendo realizada.

Na Figura 14, é possível observar a interação entre o tratamento F8 e *F. verticillioides*, onde claramente se observa o agrupamento exponencial de massas de conídios crescendo sobre as hifas do patógeno (FIGURA 14). Pode-se distinguir um tipo de degradação, murcha e perda de turgência na hifa de *F. verticillioides* (FIGURA 15.1) por causa de *Trichoderma* sp, além de um crescimento micelial aéreo sobre o patógeno em comparação ao controle (cultura pura do patógeno). Foi encontrado um tipo de enrolamento das hifas do antagonista sob o micélio do patógeno atrapalhando o desenvolvimento deste no meio BDA (FIGURA 15.2).

**Figura 14** – Electromicrografia de varredura mostrando um aglomerado de massas de conídios do fungo F8 (*Trichoderma* sp) atacando e crescendo sobre as hifas de *F. verticillioides*, Barra de escala: 20  $\mu$ m.



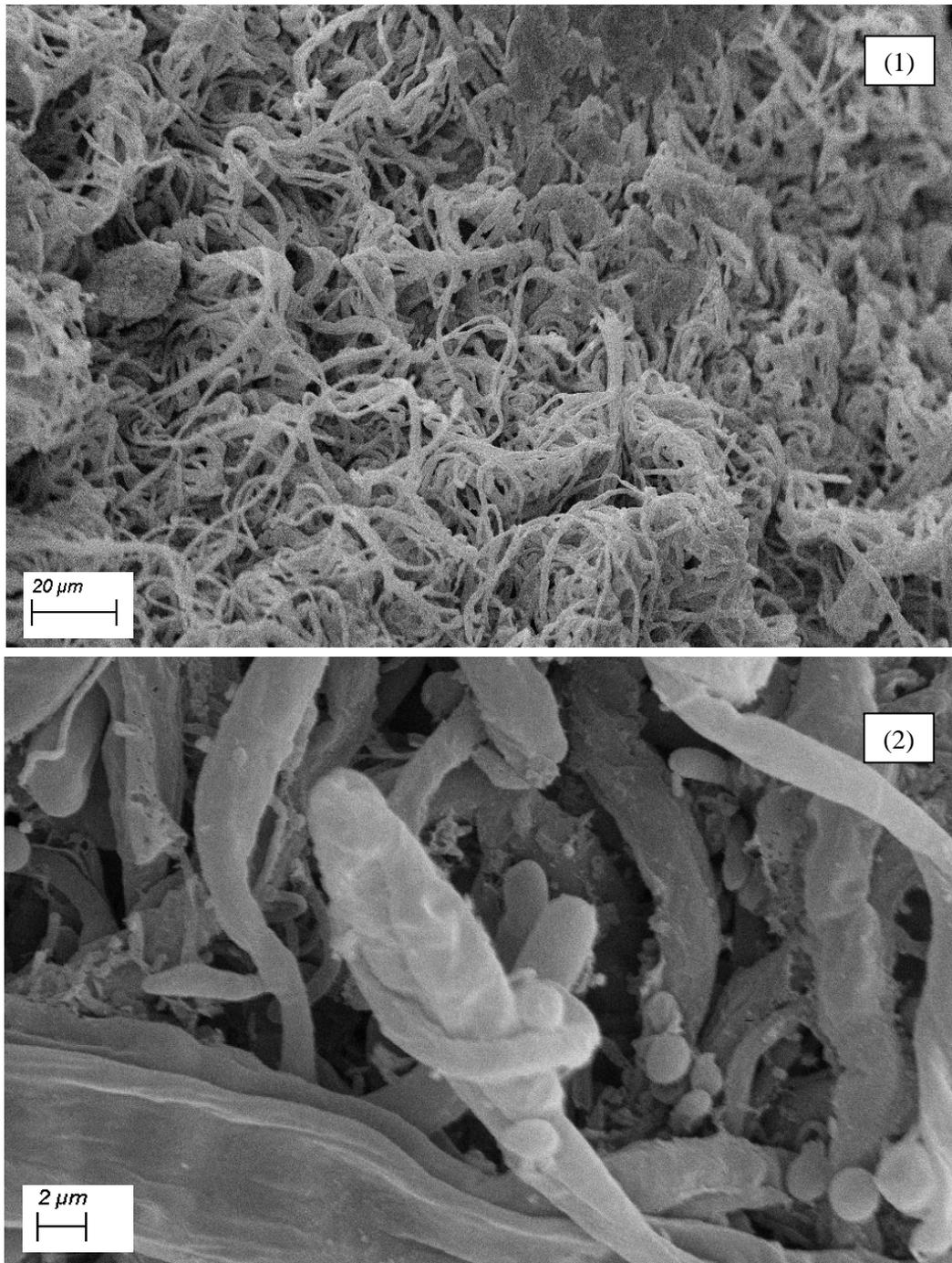
**Figura 15** – Electromicrografia de varredura mostrando a degradação, murcha e perda de turgência na hifa de *F. verticillioides* (16.1) e enrolamento do micélio do fungo F8 sobre o patógeno (16.2). Barra de escala: 10  $\mu\text{m}$ .



É possível evidenciar um crescimento micelial aéreo abundante e um tipo de enrolamento das hifas de *Trichoderma* sp sob o micélio de *F. verticillioides* (FIGURA 15.2). Muitos tem sido os estudos sobre o gênero *Trichoderma* como agente de biocontrole de doenças em plantas tanto *in vivo* como *in vitro* em todo o mundo (HOWELL et al., 2003; PAAVANEN et al., 2000). Sua importância é devida à multiplicidade de mecanismos de ação envolvidos na atividade de biocontrole tais como competição, micoparasitismo, produção de substâncias antimicrobianas e promoção de crescimento vegetal (CHET, 1987; VINALE et al., 2008; SARAVANAKUMAR et al., 2017). Além disso, estudos análogos têm conseguido evidenciar a colonização de *Trichoderma* sp em raízes de plantas e espaços intracelulares nas folhas para contribuir ao ataque de possíveis patógenos (ELAD, 1996). Resultados similares foram encontrados por Sobowale et al., (2007) onde isolados de *T. pseudokoningii* e *T. harzianum* foram altamente competidores pelos nutrientes e o espaço contra *F. verticillioides* em planta de milho. Além disso esses isolados demonstraram ter a capacidade endofítica em presença ao patógeno. Também foi evidenciado a redução da doença em até 86.6 % por Saravanakumar et al., (2017) quando foi aplicado *T. harzianum* em plantas de milho contra *F. graminearum*. Além disso também foi observado o favorecimento de colonização por microrganismos benéficos nas plantas que tinham sido tratadas. A atividade de micoparasitismo em *Trichoderma* sp está geralmente relacionada à produção de enzimas hidrolíticas tais como quitinases,  $\beta$  (1,3) glucanases e proteases que a sua vez podem promover a indução de resistência sistêmica à infecção de patógenos nas plantas (GOMES et al., 2015). Estudos com *T. virens* tem revelado que este fungo consegue crescer ao redor de alguns fungos fitopatogênicos (*Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum*, *Botrytis cinérea* e *Fusarium* sp) gerando estrangulamento e liberando substâncias tóxicas e enzimas hidrolíticas que favorecem a penetração do hospedeiro e o posterior uso de composto nutricionais para sua manutenção (POZO et al., 2014; KERROUM et al., 2015).

É possível evidenciar um crescimento exponencial do micélio aéreo do fungo F42 sob o patógeno, atrasando e inibindo o desenvolvimento celular e a germinação dos conídios (dados não quantificados neste ensaio), isto quando se compara com o controle (FIGURA 16.1). Alterações morfológicas do patógeno não foram encontradas neste tratamento. Além disso, foi observado um tipo de estrangulamento nas hifas de *F. verticillioides* por causa deste fungo na base do conidióforo (FIGURA 16.2).

**Figura 16** – Electromicrografia de varredura panorâmica do fungo F42 (*Phomopsis* sp) inibindo o crescimento do patógeno (1) com barra de escala: 20  $\mu\text{m}$ , e o estrangulamento de um conídio maduro pelo antagonista (2) com barra de escala: 20  $\mu\text{m}$ .



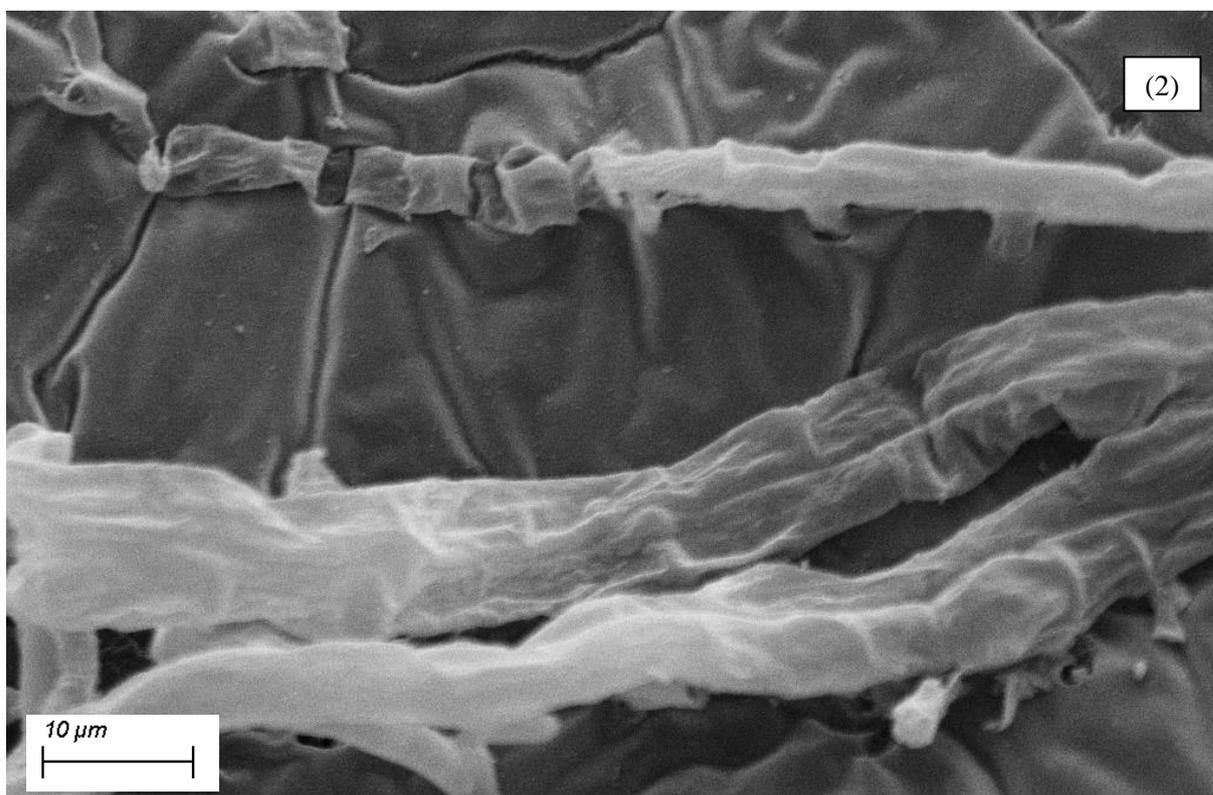
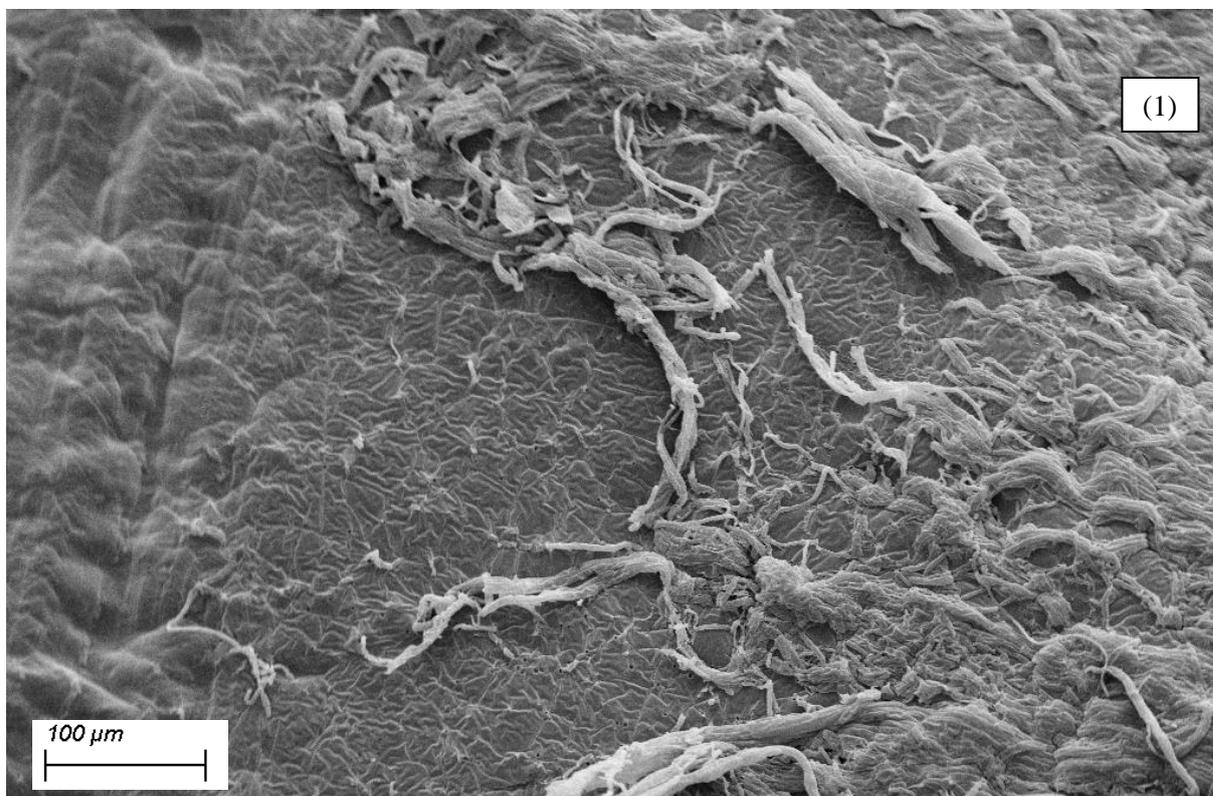
Foi realizada a caracterização morfológica deste fungo (dados não inclusos) no laboratório de Micologia do departamento de fitopatologia da UFLA. Este isolado foi identificado como *Phomopsis* sp. A identificação filogenética ainda está sendo realizada.

Este microrganismo já tem sido reportado em diversos trabalhos como fitopatogênico, causando doença principalmente em cultivos de pepino (*Phomopsis* sp), amaranto (*Phomopsis amaranthicola*) e em vinhedos (*Phomopsis viticola*) (SUNDHEIM et al., 1977; ROSSKOPF et al., 2000; PASSERA et al., 2017). No entanto algumas espécies de *Phomopsis*, tais como *P. emicis* (SHIVAS & SCOTT, 1993), *P. convolvulus* (ORMENONUNEZ, 1988) tem sido estudada por ter capacidade micoherbicida a uma variedade distinta de hospedeiros e alguns podem ter comportamento endofítico (ASH et al., 2010).

Na electromicrografia panorâmica do tratamento de F46 (FIGURA 17.1), ficou evidente a produção de metabolitos secundários ou antibióticos que inibiram o crescimento do patógeno quando este entrou em contato com esta substância. As estruturas miceliares são degradadas e alteradas, os danos sobre as camadas de conídios são visíveis interferindo portanto no ciclo de vida do patógeno (FIGURA 17.1). O espaçamento que gerou a produção do composto entre o antagonista e o patógeno é amplo, exibindo um tipo de retração do micélio antes de chegar à substancia. Na Figura 17.2 é possível ver o fracionamento completo das hifas de *F. verticillioides* gerando pequenas porções em camadas por causa do composto produzido pelo fungo antagonista. Também é observada a perda de turgência nas hifas do patógeno e alterações morfológicas nas mesmas.

Foi realizada a caracterização morfológica deste fungo (dados não inclusos) no laboratório de Micologia do departamento de fitopatologia da UFLA. Este isolado foi identificado como *Epicoccum* sp. A identificação filogenética ainda está sendo realizada.

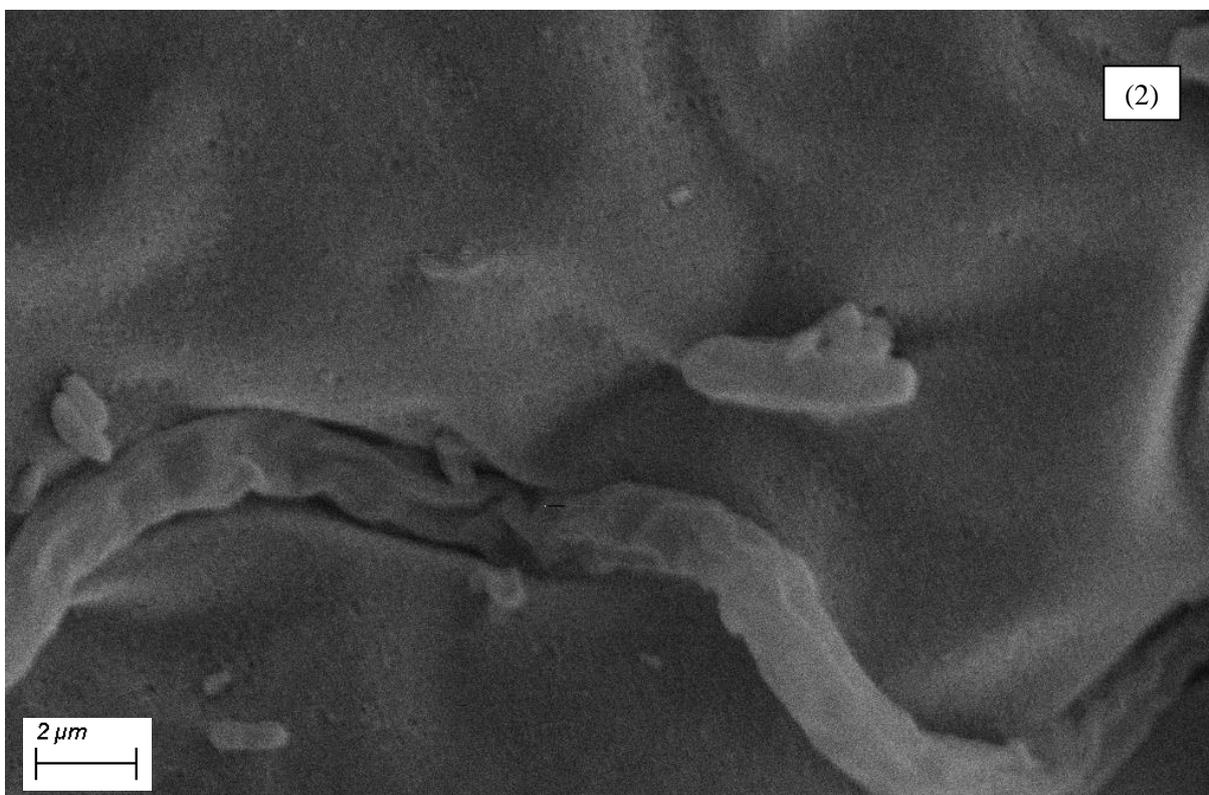
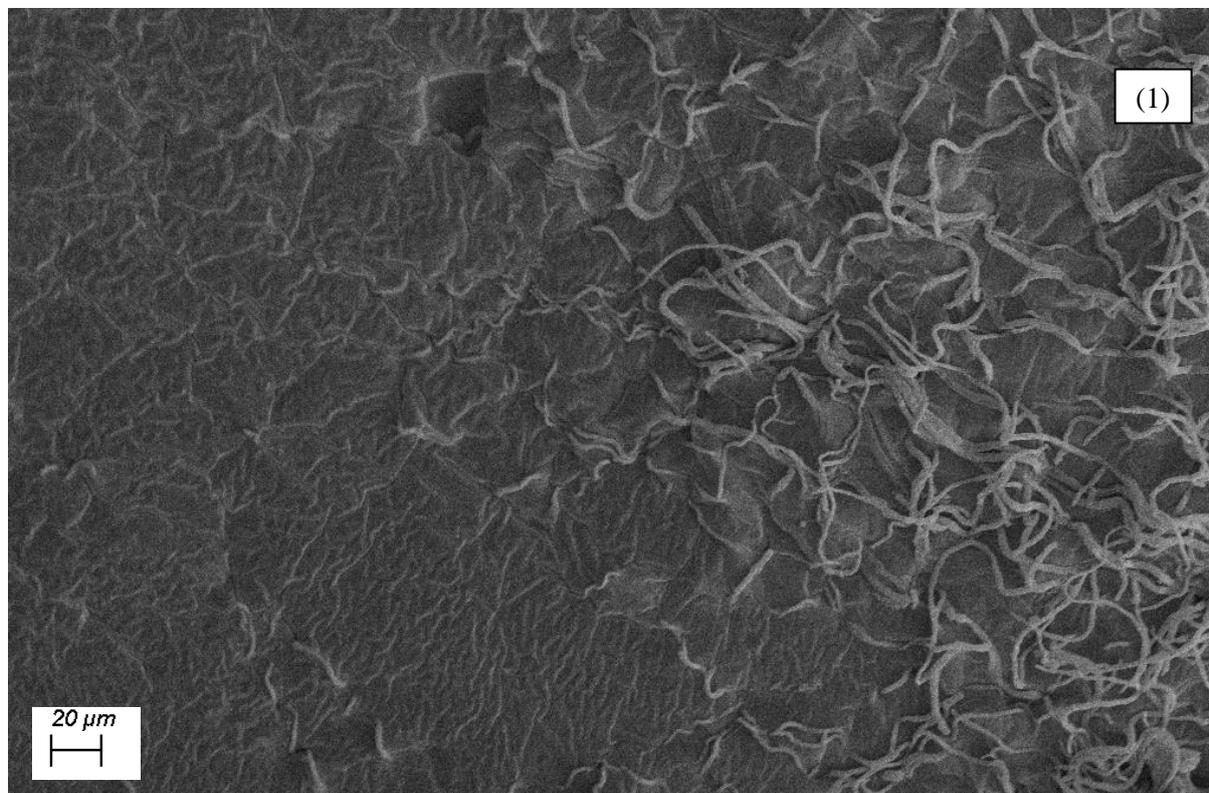
**Figura 17** – Electromicrografia de varredura panorâmica do fungo F46 (*Epicoccum* sp) inibindo o crescimento do patógeno (1) com barra de escala: 100  $\mu$ m, e o fracionamento completo das hifas de *F. verticillioides* com lises e morte celular (2) com barra de escala: 10  $\mu$ m.



O fungo F46 foi o único que conseguiu produzir halo de inibição contra *F. verticillioides*. Este fungo tem sido reportado como endofítico e controlador biológico a diversas doenças nas plantas (PIECKENSTAIN et al., 2001; MARTINI et al., 2009; HASHEM et al., 2004; LARENA et al., 2005). Alterações completas foram encontradas nas estruturas miceliares do patógeno e redução de esporulação na área de contato com o metabolito do antagonista. Uma grande zona de inibição foi encontrada neste tratamento resultados semelhantes foram encontrados por Lahlali et al., (2010). Resultados similares foram achados por Luongo et al., (2005) onde *E. nigrum* foi altamente eficiente inibindo quase 100% a esporulação de *F. verticillioides*, *F. graminearum* e *F. culmorum* em comparação a outros antagonistas avaliados. Diferentes compostos antibióticos produzidos por *E. nigrum* tem sido identificado tais como epicorazinas A B (BAUTE et al., 1978), epirodinas A B (IKAWA et al., 1978), flavipinas (BAMFORD et al., 1978) epicocarinas e epipiridona (WANGUN et al., 2007) entre outros. No entanto a flavipina é a molécula que comumente tem sido associada ao controle de doenças fitossanitárias fúngicas e bacterianas. Uma das características mais importantes e particulares deste fungo endofítico é a preferência pelo ambiente do filoplano e capacidade de aumentar a biomassa radicular permitindo que microrganismos antagônicos a patógenos em plantas possam-se estabelecer (DE LIMA FAVARO et al., 2012).

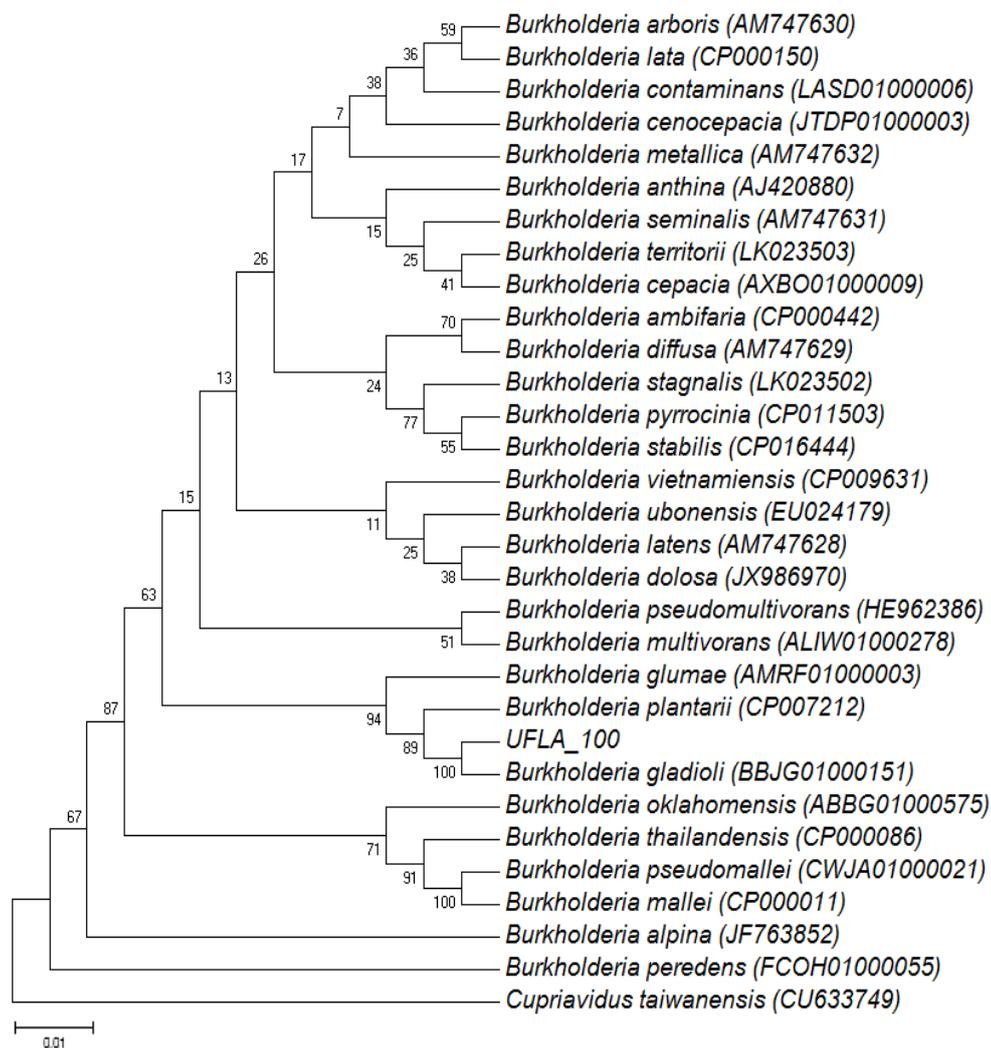
Foi observado a redução do crescimento micelial (FIGURA 18.1) de *F. verticillioides* quando este entrou em contato com o metabolito produzido pela bactéria B100. Além disso é observado retração, separação e alterações morfológicas nas hifas do patógeno (FIGURA 18.1). Pode-se observar perda de turgência nas pontas das hifas de *F. verticillioides*, enrolamento e malformações, também se encontraram células bacterianas com tamanho de a 3-5µm atacando diretamente as hifas do patógeno e os conídios (FIGURA 18.2).

**Figura 18** – Electromicrografia de varredura panorâmica da bactéria B100 (*Burkholderia gladioli*) gerando diminuição do crescimento micelial, retração e separação de *F. verticillioides* (1), com barra de escala: 20  $\mu\text{m}$ . Em close alterações morfológicas do patógeno e presença de células bacterianas atacando aos conídios e hifas (2), com barra de escala: 2  $\mu\text{m}$ .



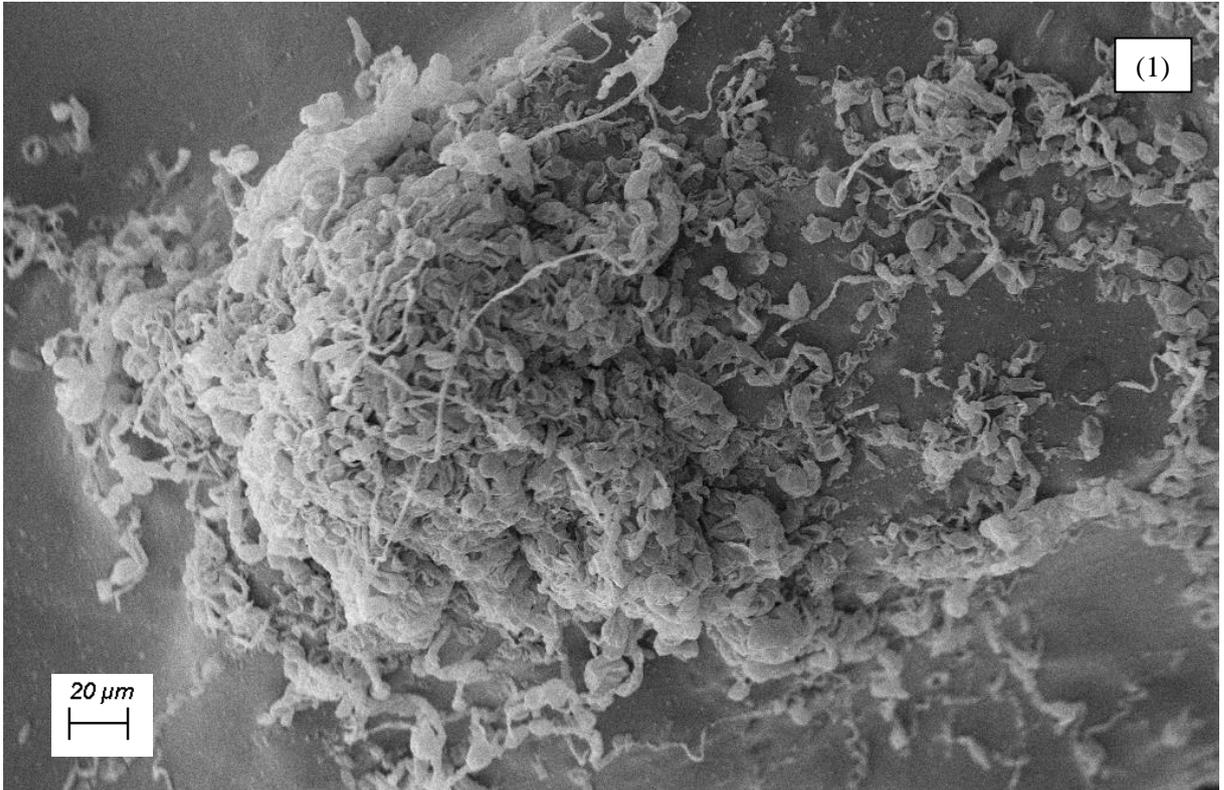
Na árvore filogenética gerada para a bactéria B100 é possível evidenciar que está se agrupada no clado da espécie *Burkholderia gladioli* com 100% de similaridade (FIGURA 19). Esta bactéria conseguiu produzir um halo de inibição contra *F. verticillioides* o qual foi confirmado também na electromicrografia de varredura (FIGURA 18.1). Poucos tem sido os estudos realizados com este gênero, já que seu nicho ecológico ainda não é claro (PIRONE et al., 2005). Existem alguns relatos descrevendo-a como bactéria patogênica em diferentes plantas tais como o milho e algumas orquídeas (GIJÓN et al., 2011) e causando problemas respiratório nos humanos (SEGONDS et al., 2009). No entanto, estudos de bioprospecção de moléculas tem sido desenvolvido para tentar descrever o papel que as moléculas produzidas por esta bactéria desempenham no biocontrole de doenças (LIN et al., 2011; MAGALHÃES et al., 2017). Resultados obtidos por Bevivino et al., (2005) revelam que altos níveis de incidência de *F. verticillioides* em milho estão acompanhados de altos índices de colonização de *Burkholderia cenocepacia* nas raízes, como também variabilidade genética entre os isolados. Além disso, a maioria desses isolados foram capazes de inibir o crescimento do patógeno *in vitro*. As principais moléculas produzidas por esta bactéria são as enzimas hidrolíticas extracelulares (quitinases e proteases) e compostos voláteis tais como 1-methyl-4-(1-methylethenyl) -cyclohexene e que tem efeito comprovado de inibição de crescimento de fungos fitopatogênicos como *F. oxysporum*, *Rhizoctonia solani* e *Alternaria alternata* (ELSHAFIE et al., 2012; MAHAMUNI et al., 2015).

**Figura 19** – Árvore filogenética construída por meio do método Neighbor-joining com base nas sequências do gene 16S rRNA mostrando as relações entre o isolado B100 e espécies do gênero *Burkholderia* filogeneticamente próximas. Os números nos braços são os valores de bootstrap obtidos em 1000 repetições (expressos em porcentagem). Apenas valores acima de 50% são mostrados. Barra representa 0,01 substituições por posição de nucleotídeo.



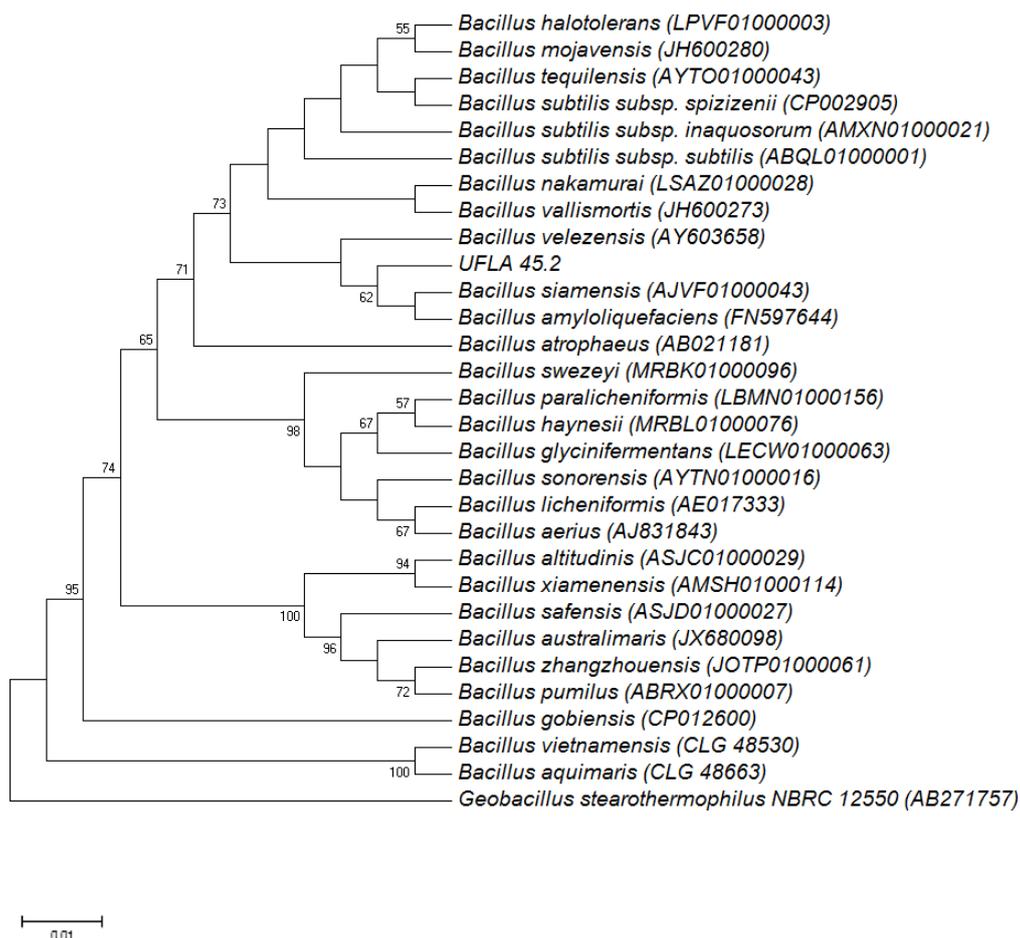
No tratamento com bactéria B45,2 é possível evidenciar um agrupamento de células bacterianas atacando massas de micélio do patógeno que foram separadas e empilhadas no ágar gerando malformações, lises e perda do material citoplasmático (FIGURA 20.1) que tem como consequência uma morte celular total. A trajetória das hifas de *F. verticillioides* no ágar foram modificadas quando entraram em contato com o metabolito produzido pela bactéria. Na Figura 20.2 se observa a células bacterianas de aproximadamente 3-5  $\mu\text{m}$  acima das massas de microconídios e hifas, possivelmente usando-os como alimento e degradando por completo as estruturas do fungo.

**Figura 20** – Electromicrografia de varredura panorâmica do tratamento B45.2 (*Bacillus amyloliquefaciens*) com agrupamento de células bacterianas atacando às massas de micélio do patógeno, as quais foram separadas e empilhadas no ágar (1), com barra de escala: 20  $\mu\text{m}$ . Detalhe das alterações morfológicas do patógeno e presença de células bacterianas atacando os conídios (2), com barra de escala: 2  $\mu\text{m}$ .



A identificação molecular indica que a bactéria B45,2 faz parte do clado de *Bacillus velezensis* e *Bacillus amyloliquefaciens* com 63% de similaridade (FIGURA 21). No entanto espécies do gênero *B. amyloliquefaciens* estão sendo reclassificados como *Bacillus velezensis* (DUNLAP et al., 2016). Esta bactéria produz um halo de inibição gerando morte celular das hifas de *Fusarium verticillioides* (FIGURA 20.2). Resultados similares foram encontrados por SHI et al., (2014) onde compostos antibióticos produzidos por *B. amyloliquefaciens* desempenharam um papel importante de inibição de crescimento de *F. graminearum* além da redução de micotoxinas (Deoxynivalenol) produzidas por este patógeno. As moléculas identificadas foram os lipopeptídeos principalmente as iturinas e fengicinas. Outros ensaios efetuados com esta bactéria conseguiram constatar a redução de fumonisinas e incidência de *F. verticillioides* em espigas de milho quando foi aplicado *B. amyloliquefaciens* (PEREIRA et al., 2007). A produção de enzimas líticas tais como as quitinases tem sido relatada como outro mecanismo de biocontrole exercido por *B. amyloliquefaciens* gerando degradação na parede do micélio de *F. verticillioides* (NIHORIMBERE et al., 2012). No entanto além da produção destes compostos antibióticos nesse ensaio, foi confirmada a produção de moléculas voláteis tais como as heptanonas, gerando inibição, degradação nas estruturas miceliares e a redução de micotoxinas em diferentes espécies de *Fusarium* (LEE et al., 2017).

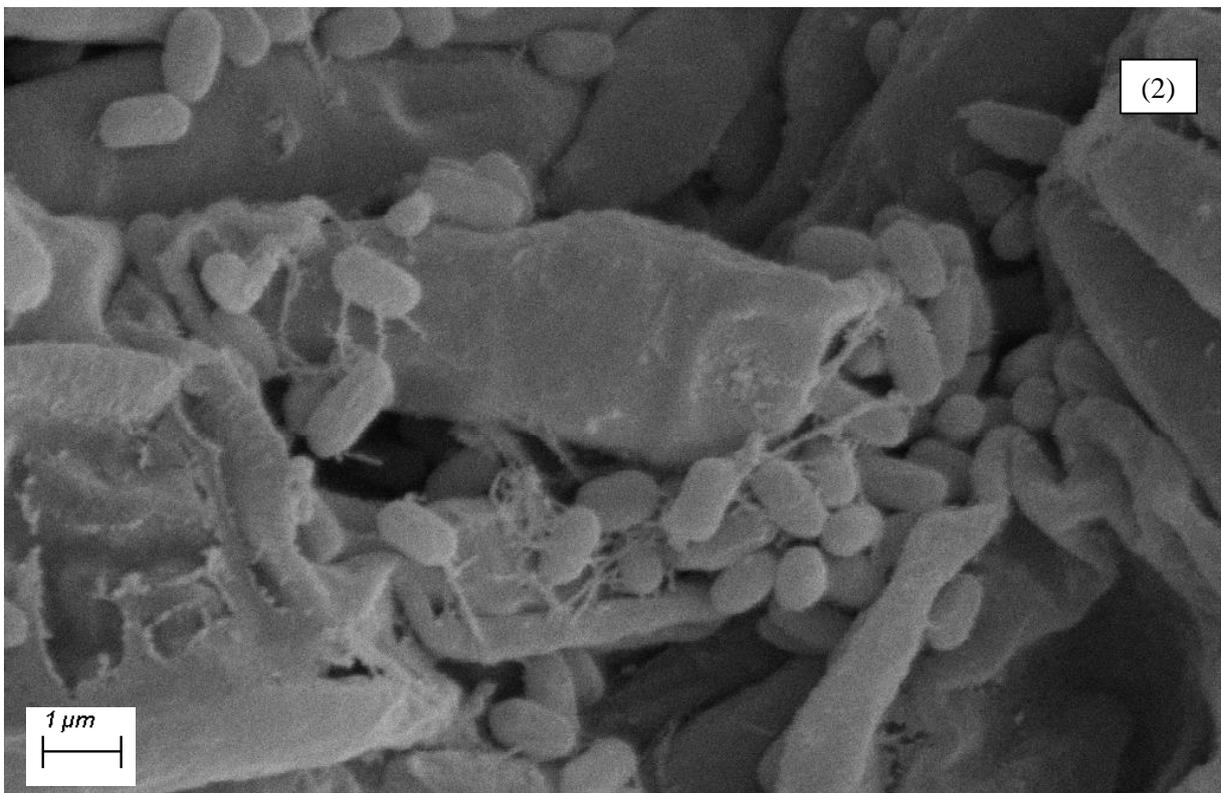
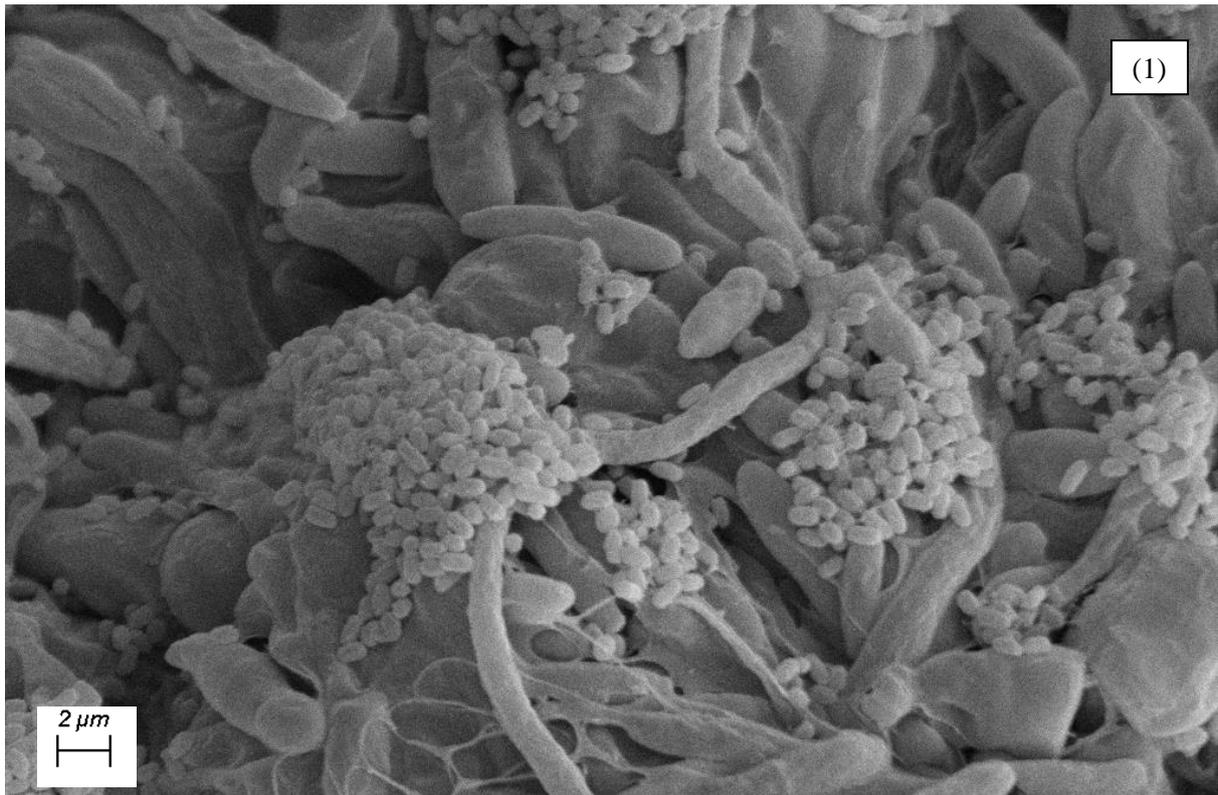
**Figura 21** – Árvore filogenética construída por meio do método Neighbor-joining com base nas seqüências do gene 16S rRNA mostrando as relações entre o isolado B45,2 e espécies do gênero *Bacillus* filogeneticamente próximas. Os números nos braços são os valores bootstrap obtidos em 1000 repetições (expressos em porcentagem). Apenas valores acima de 50% são mostrados. Barra representa 0,01 substituições por posição de nucleotídeo.



No tratamento com a bactéria BIOUFLA 2 (*Bacillus subtilis*) é possível ver um aglomerado de células atacando em camada a massas de conídios do patógeno, degradando e gerando neles malformações (FIGURA 22.1). Foram observadas alterações e rugosidades nas hifas e conídios do patógeno (FIGURA 22.1) quando entraram em contato com a substância produzida pela bactéria. Na Figura 22.2 é possível evidenciar células bacterianas com formato de bacilo com tamanho aproximado de 2-4  $\mu\text{m}$  gerando ligações entre elas, recobrando às camadas de conídios e hifas do patógeno. Além disso, é possível observar uma hifa de *F. verticillioides* com um tipo de rasgadura na parede celular e por tanto perda do material citoplasmático (FIGURA 23.2). Este tipo de recrutamento e formações de teias só existem

neste tratamento quando se compara com as outras bactérias obtidas neste ensaio e o controle. O antagonismo direto exercido por *B. subtilis* foi relatado por Leelasuphakul et al., (2008), onde 23 estirpes diferentes de *Bacillus* spp. isoladas no solo mostraram inibição *in vitro*, mas só nove estirpes inibiram até 80% a doença. A síntese de substâncias antimicrobianas e a produção de compostos voláteis são os mecanismos de ação envolvidos no controle da doença por *B. subtilis*. Substâncias inibitórias relatadas pelo mesmo autor foram encontradas como: iturina A, amicoumacina A, surfactina e fengicina. Estas famílias de peptídeos são compostas de sete ou dez  $\alpha$ -aminoácidos ligados a um único  $\beta$ -amino (iturinas) ou  $\beta$ -hidroxi (surfactinas e fengicinas) ácido graxo e podem ter atividade antifúngica e antibacteriana intensa quando estão juntas ou separadas (MAGET-DANA et al., 1992). Palazzini et al., (2016) descreveram que isolados de *B. subtilis* exercem controle de *F. graminearum*, identificando o mecanismo de ação usado principalmente pelo agente antagônico como antibiose, embora a produção das Substâncias não foram relatadas, mas possivelmente foram os lipopeptídeos. O *Bacillus subtilis* tem sido identificado como um microrganismo altamente promissor no controle de organismos fitopatogênicos, devido à sua alta capacidade de tolerar mudanças bruscas de temperaturas e pela produção de estruturas de resistências (VIERA et al., 2009). As flutuações de populações do gênero *Bacillus* e as mudanças das comunidades microbianas estão correlacionadas com as estações do ano, ao ciclo fenológico da planta e as aplicações de substâncias químicas e biológicas para o controle de doenças (JACQUES et al., 1995).

**Figura 22** – Electromicrografia de varredura panorâmica do tratamento BIOUFLA 2 (*Bacillus subtilis*) mostrando um aglomerado de células bacterianas que atacam às massas de micélio e conídios do patógeno (1), com barra de escala: 2  $\mu$ m. Em detalhe alterações morfológicas miceliares do patógeno e presença de células bacterianas formando teias e conexões entre elas (2), com barra de escala: 1  $\mu$ m.



## 6. CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos nas condições dos ensaios realizados em campo e laboratório e possível constatar que:

- A pulverização de diferentes combinações de fungicidas químicos e biológicos pode alterar a composição de microrganismos presentes na filosfera em plantas de milho.
- A aplicação em dois períodos fenológicos distintos de *Bacillus subtilis*, favoreceu o aparecimento de microrganismos antagonísticos competidores contra *F. verticillioides*.
- *B. subtilis* demonstrou ter capacidade antimicrobiana pela produção de metabolitos secundários e exercer competição contra o patógeno *F. verticillioides in vitro*.
- A pulverização do fungicida duas vezes nas plantas de milho gerou redução no aparecimento de possíveis microrganismos nativos antagonísticos a *Fusarium verticillioides*.
- As aplicações em combinação do fungicida químico e *B. subtilis* e de forma inversa geraram respostas similares de aumento na composição nativa microbiana antagonística em plantas de milho contra *Fusarium verticillioides*.
- A confrontação direta dos microrganismos isolados da filosfera de plantas de milho e testados em sementes de milho canjica permitiram obter novos antagonistas promissores contra *F. verticillioides*.
- Alterações morfológicas foram observadas nas estruturas miceliares de *F. verticillioides* quando foi colocado em placas de Petri com os possíveis antagonistas e *B. subtilis*.

- Aumentos nas composições microbianas gerados por *B. subtilis* nas plantas de milho podem ser explicados pela produção de substâncias microbianas interespecífica em quorum sensing.
- Diferentes mecanismos de ação (competição, micoparasitismo e antibiotes) foram encontrados nos antagonistas quando foram testados de forma direta contra *F. verticillioides*.
- *F. verticillioides* conseguiu usar todas as fontes de nutrientes que estão presentes no milho semelhante ao antagonista *B. subtilis* e a bactéria *B. gladioli*, como também os fungos *Trichoderma* sp., *E. nigrum*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, Peter B. The potential of mycoparasites for biological control of plant diseases. **Annual review of phytopathology**, v. 28, n. 1, p. 59-72, 1990.
- AGROFIT. Sistema de agrotóxicos fitossanitários. Disponível em: <agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\_cons/principal\_agrofit\_cons>. Acesso em: 11 Jan do 2013.
- AHANGER, Mohammad Abass et al. Drought tolerance: role of organic osmolytes, growth regulators, and mineral nutrients. In: **Physiological mechanisms and adaptation strategies in plants under changing environment**. Springer New York, 2014. p. 25-55.
- AKTAR, Wasim; SENGUPTA, Dwaipayan; CHOWDHURY, Ashim. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. **Interdisciplinary toxicology**, v. 2, n. 1, p. 1-12, 2009.
- ASH, Gavin J. et al. Genetic characterization of a novel *Phomopsis* sp., a putative biocontrol agent for *Carthamus lanatus*. **Mycologia**, v. 102, n. 1, p. 54-61, 2010.
- BACON, C. W.; HINTON, D. M. Symptomless endophytic colonization of maize by *Fusarium moniliforme*. **Canadian Journal of Botany**, v. 74, n. 8, p. 1195-1202, 1996.
- BACON, Charles W. et al. Biological control of *Fusarium moniliforme* in maize. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, n. Suppl 2, p. 325, 2001.
- BAKER, K. F., and COOK, R. J. 1974. Biological Control of Plant Pathogens. **Am. Phytopathol. Soc.**, St. Paul. MN.433 pp.
- BAMFORD, P. C.; NORRIS, G. L. F.; WARD, G. Flavipin production by *Epicoccum* spp. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 44, n. 3, p. 354-356, 1961.
- BATSON, W. et al. Evaluation of biological seed treatments for control of the seedling disease complex of cotton. **Biol. and Cult. Tests**, v. 15, p. 31-32, 2000.
- BAUTE, Marie-Antoinette et al. New antibiotics from the fungus *Epicoccum nigrum*. **The journal of Antibiotics**, v. 31, n. 11, p. 1099-1101, 1978.
- BENEDUZI, Anelise; AMBROSINI, Adriana; PASSAGLIA, Luciana MP. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents. **Genetics and molecular biology**, v. 35, n. 4, p. 1044-1051, 2012.
- BENHAMOU, Nicole et al. Induction of defense-related ultrastructural modifications in pea root tissues inoculated with endophytic bacteria. **Plant physiology**, v. 112, n. 3, p. 919-929, 1996.
- BEVIVINO, Annamaria et al. Effect of *Fusarium verticillioides* on maize-root-associated *Burkholderia cenocepacia* populations. **Research in microbiology**, v. 156, n. 10, p. 974-983, 2005.

- BOLSONI-SILVA, Alessandra Turini; SILVEIRA, Fabiane Ferraz; RIBEIRO, Denize Campos. Avaliação dos efeitos de uma intervenção com mães/cuidadoras: contribuições do treinamento em habilidades sociais. **Contextos Clínicos**, v. 1, n. 1, p. 19-27, 2008.
- BULL, C. T. et al. Syringomycin E produced by biological control agents controls green mold on lemons. **Biological Control**, v. 12, n. 2, p. 89-95, 1998.
- CARVALHO, Rosilane Aparecida de et al. Incidence of toxigenic fungi and aflatoxins in rice. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n. 4, p. 946-952, 2010.
- CASA, Ricardo T.; REIS, Erlei M.; ZAMBOLIM, Laércio. Doenças do milho causadas por fungos do gênero *Stenocarpella*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 5, p. 427-439, 2006.
- CASTRO DEL ANGEL, EPIFANIO. CONTROL DE *Fusarium verticillioides* EN GENOTIPOS DE MAÍZ CON ESPECIES DE *Trichoderma* BAJO CONDICIONES DE CAMPO. 2013.
- CAVAGLIERI, L. et al. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides* in vitro and at the maize root level. **Research in Microbiology**, v. 156, n. 5-6, p. 748-754, 2005.
- CAVAGLIERI, Lilia; PASSONE, A.; ETCHEVERRY, Miriam. *Screening* procedures for selecting rhizobacteria with biocontrol effects upon *Fusarium verticillioides* growth and fumonisin B1 production. **Research in Microbiology**, v. 155, n. 9, p. 747-754, 2004a.
- CAVAGLIERI, L. R.; PASSONE, A.; ETCHEVERRY, M. G. Correlation between *screening* procedures to select root endophytes for biological control of *Fusarium verticillioides* in *Zea mays* L. **Biological control**, v. 31, n. 3, p. 259-267, 2004b.
- CHANDRA NAYAKA, Siddaiah et al. Control of *Fusarium verticillioides*, cause of ear rot of maize, by *Pseudomonas fluorescens*. **Pest management science**, v. 65, n. 7, p. 769-775, 2009.
- CHATTERJEE, Subhankar et al. Interactions among filamentous fungi *Aspergillus niger*, *Fusarium verticillioides* and *Clonostachys rosea*: fungal biomass, diversity of secreted metabolites and fumonisin production. **BMC microbiology**, v. 16, n. 1, p. 83, 2016.
- CHET, Ilan. *Trichoderma*: application, mode of action, and potential as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi. **Innovative approaches to plant disease control**, p. 137-160, 1987.
- CHU, Fun S.; LI, Guo Y. Simultaneous occurrence of fumonisin B1 and other mycotoxins in moldy corn collected from the People's Republic of China in regions with high incidences of esophageal cancer. **Applied and environmental microbiology**, v. 60, n. 3, p. 847-852, 1994.
- CORREA, Olga S. et al. *Bacillus amyloliquefaciens* BNM122, a potential microbial biocontrol agent applied on soybean seeds, causes a minor impact on rhizosphere and soil microbial communities. **Applied Soil Ecology**, v. 41, n. 2, p. 185-194, 2009.

COSTA, Francisco Gheler; ZUCCHI, Tiago Domingues; MELO, Itamar Soares de. Biological control of phytopathogenic fungi by endophytic actinomycetes isolated from maize (*Zea mays* L.). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, n. 6, p. 948-955, 2013.

COSTA, R. V. et al. **Sistemas de produção**. 5. ed. Sete Lagoas: EMBRAPA Milho e Sorgo, 2009. Disponível em: <<http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/publonline.php>>. Acesso em: 12 jan. 2016.

COVARELLI, L., BECCARI, G., SALVI, S., 2011. Infection by mycotoxigenic fungal species and mycotoxin contamination of maize grain in Umbria, central Italy. **Food and Chemical Toxicology** 49, 2365e2369.

DA SILVA, Rosa Elvira Areias. Avaliação da atividade antimicrobiana de fungos e actinobactérias endofíticos isolados de *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist (rabo-de-raposa). 2007.

DAWAR, Shahnaz; SATTAR, A.; ZAKI, M. J. Seed dressing with biocontrol agents and nematicides for the control of root knot nematode on sunflower and okra. **Pak J Bot**, v. 40, n. 6, p. 2683-2691, 2008.

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

DE JENSEN, C. Estevez; PERCICH, J. A.; GRAHAM, P. H. Integrated management strategies of bean root rot with *Bacillus subtilis* and *Rhizobium* in Minnesota. **Field Crops Research**, v. 74, n. 2, p. 107-115, 2002.

DE LIMA FAVARO, Leia Cecilia; DE SOUZA SEBASTIANES, Fernanda Luiza; ARAÚJO, Wellington Luiz. *Epicoccum nigrum* P16, a sugarcane endophyte, produces antifungal compounds and induces root growth. **PLoS One**, v. 7, n. 6, p. e36826, 2012.

DEISING, Holger B.; REIMANN, Sven; PASCHOLATI, Sérgio F. Mechanisms and significance of fungicide resistance. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 286-295, 2008.

DEY, R. et al. Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria. **Microbiological research**, v. 159, n. 4, p. 371-394, 2004.

DONG, Zhongmin et al. A nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems (a new role for the apoplast). **Plant Physiology**, v. 105, n. 4, p. 1139-1147, 1994.

DOUMBOU, Cyr Lézin et al. Actinomycetes, promising tools to control plant diseases and to promote plant growth. **Phytoprotection**, v. 82, n. 3, p. 85-102, 2001.

DROBY, S.; CHALUTZ, E. Mode of action of biocontrol agents of postharvest diseases. **Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables—theory and practice**. CRC Press, Boca Raton, p. 63-75, 1994.

DU, Nanshan et al. Isolation of a potential biocontrol agent Paeni*Bacillus* polymyxa NSY50 from vinegar waste compost and its induction of host defense responses against Fusarium wilt of cucumber. **Microbiological research**, v. 202, p. 1-10, 2017.

DUBEY, Sunil C.; SURESH, M.; SINGH, Birendra. Evaluation of Trichoderma species against Fusarium oxysporum f. sp. ciceris for integrated management of chickpea wilt. **Biological control**, v. 40, n. 1, p. 118-127, 2007.

DUNLAP, Christopher A., et al. *Bacillus velezensis* is not a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*; *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* and '*Bacillus oryzicola*' are later heterotypic synonyms of *Bacillus velezensis* based on phylogenomics. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, 2016, vol. 66, no 3, p. 1212-1217.

DUNLAP, Christopher A. et al. *Screening* of bacteria for antagonistic activity against phytopathogens of avocados. **Plant Gene**, v. 11, p. 17-22, 2017.

EHRlich, Kenneth C., et al. Aflatoxin biosynthesis cluster gene *cypA* is required for G aflatoxin formation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 11, p. 6518-6524, 2004.

EL GHAOUTH, Ahmed et al. Biological control of postharvest diseases of citrus fruits. **Biological control of crop diseases**. Marcel Dekker, New York, p. 289-312, 2002.

EL ZAHAR HAICHAR, Feth et al. Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. **The ISME journal**, v. 2, n. 12, p. 1221, 2008.

ELAD, Yigal. Mechanisms involved in the biological control of *Botrytis cinerea* incited diseases. **European Journal of Plant Pathology**, v. 102, n. 8, p. 719-732, 1996.

ELSHAFIE, Hazem S. et al. In vitro antifungal activity of *Burkholderia gladioli* pv. *agaricicola* against some phytopathogenic fungi. **International journal of molecular sciences**, v. 13, n. 12, p. 16291-16302, 2012.

ETHUR, Luciana Zago et al. Micobiota parasitária de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* isolada de solos da fronteira oeste do Rio Grande do Sul. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, n. 1, p. 62-67, 2014.

FANCELLI, Antônio Luiz; DOURADO NETO, Durval. **Produção de milho. Guaíba: Agropecuária**, p. 360, 2000.

FANDOHAN, P. et al. Natural occurrence of *Fusarium* and subsequent fumonisin contamination in preharvest and stored maize in Benin, West Africa. **International Journal of Food Microbiology**, v. 99, n. 2, p. 173-183, 2005.

FANTIN, G. M.; DUARTE, A. P. **Manejo de doenças na cultura do milho safrinha**. Campinas: Instituto Agrônomo, 99 p., 2009.

FERRIGO, D. et al. *Trichoderma harzianum* T22 induces in maize systemic resistance against *Fusarium verticillioides*. **Journal of Plant Pathology**, v. 96, n. 1, p. 133-142, 2014.

FELSENSTEIN, Joseph. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. **Journal of molecular evolution**, v. 17, n. 6, p. 368-376, 1981.

FIGUEROA-LÓPEZ, Alejandro Miguel et al. A high-throughput *screening* assay to identify bacterial antagonists against *Fusarium verticillioides*. **Journal of basic microbiology**, v. 54, n. S1, 2014.

FIGUEROA-LÓPEZ, Alejandro Miguel et al. Rhizospheric bacteria of maize with potential for biocontrol of *Fusarium verticillioides*. **SpringerPlus**, v. 5, n. 1, p. 330, 2016.

FILION, M. et al. Molecular profiling of rhizosphere microbial communities associated with healthy and diseased black spruce (*Picea mariana*) seedlings grown in a nursery. **Applied and environmental microbiology**, v. 70, n. 6, p. 3541-3551, 2004.

FITCH, Walter M. Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. **Systematic Biology**, v. 20, n. 4, p. 406-416, 1971.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION 2015. Disponível em:

<<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>> Acessado em: 28/12/2016

FORBES, Betty A. et al. Diagnostic microbiology. **Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 11-14, 2002.

- FREIRE, F. das C. O.; VIEIRA, I. G. P.; GUEDES, M. I. F.; MENDES, F. N. P. Micotoxinas: Importância na Alimentação e na Saúde Humana e Animal. **Documentos 110**, Embrapa Agroindústria Tropical (CNPAT), Fortaleza-CE, 48p., out. 2007.
- GADERER, Romana et al. Sm2, a paralog of the *Trichoderma cerato-platanin* elicitor Sm1, is also highly important for plant protection conferred by the fungal-root interaction of *Trichoderma* with maize. **BMC microbiology**, v. 15, n. 1, p. 2, 2015.
- GEANGE, Shane W. et al. A unified analysis of niche overlap incorporating data of different types. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 2, n. 2, p. 175-184, 2011.
- GELDERBLUM, W. C. A. et al. Interaction of fumonisin B 1 and aflatoxin B 1 in a short-term carcinogenesis model in rat liver. **Toxicology**, v. 171, n. 2, p. 161-173, 2002.
- GELDERBLUM, W. C. et al. Fumonisin--novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. **Applied and environmental microbiology**, v. 54, n. 7, p. 1806-1811, 1988.
- GHINI, R.; BETTIOL, W. Controle de doenças radiculares. In: MICHERREFF, S.J.; ANDRARE, D. E. T.; MENEZES, M. **Ecologia e manejo de doenças radiculares em solos tropicais**. Recife-PE, 398 p., 2005.
- GIJON-HERNANDEZ, Adriana et al. Leaf stripe and stem rot caused by *Burkholderia gladioli*, a new maize disease in Mexico. **Journal of Phytopathology**, v. 159, n. 5, p. 377-381, 2011.
- GODOY, Cláudia Vieira; HENNING, Ademir Assis. Tratamento de semente e aplicação foliar de fungicidas para o controle da ferrugem-da-soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 10, p. 1297-1302, 2008.
- GOMES, Eriston Vieira et al. The Cerato-Platanin protein Epl-1 from *Trichoderma harzianum* is involved in mycoparasitism, plant resistance induction and self cell wall protection. **Scientific reports**, v. 5, p. 17998, 2015.
- GORYACHEVA, Irina Yu et al. Immunochemical methods for rapid mycotoxin detection: Evolution from single to multiple analyte *screening*: A review. **Food additives and contaminants**, v. 24, n. 10, p. 1169-1183, 2007.
- GOULART, Augusto César Pereira. **Controle do oídio e da ferrugem da folha pelo tratamento de sementes de trigo com fungicidas**. Embrapa Agropecuária Oeste, 1999.

- HAIDAR, Rana et al. *Screening* and modes of action of antagonistic bacteria to control the fungal pathogen *Phaeomoniella chlamydospora* involved in grapevine trunk diseases. **Microbiological research**, v. 192, p. 172-184, 2016.
- HALLMANN, J. et al. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 10, p. 895-914, 1997.
- HANDELSMAN, Jo; PARKE, Jennifer L. Mechanisms of biocontrol of soilborne plant pathogens. **Plant-microbe interactions (USA)**, 1989
- HASHEM, M.; ALI, Esam. *Epicoccum nigrum* as biocontrol agent of *Pythium* damping-off and root-rot of cotton seedlings. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 37, n. 4, p. 283-297, 2004.
- HEADRICK, J. M.; PATAKY, J. K. to Kernel Infection by *Fusarium moniliforme*. **Phytopathology**, v. 81, p. 268-274, 1991.
- HERNÁNDEZ-SALMERÓN, J. E. et al. Isolation and characterization of genetic variability in bacteria with  $\beta$ -hemolytic and antifungal activity isolated from the rhizosphere of *Medicago truncatula* plants. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 3, p. 4967-4975, 2014.
- HOWARD, Paul C., et al. Formation of N-(carboxymethyl) fumonisin B1, following the reaction of fumonisin B1 with reducing sugars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 9, p. 3546-3557, 1998.
- HOWELL, C. R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. **Plant disease**, v. 87, n. 1, p. 4-10, 2003.
- LAHLALI, Rachid; HIJRI, Mohamed. *Screening*, identification and evaluation of potential biocontrol fungal endophytes against *Rhizoctonia solani* AG3 on potato plants. **FEMS Microbiology Letters**, v. 311, n. 2, p. 152-159, 2010.
- IKAWA, Miyoshi et al. Epirodin, a polyene antibiotic from the mold *Epicoccum nigrum*. **The Journal of antibiotics**, v. 31, n. 2, p. 159-161, 1978.
- INBAR, Jacob; CHET, Ilan. A newly isolated lectin from the plant pathogenic fungus *Sclerotium rolfsii*: purification, characterization and role in mycoparasitism. **Microbiology**, v. 140, n. 3, p. 651-657, 1994.
- JACKMAN, S. C.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Survival, detection and containment of bacteria. **Microb. Releases**, v. 1, p. 125-154, 1992.

JACOBSEN, B. J.; ZIDACK, N. K.; LARSON, B. J. The role of *Bacillus*-based biological control agents in integrated pest management systems: plant diseases. **Phytopathology**, v. 94, n. 11, p. 1272-1275, 2004.

JACQUES, M.; KINKEL, Linda L.; MORRIS, Cindy E. Population sizes, immigration, and growth of epiphytic bacteria on leaves of different ages and positions of field-grown endive (*Cichorium endivia* var. *latifolia*). **Applied and environmental microbiology**, 1995, vol. 61, no 3, p. 899-906.

JULIATTI, Fernando Cezar et al. Efeito do genótipo de milho e da aplicação foliar de fungicidas na incidência de grãos ardidos. **Bioscience Journal**, v. 23, n. 2, 2007.

KEDERA, C. J.; LESLIE, J. F.; CLAFLIN, L. E. Systemic infection of corn by *Fusarium moniliforme*. **Phytopathology**, v. 82, p. 1138, 1992.

KERROUM, Fatima et al. Biological control of *Fusarium* crown and root rot disease of tomato by *Trichoderma harzianum* in the west of algeria. **Int J Sci Nat**, v. 6, p. 141-146, 2015.

KERRY, Brian R. Rhizosphere interactions and the exploitation of microbial agents for the biological control of plant-parasitic nematodes. **Annual review of phytopathology**, v. 38, n. 1, p. 423-441, 2000.

KIM, Dal-Soo; COOK, R. James; WELLER, David M. *Bacillus* sp. L324-92 for biological control of three root diseases of wheat grown with reduced tillage. **Phytopathology**, v. 87, n. 5, p. 551-558, 1997.

KOBAYASHI, Kazuo. *Bacillus subtilis* pellicle formation proceeds through genetically defined morphological changes. **Journal of bacteriology**, v. 189, n. 13, p. 4920-4931, 2007.

KOLTER, Roberto; GREENBERG, E. Peter. Microbial sciences: the superficial life of microbes. **Nature**, v. 441, n. 7091, p. 300, 2006.

KORSTEN, L. et al. Field sprays of *Bacillus subtilis* and fungicides for control of preharvest fruit diseases of avocado in South Africa. **Plant Disease**, v. 81, n. 5, p. 455-459, 1997.

KUMAR, Sudhir; STECHER, Glen; TAMURA, Koichiro. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular biology and evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870-1874, 2016.

- LA PENNA, M.; NESCI, A.; ETCHEVERRY, M. In vitro studies on the potential for biological control on *Aspergillus* section Flavi by *Kluyveromyces* spp. **Letters in applied microbiology**, v. 38, n. 4, p. 257-264, 2004.
- LARENA, I. et al. Biological control of postharvest brown rot (*Monilinia* spp.) of peaches by field applications of *Epicoccum nigrum*. **Biological Control**, v. 32, n. 2, p. 305-310, 2005.
- LANZA, Fabrício Eustáquio, et al. Prevalence of fumonisin-producing *Fusarium* species in Brazilian corn grains. *Crop Protection*, 2014, vol. 65, p. 232-237.
- LANZA, Fabrício Eustáquio et al. Aplicação foliar de fungicidas e incidência de grãos ardidos e fumonisinas totais em milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, n. 5, p. 638-646, 2016.
- LEELASUPHAKUL, Wichitra; HEMMANEE, Punpen; CHUENCHITT, Samerchai. Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 48, n. 1, p. 113-121, 2008.
- LEIFERT, Carlo et al. Antibiotic production and biocontrol activity by *Bacillus subtilis* CL27 and *Bacillus pumilus* CL45. **Journal of applied bacteriology**, v. 78, n. 2, p. 97-108, 1995.
- LESLIE, J. F., C. PEARSON, P. NELSON, and T. TOUSSOUN. 1990. *Fusarium* spp. from corn, sorghum, and soybean fields in the central and eastern United States. **Phytopathology** 80:343–350.
- LEYVA-MADRIGAL, Karla Y. et al. *Fusarium* species from the *Fusarium fujikuroi* species complex involved in mixed infections of maize in Northern Sinaloa, Mexico. **Journal of Phytopathology**, v. 163, n. 6, p. 486-497, 2015.
- LIN, Hsi-Hsun et al. *Burkholderia multivorans* acts as an antagonist against the growth of *Burkholderia pseudomallei* in soil. **Microbiology and immunology**, v. 55, n. 9, p. 616-624, 2011.
- LIU, Yan; WU, Felicia. Global burden of aflatoxin-induced hepatocellular carcinoma: a risk assessment. **Environmental health perspectives**, v. 118, n. 6, p. 818, 2010.
- LOGRIECO, A., et al. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. **European Journal of Plant Pathology**, v. 108, n. 7, p. 597-609, 2002.
- LOPEZ, Susana Pascual. Studies on production and ecophysiology of fungal antagonists for improved biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Iycopersici* and *Monilinia laxa*. 1998.

- LORITO, M. et al. Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. **Phytopathology**, v. 83, n. 3, p. 302-307, 1993.
- LUCY, M.; REED, E.; GLICK, Bernard R. Applications of free-living plant growth-promoting rhizobacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 86, n. 1, p. 1-25, 2004.
- LUONGO, Laura et al. Potential of fungal antagonists for biocontrol of *Fusarium* spp. in wheat and maize through competition in crop debris. **Biocontrol Science and Technology**, v. 15, n. 3, p. 229-242, 2005.
- MACHADO, José da Cruz et al. Inoculum potential of *Fusarium verticillioides* and performance of maize seeds. **Tropical Plant Pathology**, v. 38, n. 3, p. 213-217, 2013.
- MAGALHÃES, Valter Cruz et al. Burkholderia isolates from a sand dune leaf litter display biocontrol activity against the bole rot disease of *Agave sisalana*. **Biological Control**, v. 112, p. 41-48, 2017.
- MAGET-DANA, R. et al. Surfactin/iturin A interactions may explain the synergistic effect of surfactin on the biological properties of iturin A. **Biochimie**, v. 74, n. 12, p. 1047-1051, 1992.
- MAHAMUNI, Shrikumar Vijaykumar. Antifungal Trait of Burkholderia gladioli Strain VIMP02 (JQ811557). **Int J Sci Res**, v. 4, n. 8, p. 2059-64, 2015.
- MARASAS, Walter Friedrich Otto et al. **Toxigenic Fusarium species. Identity and mycotoxicology**. Pennsylvania State University, 1984.
- MARIN, Sonia et al. Environmental factors, in vitro interactions, and niche overlap between *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum*, and *F. graminearum*, *Aspergillus* and *Penicillium* species from maize grain. **Mycological Research**, v. 102, n. 7, p. 831-837, 1998.
- MARTINI, M. et al. DNA-dependent detection of the grapevine fungal endophytes *Aureobasidium pullulans* and *Epicoccum nigrum*. **Plant Disease**, v. 93, n. 10, p. 993-998, 2009.
- MEDEIROS, Flávio HV et al. Microorganisms, application timing and fractions as players of the milk-mediated powdery mildew management. **Crop protection**, v. 40, p. 8-15, 2012.
- MEHL, H. L.; COTTY, P. J. Influence of the host contact sequence on the outcome of competition among *Aspergillus flavus* isolates during host tissue invasion. **Applied and environmental microbiology**, v. 77, n. 5, p. 1691-1697, 2011.
- MELIN, Petter et al. Biological preservation of plant derived animal feed with antifungal microorganisms: safety and formulation aspects. **Biotechnology letters**, v. 29, n. 8, p. 1147-1154, 2007.

- MELNICK, Rachel L et al., Bacterial endophytes: *Bacillus* spp. from annual crops as potential biological control agents of black pod rot of cacao. **Biological Control**, v. 46, n. 1, p. 46-56, 2008.
- MENDES, M. C. **Micotoxinas, aspectos químicos e bioquímicos relacionados a grãos ardidos em híbridos de milho**. 2009. 106 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.
- MIGUEL, Tatiana de Á. et al. Effect of fungicide on *Fusarium verticillioides* mycelial morphology and fumonisin B1 production. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 293-299, 2015.
- MILLER, J. D. et al. Mycotoxin production by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* from Ontario and occurrence of fumonisin in the 1993 corn crop. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 17, p. 233-239, 1995.
- M'PIGA, P. et al. Increased resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in tomato plants treated with the endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* strain 63-28. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 50, n. 5, p. 301-320, 1997.
- MÜLLER, Thomas; RUPPEL, Silke. Progress in cultivation-independent phyllosphere microbiology. **FEMS microbiology ecology**, v. 87, n. 1, p. 2-17, 2014.
- MUNHOZ, Adalgisa Thayne, et al. Relação entre resistência de linhagens tropicais de milho à podridão de espiga e ao acúmulo de fumonisinas provocados por *Fusarium verticillioides*. *Summa Phytopathol*, 2015, vol. 41, no 2, p. 144-148.
- MUNIMBAZI, Célestin; BULLERMAN, Lloyd B. Inhibition of aflatoxin production of *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 by *Bacillus pumilus*. **Mycopathologia**, v. 140, n. 3, p. 163-169, 1997.
- MUNKVOLD, G. P.; MCGEE, D. C.; CARLTON, W. M. Importance of different pathways for maize kernel infection by *Fusarium moniliforme*. **Phytopathology**, v. 87, n. 2, p. 209-217, 1997.
- MUNKVOLD, Gary P.; DESJARDINS, Anne E. Fumonisin in maize: can we reduce their occurrence? **Plant disease**, v. 81, n. 6, p. 556-565, 1997.
- MYUNG, K. et al. The conserved global regulator VeA is necessary for symptom production and mycotoxin synthesis in maize seedlings by *Fusarium verticillioides*. **Plant pathology**, v. 61, n. 1, p. 152-160, 2012.
- NELSON, Paul E.; DESJARDINS, Anne E.; PLATTNER, Ronald D. Fumonisin, mycotoxins produced by *Fusarium* species: biology, chemistry, and significance. **Annual review of phytopathology**, v. 31, n. 1, p. 233-252, 1993.

- NIHORIMBERE, Venant et al. Impact of rhizosphere factors on cyclic lipopeptide signature from the plant beneficial strain *Bacillus amyloliquefaciens* S499. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 79, n. 1, p. 176-191, 2012.
- OLOTUAH, O. F. et al. Comparative control of *Fusarium verticillioides* infesting maize using *Hyptis suaveolens* and synthetic insecticide. **Imperial Journal of Interdisciplinary Research**, v. 2, n. 5, 2016.
- OREN, Liat et al. Early events in the *Fusarium verticillioides*-maize interaction characterized by using a green fluorescent protein expressing transgenic isolate. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 3, p. 1695-1701, 2003.
- ORMENO-NUNEZ, J. et al. A foliar disease of field bindweed (*Convolvulus arvensis*) caused by *Phomopsis convolvulus*. **Plant Disease**, v. 72, n. 4, p. 338-342, 1988.
- PAAVANEN-HUHTALA, Sari; AVIKAINEN, Hanna; YLI-MATTILA, Tapani. Development of strain-specific primers for a strain of *Gliocladium catenulatum* used in biological control. **European Journal of Plant Pathology**, v. 106, n. 2, p. 187-198, 2000.
- PAL, Kamal Krishna; GARDENER, B. McSpadden. Biological control of plant pathogens. **The plant health instructor**, v. 2, p. 1117-1142, 2006.
- PALAZZINI, Juan M. et al. Biological control of *Fusarium graminearum* sensu stricto, causal agent of Fusarium head blight of wheat, using formulated antagonists under field conditions in Argentina. **Biological Control**, v. 94, p. 56-61, 2016.
- PAMPHILE, J. A. et al. Prospects and Applications for Plant-Associated Microbes: A Laboratory Manual, Part A: Bacteria Finland. **Prospects and Applications for Plant-Associated Microbes: A Laboratory Manual, Part A: Bacteria Finland**, 2008.
- PASSERA, Alessandro et al. Competition assays revealed *PaeniBacillus pasadenensis* strain R16 as a novel antifungal agent. **Microbiological research**, v. 198, p. 16-26, 2017.
- PEREIRA, P.; NESCI, A.; ETCHEVERRY, M. Impact of two bacterial biocontrol agents on bacterial and fungal culturable groups associated with the roots of field-grown maize. **Letters in applied microbiology**, v. 48, n. 4, p. 493-499, 2009.
- PEREIRA, Paola et al. Impact of bacterial biological control agents on fumonisin B 1 content and *Fusarium verticillioides* infection of field-grown maize. **Biological Control**, v. 53, n. 3, p. 258-266, 2010.

- PEREIRA, Paola; NESCI, Andrea; ETCHEVERRY, Miriam. Effects of biocontrol agents on *Fusarium verticillioides* count and fumonisin content in the maize agroecosystem: Impact on rhizospheric bacterial and fungal groups. **Biological control**, v. 42, n. 3, p. 281-287, 2007.
- PÉREZ-JARAMILLO, Juan E.; MENDES, Rodrigo; RAAIJMAKERS, Jos M. Impact of plant domestication on rhizosphere microbiome assembly and functions. **Plant molecular biology**, v. 90, n. 6, p. 635-644, 2016.
- PIECKENSTAIN, Fernando L. et al. *Epicoccum purpurascens* for biocontrol of *Sclerotinia* head rot of sunflower. **Mycological Research**, v. 105, n. 1, p. 77-84, 2001.
- PIRONE, Luisa et al. Detection of cultured and uncultured Burkholderia cepacia complex bacteria naturally occurring in the maize rhizosphere. **Environmental microbiology**, v. 7, n. 11, p. 1734-1742, 2005.
- LEE, Theresa et al. Characterization of *Bacillus amyloliquefaciens* DA12 showing potent antifungal activity against mycotoxigenic *Fusarium* species. **The plant pathology journal**, v. 33, n. 5, p. 499, 2017.
- POZO, María J.; VAN LOON, L. C.; PIETERSE, Corné MJ. Boosting plant defence by beneficial soil microorganisms. In: **16th workshop of Marie Curie Fellows: Research training in progress**. European Commission-Directorate-General for research, 2004. p. 158-161.
- RADHAPRIYA, Parthasarathy et al. *Pseudomonas aeruginosa* RRALC3 enhances the biomass, nutrient and carbon contents of *Pongamia pinnata* seedlings in degraded forest soil. **PLoS one**, v. 10, n. 10, p. e0139881, 2015.
- RASTOGI, Gurdeep; COAKER, Gitta L.; LEVEAU, Johan HJ. New insights into the structure and function of phyllosphere microbiota through high-throughput molecular approaches. **FEMS microbiology letters**, v. 348, n. 1, p. 1-10, 2013.
- RHEEDER, J. P. et al. *Fusarium moniliforme* and fumonisins in corn in relation to human esophageal cancer in Transkei. **Phytopathology**, v. 82, n. 3, p. 353-357, 1992.
- RODRÍGUEZ, Hilda et al. Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. In: First international meeting on microbial phosphate solubilization. **Springer Netherlands**, 2007. p. 15-21.
- RODRIGUEZ-BRLJEVICH, Carlos. Interaction of fungicide seed treatments and the *Fusarium*-maize (*Zea mays* L.) pathosystem. **Iowa State University**, 2008.

ROMEIRO, R. da S. **Controle biológico de doenças de plantas: fundamentos**. Universidade Federal de Viçosa, 2007.

ROSSKOPF, E. N. et al. Field evaluation of *Phomopsis amaranthicola*, a biological control agent of *Amaranthus* spp. **Plant disease**, v. 84, n. 11, p. 1225-1230, 2000.

SARAVANAKUMAR, Kandasamy et al. Effect of *Trichoderma harzianum* on maize rhizosphere microbiome and biocontrol of *Fusarium* Stalk rot. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1771, 2017.

SAITOU, Naruya; NEI, Masatoshi. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular biology and evolution**, v. 4, n. 4, p. 406-425, 1987.

SEGONDS, Christine et al. Microbiological and epidemiological features of clinical respiratory isolates of *Burkholderia gladioli*. **Journal of clinical microbiology**, v. 47, n. 5, p. 1510-1516, 2009.

SHI, Cuijuan et al. Biocontrol of *Fusarium graminearum* growth and deoxynivalenol production in wheat kernels with bacterial antagonists. **International journal of environmental research and public health**, v. 11, n. 1, p. 1094-1105, 2014.

SHIVAS, R. G.; SCOTT, J. K. Effect of the stem blight pathogen, *Phomopsis emicis*, and the weevil, *Perapion antiquum*, on the weed *Emex australis*. **Annals of applied biology**, v. 122, n. 3, p. 617-622, 1993.

SMITH, T. K.; SEDDON, I. R. Synergism demonstrated between *Fusarium* mycotoxins. **Feedstuffs (USA)**, 1998.

SOBOWALE, A. A. et al. Persistence of *Trichoderma* species within maize stem against *Fusarium verticillioides*. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 40, n. 3, p. 215-231, 2007.

SOUZA, Rocheli de; AMBROSINI, Adriana; PASSAGLIA, Luciane MP. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. **Genetics and molecular biology**, v. 38, n. 4, p. 401-419, 2015.

STICHER, L.; MAUCH-MANI, B.; MÉTRAUX, and JP. Systemic acquired resistance. **Annual review of phytopathology**, v. 35, n. 1, p. 235-270, 1997.

SUNDHEIM, L. Attempts at biological control of *Phomopsis sclerotioides* in cucumber. **European Journal of Plant Pathology**, v. 83, p. 439-442, 1977.

- SWAMY, H. V. L. N. et al. Effects of feeding a blend of grains naturally contaminated with mycotoxins on swine performance, brain regional neurochemistry, and serum chemistry and the efficacy of a polymeric glucomannan mycotoxin adsorbent. **Journal of animal science**, v. 80, n. 12, p. 3257-3267, 2002.
- SYDENHAM, Eric W. et al. Fumonisin concentrations in Brazilian feeds associated with field outbreaks of confirmed and suspected animal mycotoxicoses. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, n. 6, p. 994-997, 1992.
- UENO, Y. Risk of multi-exposure to natural toxins. **Mycotoxins**, v. 50, p. 13-22, 2000.
- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE USDA. Disponível em: [http://www.nass.usda.gov/Statistics\\_by\\_State/Washington/Publications/Ag\\_Chemical\\_Use/veg06/carc hem07.pdf](http://www.nass.usda.gov/Statistics_by_State/Washington/Publications/Ag_Chemical_Use/veg06/carc hem07.pdf). Acessado: 28/12/2016.
- VERA-PINGITORE, Esteban et al. *Screening* and characterization of potential probiotic and starter bacteria for plant fermentations. **LWT-Food Science and Technology**, v. 71, p. 288-294, 2016.
- VESSEY, J. Kevin. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and soil**, v. 255, n. 2, p. 571-586, 2003.
- VIEIRA JUNIOR, J. R., et al. Residentes de filoplano como potenciais controladores de doenças de plantas. *Embrapa Rondônia. Documentos*, 2009.
- VINALE, F. et al. A novel role for Trichoderma secondary metabolites in the interactions with plants. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 72, n. 1-3, p. 80-86, 2008.
- VLAMAKIS, Hera et al. Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 3, p. 157, 2013.
- WANG, Elaine et al. Increases in serum sphingosine and sphinganine and decreases in complex sphingolipids in ponies given feed containing fumonisins, mycotoxins produced by *Fusarium moniliforme*. **J. Nutr**, v. 122, n. 8, p. 1706-17016, 1992.
- WANG, Y. et al. Evidence for direct utilization of a siderophore, ferrioxamine B, in axenically grown cucumber. **Plant, Cell & Environment**, v. 16, n. 5, p. 579-585, 1993.
- WANGUN, Hilaire V. Kemami; HERTWECK, Christian. Epicoccarines A, B and epipyridone: tetramic acids and pyridone alkaloids from an *Epicoccum* sp. associated with the tree fungus *Pholiota squarrosa*. **Organic & biomolecular chemistry**, v. 5, n. 11, p. 1702-1705, 2007.

WHITE, Thomas J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. **PCR protocols: a guide to methods and applications**, v. 18, n. 1, p. 315-322, 1990.

YOON, Mi-Young; CHA, Byeongjin; KIM, Jin-Cheol. Recent trends in studies on botanical fungicides in agriculture. **The plant pathology journal**, v. 29, n. 1, p. 1-9, 2013.

YOON, Seok-Hwan et al. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 67, n. 5, p. 1613-1617, 2017.

ZANOTTO, E., GUIMARÃES, R. A., ZANOTTO, L. A. S., MACHADO, J. C., MELO, I. S., VON PINHO R. G., PINTO, F. A. M. F., FORTES, P. H. O. S., MEDEIROS, H. N., MEDEIROS, F. H. V. Effect of integrating fungicide and biocontrol foliar sprays on maize grain yield and fumonisin content. **Meeting of the Working Group Biological Control of Fungal and Bacterial Plant Pathogens**. Biocontrol and Microbial Ecology, 12–15 SEPTEMBER 2016, BERLIN.

ZUCCHI, T. D.; MELO, I. S. **Controle biológico de fungos aflatoxigênicos**: biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas. Jáguaçu: EMBRAPA Meio Ambiente, 2009. 341 p.