



**POTENCIAL DE BACTÉRIAS EXTRAIDAS DO MANGUE PARA O
CONTROLE BIOLÓGICO DE *Rhizoctonia solani* EM SOJA**

RAPHAEL SATOCHI ABE DA SILVA

INSTITUTO BIOLÓGICO

PÓS-GRADUAÇÃO

**POTENCIAL DE BACTÉRIAS EXTRAÍDAS DO MANGUE PARA O
CONTROLE BIOLÓGICO DE *Rhizoctonia solani* EM SOJA**

RAPHAEL SATOCHI ABE DA SILVA

Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.

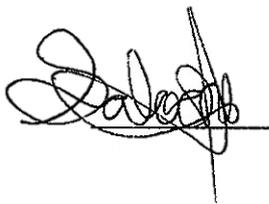
Orientador: Dr. Luis Garrigós Leite

Campinas - SP

2021

Eu **Raphael Satochi Abe da Silva**, autorizo o Instituto Biológico (IB-APTA), da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, a disponibilizar gratuitamente e sem ressarcimento dos direitos autorais, o presente trabalho acadêmico de minha autoria, no portal, biblioteca digital, catálogo eletrônico ou qualquer outra plataforma eletrônica do IB para fins de leitura, estudo, pesquisa e/ou impressão pela Internet desde que citada a fonte.

Assinatura:



Data: 07/02/2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo
Núcleo de Informação e Documentação — IB

Silva, Raphael Satochi Abe da.

Potencial de bactérias extraídas do mangue para controle biológico de *Rhizoctonia solani* em soja. I Raphael Satochi Abe da Silva. - São Paulo, 2021. 84 p.

doi: 10.31368/PGSSAAA.2021D.RS014

Dissertação (Mestrado). Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação.

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.

Linha de pesquisa: Manejo integrado de pragas e doenças em ambientes rurais e urbanos.

Orientador: Luiz Garrigós Leite.

Versão do título para o inglês: Potential of mangrove bacteria for the biological control of *Rhizoctonia solani* in soybean

1. Damping-off 2. Manejo de doenças 3. Fungo fitopatogênico 4. Manguezais

I. Silva, Raphael Satochi Abe da II. Leite, Luís Garrigós III. Instituto Biológico (São Paulo) IV. Título.

IB/Bib1./2021/014

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Raphael Satochi Abe da Silva

Título: Potencial de bactérias extraídas do mangue para o controle biológico de *Rhizoctonia solani* em soja.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio do Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo para a obtenção de título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Aprovado em: 29/07/2021

Banca Examinadora

Prof. Dr. Luís Garrigós Leite

Julgamento: APROVADO

Instituição: Instituto Biológico

Assinatura: 

Dra. Julie Giovanna Chacon-Orozco

Julgamento: Aprovado

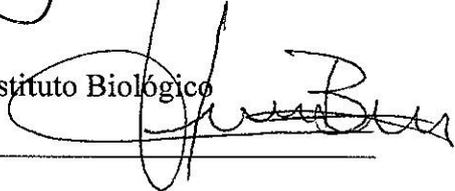
Instituição: Instituto Biológico

Assinatura: 

Dr. Cesar Junior Bueno

Julgamento: Aprovado

Instituição: Instituto Biológico

Assinatura: 

A minha mãe **Zilsami Kanvanchi**

A quem devo tudo que sou

Agradeço e ofereço.

Aos meus avós: **Meire e Adalto**

Pelo apoio e confiança

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me trazer motivação, força e sabedoria para realizar este trabalho.

A minha mãe ZILSAMI, por ser minha maior fonte de exemplo e inspiração. Por me ensinar a vencer as dificuldades, por me tornar uma pessoa forte e capacitada para os caminhos da vida.

Ao LUIS LEITE, por ser orientador, amigo e motivo de inspiração. Obrigado por acreditar no futuro deste projeto, pela oportunidade de crescimento e pela confiança depositada.

A Dra. JULIE CHACON, por me acompanhar durante toda essa jornada, sempre me orientando e motivando.

A todos os amigos do laboratório de Controle Biológico: FERNANDO, JORGE, ANA PAULA, SILVIA E NICOLE, por sempre me apoiar e me auxiliar na realização deste projeto.

A ANA GABRIELLE, por ter aberto as portas para este projeto, cedendo os materiais necessários para sua realização.

Aos colegas de turma do mestrado, por compartilhar as dificuldades e trazer forças para enfrentar os desafios.

A minha querida amiga ANA LAURA, por me motivar, ajudar e me fazer acreditar que tudo é possível quando se tem empenho. Por me fortalecer nos momentos de dificuldades e me acompanhar nos momentos de alegrias.

Ao INSTITUTO BIOLÓGICO, por me conceder a oportunidade de realizar meus estudos e fornecer o espaço físico para a execução deste trabalho.

A empresa ROSSAM, pelo apoio financeiro e incentivo na busca de conhecimento.

A pós graduação, em especial ao Marcelo Eiras, que durante todo o curso, nos motivou e demonstrou a importância dos trabalhos realizados.

Ao Ricardo Harakava e o laboratório de Fisiologia Vegetal, que me auxiliaram no desenvolvimento da dissertação.

A Dra. Fabiana Fantinatti e ao Lucas Vitor, pelo auxílio de suma importância na área genética deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES)

A todas as pessoas que contribuíram diretamente ou indiretamente para a realização dessa Dissertação de Mestrado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

SATOCHI, Raphael Abe da Silva. Potencial de bactérias extraídas do mangue para o controle biológico de *Rhizoctonia solani* em soja. 2021. 84p. Defesa (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, 2021.

A cultura de soja é afetada por uma variedade de doenças que resultam em danos econômicos significativos. O fungo *Rhizoctonia solani* está entre os fitopatógenos que podem ocasionar danos importantes na cultura, com sintomas de *damping-off* e queima das folhas. O controle biológico tem se apresentado como alternativa sustentável para o antagonismo de microrganismos patógenos. A bioprospecção de bactérias originadas de ambientes extremos como os manguezais, pode elevar as chances de se buscar isolados com potenciais biotecnológicos elevados, com características exclusivas e pouco estudados. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi isolar microrganismos presentes no solo de manguezais e avaliá-los no controle de *R. solani*. Amostras de solos do manguezal de Paraty (RJ) e Picinguaba (SP) foram levadas ao laboratório para isolamento dos microrganismos. Inicialmente foi realizado um *screening* com os isolados *in vitro* através do confronto direto em placa de petri. Após a seleção, avaliou-se os efeitos dos filtrados bacterianos na inibição micelial do fitopatógeno. Os melhores isolados foram selecionados para ensaios *in vivo*, nele verificou-se a eficiência dos isolados no controle de *R. solani* por dois métodos de inoculação: embeбimento e revestimento das sementes de soja em solução contendo o caldo de crescimento bacteriano. Dois isolados foram selecionados para teste em casa de vegetação, inoculados em sementes de soja. As identificações moleculares foram realizadas por meio do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA. Dentre os 157 microrganismos isolados, apenas cinco foram selecionados para o ensaio *in vivo*, por apresentarem altos níveis de inibição do fungo patógeno em baixas concentrações. O método de aplicação *in vivo* utilizando sementes embebidas, demonstrou melhores resultados, causando a diminuição da severidade da doença em comparação com as sementes revestidas. Em casa de vegetação, o isolado B. cepacia PR10 controlou com maior efetividade os sintomas do fitopatógeno, além de apresentar estímulo positivo no desenvolvimento vegetal de soja. Deste modo, conclui-se que os isolados obtidos através do sedimento de manguezal, pode possuir potencial biotecnológico para o controle de *R. solani*.

Palavras-chave: Queima da folha. Mela da Soja. *Damping-off*. Manejo de doenças. Fungo fitopatogênico. Manguezais. *Glycine max*. Controle biológico.

ABSTRACT

SATOCHI, Raphael Abe da Silva. Potential of mangrove bacteria for the biological control of *Rhizoctonia solani* in soybean. 2021. 84p. Defense (Masters in Health, Food and Environmental Safety in Agribusiness) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, 2021.

Due to its high production, the soybean crop is affected by a variety of diseases that result in significant economic damage. The fungus *Rhizoctonia solani* is among the phytopathogens that can cause significant damage to the crop, with symptoms of *damping-off* and leaf-burning. Biological control has proven to be a sustainable alternative for the antagonism of pathogenic microorganisms. Bioprospecting in extreme environments, such as mangroves, may present microorganisms with biotechnological potential, with unique and little studied characteristics. Thus, the objective of this work was to isolate microorganisms present in mangrove soils and evaluate them to control *R. solani*. Samples of mangrove soils from Paraty (RJ) and Picinguaba (SP) were taken to the laboratory for isolation of microorganisms. Initially, a screening of the isolates was performed *in vitro* by direct confrontation in petri dishes. After selection, the effects of bacterial filtrates on mycelial inhibition of the phytopathogen were evaluated. The best isolates were selected for *in vivo* assays, where the efficiency of the isolates in the control of *R. solani* was verified by two inoculation methods: soaking and coating of soybean seeds in solution containing the bacterial growth broth. Two isolates were selected for testing in the greenhouse, inoculated on soybean seeds. Molecular identifications were performed by partial sequencing of the 16S rRNA gene. Among the 157 microorganisms isolated, only five were selected for the *in vivo* assay, because they showed high levels of inhibition of the pathogenic fungus at low concentrations. The *in vivo* application method using soaked seeds showed better results, causing a decrease in disease severity compared to coated seeds. In the greenhouse, the PR10 isolate more effectively controlled the phytopathogen symptoms, besides presenting a positive stimulus on the soybean plant development. The molecular analysis revealed three genera of bacteria: *Burkholderia*, *Pseudomonas* and *Bacillus*. Thus, conclude that the isolates obtained from the mangrove sediment may have biotechnological potential to control *R. solani*.

Keywords: Leaf scorch. Soybean curl. Damping-off. Disease management. Phytopathogenic fungus. Mangroves. Glycine max. Biological control.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Sintomas da mela da soja ocasionadas por *Rhizoctonia solani* : A- Teias de micélios com a produção de escleródios ; B- Encharcamento do limbo foliar. Autor: SCHWARTZ, 2008.....5
- Figura 2. Sintomas de damping-off ocasionadas por *R. solani* : A- Podridão aquosa e lesões na haste; B- Anelamento na base e tombamento da planta. Autor: SARAN, 2017.....6
- Figura 3. Distribuição global de mangues, e respectiva diversidade vegetal. Fonte: US Department of Commerce (2014).....12
- Figura 4. Distribuição das áreas de manguezais no Brasil, e as respectivas espécies vegetais encontradas. Fonte: US Department of Commerce (2014).....13
- Figura 5. Ilustração das repetições. Cada letra representa uma bactéria diferente, estriadas por 1 cm, dispostas equidistantes. Ao centro um disco (5 mm) do micélio de *R. solani*.....20
- Figura 6. Ilustração da repetição. Em A é possível ilustrar o isolado bacteriano, disposto em quatro estrias (1 cm) equidistantes. Ao centro um disco (5 mm) do micélio de *R. solani*.....21
- Figura 7. Índices de danos/doença em sementes de soja. A- 100%, sem emissão de radícula pela semente; B- 66,66%, sementes com emissão de radícula necrosada; C- 33,33%, sementes com emissão de radícula completas, mas com necrose; D – 0%, sementes com emissão de radícula completa sem necroses.....23
- Figura 8. Diversidade morfológica do crescimento de colônias em plaqueamento das amostras de solo nas diluições de 10^{-5} . Fonte: Ana Gabriele B. CASTELANI (2017).....29
- Figura 9. Teste de patogenicidade com *Rhizoctonia solani* em sementes de soja. Em A tratamento controle, sem adição do fungo; Em B, sementes com adição do disco de crescimento micelial de *R. solani*, demonstrando sinais de colonização fúngica e sintomas da doença.....30
- Figura 10. Taxa de inibição do crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* por ação de bactérias e actinobactérias oriundas do litoral de São Paulo e Rio de Janeiro. PR=restinga, MS=mangue seco, MM=mangue molhado, MA=mar aberto. *As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.....32
- Figura 11. Inibição do crescimento micelial de *Rhizoctonia solani*, por ação de bactérias oriundas do solo de manguezais na região de Picinguaba-SP e Paraty-RJ. Os tratamentos

- correspondem respectivamente às imagens evidenciadas em: (A) Tratamento controle; (B) PR02; (C) PR22; (D) PR23; (E) PR28; (F) PR45; (G) MS11; (H) MM02 e (I) MA08.....33
- Figura 12. Análise de distância genética baseada na sequência parcial do gene ribossomal 16S demonstrando a relação entre os isolados PR02 e PR10 com sequencias depositadas na base de dados do Eztaxon.....38
- Figura 13. Análise de distância genética baseada na sequência parcial do gene ribossomal 16S expondo as relações entre os isolados *Pseudomonas aeruginosa* MA05 e *P. aeruginosa* MA07 com sequencias depositadas na base de dados do Genbank.....39
- Figura 14. Análise de distância genética baseada na sequência parcial do gene ribossomal 16S demonstrando a relação entre os isolados MM02 e MM13 com sequencias depositadas na base de dados do Eztaxon.....40
- Figura 15. Índices de danos/doença (%) em sementes previamente mergulhadas no caldo de crescimento das bactérias *Burkholderia glumae* PR02, *Burkholderia cepacia* PR10 e *Burkholderia cepacia* PR28, e inoculadas com *Rhizoctonia solani*. *Letras diferentes significam diferenças entre tratamentos, de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.....44
- Figura 16. Índices de danos/doença (%) em sementes revestidas com goma xantana mais as bactérias *Burkholderia glumae* PR02, *Burkholderia cepacia* PR10 e *Burkholderia cepacia* PR28, e inoculadas com *Rhizoctonia solani*. *Letras diferentes significam diferenças entre tratamentos, de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.....45
- Figura 17. Porcentagens de sementes de soja germinadas em substratos infestados com *Rhizoctonia solani* e tratados com as bactérias *Burkholderia cepacia* PR10 e *Burkholderia glumae* PR02, aplicadas na semente (A) e no substrato (B). *Letras diferentes representam diferença significativa, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....48
- Figura 18. Porcentagens de plantas de soja sobreviventes em substratos infestados com *Rhizoctonia solani* e tratados com as bactérias *Burkholderia cepacia* PR10 e *Burkholderia glumae* PR02, aplicadas na semente (A) e no substrato (B). *Letras diferentes representam diferença significativa, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....49
- Figura 20. Média do peso (em gramas) das plantas de soja em substratos infestados com *Rhizoctonia solani* e tratados com as bactérias *Burkholderia cepacia* PR10 e *Burkholderia*

glumae PR02, aplicadas na semente (A) e no substrato (B) . *Letras diferentes representam diferença significativa, pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.....51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Quantidade de microrganismos isolados nas diferentes regiões de coleta das amostras. As regiões correspondem respectivamente as áreas de coletas; MM, Mangue Molhado (Paraty-RJ); MS, Mangue Seco (Paraty-RJ); MA, Mar Aberto (Paraty-RJ) e PR, Picinguaba Restinga (Picinguaba- SP).....	28
Tabela 2. Microrganismos que apresentaram inibição do patógeno quando submetidos a técnica de confrontamento direto em placa.....	31
Tabela 3. Porcentagens de inibição <i>in vitro</i> do crescimento micelial de <i>R. solani</i> com a adição de 10%, 30% e 50% dos filtrados bacterianos.....	35
Tabela 4. Relação dos isolados selecionados para serem identificados molecularmente, com seus respectivos locais de coleta.....	36
Tabela 5. Sequências dos isolados do Genbank compatíveis com as obtidas no presente trabalho, através da análise BLAST do rRNA 16S.....	37

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	OBJETIVOS	2
2.1.	Geral	2
2.2.	Específico	2
3.	REVISÃO DE LITERATURA	3
4.	MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1.1.	Coleta das amostras de solo	16
4.1.2.	Isolamento de bactérias	16
4.1.3.	Preparação dos meios de cultivo para o crescimento das bactérias	16
4.1.4.	Tryptic Soy Ágar (TSA)	17
4.1.5.	Glucose Yeast (GY)	17
4.2.	Isolado do fungo <i>Rhizoctonia solani</i>	18
4.2.1.	Cultivo de <i>Rhizoctonia solani</i>	18
4.3.	Avaliação prévia de bactérias por pareamento coletivo	19
4.3.1.	Avaliação prévia de bactérias por pareamento único (singular)	20
4.3.2.	Avaliação de bactérias por incorporação dos metabólitos no meio de cultura	21
4.3.3.	Avaliação de bactérias por dois métodos de aplicação do caldo de cultivo em sementes de soja – Teste de laboratório	22
4.3.4.	Avaliação de bactérias por dois métodos de aplicação do caldo de cultivo em sementes de soja – Teste em casa de vegetação	23
4.4.	Identificação molecular dos isolados de interesse	24
4.4.1.	Extração do DNA genômico bacteriano	24
4.4.2.	Amplificação dos genes 16S rRNA	25
4.4.3.	Purificação das amostras	25
4.4.4.	Sequenciamento e análise das sequências	26
4.4.5.	Análises por Bioinformática e análise filogenética	26
4.5.	Análises estatísticas dos dados	27
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28

5.1.	Isolamentos de microrganismos	28
5.2.	Patogenicidade de <i>Rhizoctonia solani</i> para sementes de soja	29
5.3.	Avaliação prévia de bactérias por pareamento coletivo	30
5.4.	Avaliação prévia de bactérias por pareamento único (singular)	31
5.5.	1.1.Avaliação de bactérias por incorporação dos metabólitos no meio de cultura	34
5.6.	Identificação molecular dos isolados de interesse	36
5.7.	Avaliação de bactérias por dois métodos de aplicação do caldo de cultivo em sementes de soja – Teste de laboratório	43
5.8.	Avaliação de bactérias por dois métodos de aplicação do caldo de cultivo em sementes de soja – Teste em casa de vegetação	47
6.	CONCLUSÕES	53
7.	REFERÊNCIAS	54

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é responsável por cerca de 7% da produção e exportação mundial na área agrícola (MAPA, 2017) e dentre as principais commodities, a soja ocupa o segundo lugar, com uma produção anual de 124,845 milhões toneladas (CONAB, 2020). Dentre os principais fatores limitantes de seu rendimento destacam-se as doenças responsáveis pelas grandes variações na produtividade de uma safra para a outra (FENILI, 2001). A cultura de soja é afetada por aproximadamente 40 doenças identificadas no Brasil, provenientes de fungos, bactérias, nematoides e vírus (CELESTINO et al., 2016). As doenças podem ser classificadas devido a área de ação do patógeno, como podridões de sementes, de plântulas, de raiz, doenças da haste e do colo e doenças foliares (BEN et al., 2015). A importância econômica de cada doença varia a cada ano e em função das condições climáticas, porém alguns patógenos podem ocasionar perdas de quase 100% em áreas de propagação. (CELESTINO et al., 2016).

Dentre as doenças fúngicas, o fungo *Rhizoctonia solani* é um dos mais importantes (MEYER, 2001), causando sintomas de *damping-off* e mela/queima da soja (EMBRAPA, 1999). Está também associado a outras culturas como arroz, algodão, feijoeiro, milho, sorgo e caupi. (CÂMARA, 1998; SOUSA, 2007). A proliferação do fungo é favorecida por temperaturas entre 25°C e 30°C, sendo estritamente relacionada a distribuição das chuvas e a consequente umidade do ambiente. Sua disseminação ocorre principalmente devido a respingos de chuvas e por contato entre plantas (GODOY et al., 2014).

No controle da doença, tem-se priorizado a aplicação de fungicidas químicos como tratamento de sementes, protegendo-as contra o fungo presente no solo durante a emergência (GODOY, 2018). Dificuldades para aplicação de fungicidas nas partes aéreas e a resistência induzida aos produtos químico restringe sua eficiência apenas ao uso preventivo (MEYER, 2001). O uso indiscriminado de produtos químicos para o controle de fitopatógenos tem sido amplamente investigado e discutido nas últimas décadas, devido a sua influência ambiental negativa, aumentos dos custos de produções e a possibilidade de ocasionar problemas à saúde humana (LUCON 2009).

Buscando uma agricultura mais sustentável e ecológica, o uso de microrganismos vem ganhando espaço com efeitos benéficos para diferentes culturas. De acordo com Andreote (2017), a simbiose estabelecida entre as plantas e os microrganismos podem fornecer a planta diferentes mecanismos de defesa diante de diversos patógenos e condições estressantes, influenciando diretamente a saúde e produtividade do vegetal.

Microrganismos de ambientes extremos podem possuir características potenciais de interesse biotecnológico, devido a presença de características diferenciais. Sendo assim, os manguezais são considerados ambientes extremos por apresentar salinidade entre 5 e 30%. É considerado um ambiente rico em matéria orgânica, porém deficiente em nutrientes, especialmente nitrogênio e fósforo, sendo a atividade microbiana responsável pelas transformações e disponibilidade de nutrientes dentro do ecossistema (ALONGI et al., 1993; HOLGUIN et al., 1999). Desta forma, 91% da biomassa microbiana total em manguezais tropicais é constituída por bactérias e fungos (ALONGI et al., 1993).

Portanto, a bioprospecção desses microrganismos pode permitir a descoberta de isolados potenciais para o uso agrícola, com mecanismos que promovam o crescimento vegetal e atue no controle de pragas e doenças.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Selecionar bactérias oriundas do litoral de São Paulo e Rio de Janeiro com potencial para o controle do fitopatógeno *R. solani*

2.2. Específicos

- Comparar a ação inibitória *in vitro* dos filtrados bacterianos sobre o crescimento micelial de *R. solani*;
- Avaliar os isolados selecionadas quanto ao potencial para controle do fungo *Rhizoctonia solani* nas sementes de soja em laboratório, pelo revestimento da semente com goma xantana mais o caldo da bactéria e pelo seu embebimento no caldo da bactéria;
- Avaliar os isolados selecionadas quanto ao potencial para controle do fungo *Rhizoctonia solani* nas sementes de soja em casa de vegetação, pelo embebimento das sementes no caldo da bactéria e pela aplicação do caldo no substrato de plantio.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Produção da cultura de Soja

Atualmente, a produção mundial do setor agrícola na área de soja é comandada pelo Brasil, com uma produção anual de 124,8 milhões de toneladas, seguido do Estados Unidos com uma produção anual de 96,676 milhões de toneladas (CONAB, 2020; USDA, 2020). No Brasil, a área utilizada para o cultivo da Soja compreende cerca de 36,9 milhões de hectares, sendo o estado do Mato Grosso o maior produtor, com uma área plantada de 10 milhões de hectares, conforme o levantamento sistemático da produção agrícola realizado pelo IBGE em 2020.

Segundo projeções realizadas pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2017), estima-se que a soja brasileira, em 2033/2034, será responsável por cerca de 43% nas exportações nacionais de grãos para o comércio mundial.

A soja se inclui no grupo dos alimentos completos, pois em sua composição encontra-se 42% de proteínas, 33% de carboidratos, 20% de lipídios e 5% de resíduos, além de vitaminas e sais minerais essenciais à saúde humana, (MAGNONI, 2002). As proteínas são classificadas devido a composição quantitativa de aminoácidos essenciais, no qual o organismo não produz e precisa ser adquirido através da alimentação. A soja possui altas concentrações desses aminoácidos quando comparados a outros vegetais, (AMARAL, 2006).

Os produtos provenientes da soja podem ser classificados em quatro grupos de acordo com seu processamento: Produtos não desengordurados, como leite de soja e o extrato de soja; Produtos de farelo desengordurados, provindos da trituração de grãos como farinhas e farelos; Produtos de óleo bruto, onde incluem-se óleos comestíveis e margarinas e os alimentos naturais, podendo ser fermentados ou não fermentados, como o shoyo e grãos frescos verdes respectivamente, (AMARAL, 2006).

O avanço das tecnologias de processamentos possibilitou novas utilizações da cultura disponíveis no mercado, sendo como matéria prima para diversos subprodutos, (CARRÃO-PANIZZI, 2011). O grão da soja origina diversos subprodutos: adesivos e nutrientes, formulador de espumas, fabricação de fibras, adubos, revestimentos, emulsão para tintas, alimentação animal e outras aplicações. (EMBRAPA-SOJA, 2001).

Estudos que visam o desenvolvimento de tecnologias aplicadas ao campo, bem como o aumento da produtividade e a redução dos custos vem sendo desenvolvidos ao longo dos anos,

porém um dos maiores desafios encontrados é a utilização de sementes saudáveis, livres de patógenos, que possam reduzir o potencial germinativo, do vigor e da emergência, do período de armazenamento e danos econômicos para a safra (SOUSA, 2016).

3.2. Doenças da soja

Devido a sua grande área cultivada, a soja é afetada por diversas doenças. Aproximadamente 40 doenças provenientes de fungos, bactérias, nematóides ou vírus já foram identificadas no Brasil (CELESTINO et al., 2016). As doenças podem ser classificadas devido a área de ação do patógeno, como podridões de sementes, de plântulas, de raiz, doenças da haste e do colo e doenças foliares (BEN et al., 2015). A importância econômica de cada doença varia a cada ano e em função das condições climáticas, porém alguns patógenos podem ocasionar perdas de 15% a 20%, no entanto, algumas doenças podem ocasionar perdas de quase 100% (CELESTINO et al., 2016).

São conhecidos diversos fungos que podem atacar a cultura, principalmente em ambientes com maior umidade, entre eles *Aspergillus*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Rhizopus*. (BEN et al., 2015). Entre os principais patógenos de importância econômica na cultura da soja, o gênero *Rhizoctonia* está frequentemente relacionado ao tombamento, podridão da raiz e da base da haste, morte em reboleira e mela ou requeima de soja (FENILLE, 2001).

3.3. *Rhizoctonia solani*

Caracteriza-se como *Rhizoctonia solani* quando apresenta reprodução assexuada e, quando apresenta estruturas de reprodução sexuada, denomina-se *Thanatephorus cucumeris*, pertence ao Reino Fungi, Filo Basidiomycota, Classe Basidiomycetes, Ordem Ceratobasidiales, Família Ceratobasidiaceae (FENILLE 2001, apud HAWKSWORHT et al., 1995).

O gênero *Rhizoctonia* foi descrito pela primeira vez na França, pelo micologista De Candolle (1815), onde observou a característica fitogênica relacionada preferencialmente às raízes. Sua estrutura foi classificada como um fungo não esporulante que produz filamentos de hifas a partir de escleródios (SNEH et al., 1991).

Desde a descoberta do gênero, cerca de 120 espécies foram registradas em diversas culturas e países, considerado como um grande e diversificado complexo grupo de fungos (FENILLE et al., 2002). Segundo Botelho et al. 2001 (citado por CASTRO, 2007), o fungo do

gênero *Rhizoctonia solani* possui propriedades fitopatógenas em diversas culturas, sendo considerado como um fungo cosmopolita e que ocasiona doenças de relevância econômica na maioria das plantas cultivadas em todo o mundo. As principais vias de identificação morfológica dessa espécie se dão pela observação das seguintes estruturas: ramificação em ângulo de 90° próximo ao septo distal das hifas jovens; presença de apenas um septo na ramificação da hifa em seu ponto proximal; ausência de conídios; entre outros aspectos morfológicos do fitopatógeno (FENILLE, 2001).

3.3.1. *Rhizoctonia solani* em soja.

Dentre as doenças ocasionadas em soja, a mela da soja caracteriza-se por afetar toda parte aérea da planta, independentemente de seu estágio de desenvolvimento, ocasionando a queda das folhas e pecíolos, auxiliando na propagação da doença por contato. Inicia-se com pequenas lesões com aspecto encharcado, podendo evoluir para a necrose foliar (Figura 1). Nos tecidos mortos o fungo desenvolve teias de micélios com a produção de escleródios, adquirindo um aspecto de coloração castanho-claro a castanho-escuro (Figura 1). Infecções nas hastes e nas vagens resultam em lesões castanho-avermelhadas, ocasionando grandes manchas e reboleiras na cultura, (FENILLE,2001).



Figura 1. Sintomas da mela da soja ocasionadas por *Rhizoctonia solani* : A- Teias de micélios com a produção de escleródios ; B- Encharcamento do limbo foliar. Autor: SCHWARTZ, 2008.

Além da necrose foliar, o fitopatógeno pode originar os sintomas de tombamento ou damping-off, caracterizado pelas lesões na haste e pecíolos da planta, ocorrendo entre a pré-emergência e 30 a 35 dias após a emergência, sendo favorecido por temperaturas e umidades elevadas. Na fase de plântula, é possível observar o anelamento da haste ao nível do solo,

proveniente da degradação dos tecidos pelas enzimas produzidas pelo fungo, no qual resultara na podridão aquosa de coloração castanha e o consequente tombamento (Figura 2). O sistema radicular é totalmente comprometido, adquirindo uma coloração castanho-claro e se soltando com facilidade (GODOY et al., 2014), ocasionando uma redução drástica na produção de soja, entre 31 a 60% (YORINORI, 1998)



Figura 2. Sintomas de damping-off ocasionadas por *R. solani* : A- Podridão aquosa e lesões na haste; B- Anelamento na base e tombamento da planta. Autor: SARAN, 2017.

Como alternativas de controles, estudos vem demonstrando a utilização de técnicas de manejo integrado, bem como aplicação de produtos biológicos baseando-se nas diversidades de microrganismos, rotações de culturas não hospedeiras, consórcios de produtos químicos com biológicos, rotação de ingredientes ativos, entre outros. Apresentando reduções nos usos de agroquímicos para o controle de fitopatógenos (LANA FILHO, 2010).

3.3.2. Monitoramento da doença

Antes de aferir qualquer medida de controle, é necessário realizar o monitoramento dos índices de incidência da doença na cultura. O acompanhamento desde o início do desenvolvimento da soja é de vital importância, fornecendo ao produtor a oportunidade de iniciar o controle logo após os primeiros sintomas ou preventivamente (IAGRO, 2018). Para se estabelecer os índices de incidência, é necessário que haja um levantamento histórico da doença na área, e na região ao redor, bem como as informações de chegada da doença na região, sendo estes aspectos fundamentais para a aplicação do manejo. Segundo Fabiano Siqueri (2018), uma das alternativas para o monitoramento de doenças fúngicas, é a

implantação de campos de monitoramento nas lavouras de soja, onde delimita-se pequenas áreas com cerca de 25 m², semeadas previamente com 15 a 20 dias antes a época de semeadura normal. Esta técnica possibilita determinar previamente a incidência da doença na cultura, evitando que ocorra aplicações desnecessárias e favorecendo a efetividade do controle, com a aplicação do controle preventivo.

3.3.3. Alternativas de controle

Atualmente as práticas de controle baseiam-se na aplicação de fungicidas de origem química (AGROFIT, 2018). Os principais grupos químicos utilizados para o controle de *R. solani* são: Benzimidazóis, triazóis e estrobilurinas. Os benzimidazóis são fungicidas de origem sistêmica que possuem afinidade com o vegetal e a capacidade de ser translocado no interior do hospedeiro a locais distantes do local de aplicação, não afetando os tecidos vegetais. Seu método de ação consiste na inibição da síntese de DNA, atuando no processo mitótico (BALADIN, 2015). O grupo químico dos triazóis são também fungicidas sistêmicos que possuem alta capacidade antifúngica, devido a sua rápida absorção e elevado efeito residual. Atuam na inibição da biossíntese de esteróis e o consequente rompimento da membrana celular. As estrobilurinas são grupos químicos de origem mesostêmicas que possuem afinidade com as substâncias lipídicas da superfície da planta, sendo absorvidas pela camada cerosa, apresentando atividade translaminar, e com mínima ou inexistente translação vascular (BALADIN, 2015).

Atualmente o método mais utilizado é a aplicação em consórcio dos grupos químicos triazóis e estrobilurinas, no qual apresenta efetividade em uma maior gama de doenças fúngicas, devido aos diferentes mecanismos de ação dos grupos químicos, controlando fungos Ascomycetos, como o Oídio; Basidiomycetos (*R. solani*, *Phakopsora sp*, etc); Deuteromycetos (*Cercospora spp*, *Alternarias spp*, etc) e Oomicetos.(Mildios, requeimas, et). (ENGENHARIA DE BIOSSISTEMAS, ESALQ. 2016).

Com o objetivo do desenvolvimento de novas técnicas que favoreçam a otimização dos sistemas agrícolas, o uso do controle biológico tem ganhado espaço devido a sua efetividade a agentes patogênicos e a redução dos custos agrícolas. (LANA-FILHO, 2010). O efeito antagônico exercidos pelos agentes biológicos contra fungos fitopatógenos, provém da capacidade de degradação da parede celular fúngica por hidrolases secretada pelos microrganismos. As quitinases e glucanases são os principais componentes estruturais desta

parede celular, podendo ser importante no controle biológico desses fitopatógenos (Kulminskaya et al., 2001). A utilização de microrganismos para o controle de *R. solani*, já foi evidenciada em diversos trabalhos, como o observado por Dias e colaboradores (2013), onde isolados de *Trichoderma sp.* controlaram os sintomas de damping-off de pós emergência em 86,3%, na cultura de alface. O tratamento de sementes com produtos biológicos também já foi relatado por AGOSTINI (2009), onde sementes inoculadas com isolados de *Bacillus subtilis* reduziram a incidência da mela da soja em 65%. A co-inoculação de dois agentes microbiológicos *B. subtilis* e *Bradirhizobium japonicum* demonstraram maior eficácia quando avaliados os sintomas de damping-off e de promoção de crescimento na cultura de soja (YUMING, 2003). Em um experimento conduzido por Resmuska e Pria (2007), onde avaliaram o efeito dos agentes antagonistas *B. thuringiensis* e *Trichoderma sp.* no crescimento micelial sobre *Rhizoctonia solani*, foi possível observar que os isolados de *B. thuringiensis* mostrou-se mais eficiente que os isolados de *Trichoderma sp.* no controle biológico de *R. solani*. Em um outro experimento conduzido por Knaak et al. (2007), avaliaram as proteínas sintetizadas por *Bacillus thuringiensis* relacionadas ao efeito antagonista diante de fungos fitopatogênicos, e constataram que as proteínas Cry1Ab e Cry1Ac, reduziram o crescimento micelial dos fungos *R. solani*, *P. grisea*, *F. oxysporum* e *F. solani* durante sete dias após a incubação, onde houve diferença significativa ($P < 0,05$). Contudo, os efeitos antagonistas provenientes de agentes biológicos, fornecem alternativas ao uso de fungicidas químicos, tendo em vista o incremento da emergência das plântulas, podendo aumentar a produtividade agrícola e inibir a incidência de doenças radiculares

Segundo o AGROFIT (2020), atualmente no mercado não há nenhum produto de origem microbiológica registrado para o controle de *R. solani* para a cultura de soja, sendo necessário a identificação de novos agentes de controle.

3.3.4. Tratos culturais

As doenças causadas por *R. solani*, podem ocorrer em qualquer estágio da cultura. Suas maiores severidades dependem de fatores como clima, cultivares, quantidade de inóculo do patógeno, estrutura e fertilidade do solo, dentre outros (ITO, 2013). Porém um dos principais aspectos para prevenção dos sintomas, sem dúvidas é o vigor da planta. A utilização de sementes certificadas de boa qualidade sanitária e fisiológica, que combinadas a nutrição

equilibrada, principalmente com K, S, Zn, Cu e Mn, são medidas iniciais que fornecerão uma maior efetividade na defesa do vegetal (HENING, et al., 2014)

Contudo, após o surgimento da doença, devem-se adotar medidas integradas que visam a diminuição ou o controle do fitopatógeno, como a implementação das rotações de culturas não hospedeiras, eliminação de plantas daninhas e restos culturais, adequação de população de plantas, o controle químico com fungicidas consorciado ao controle biológico, entre outros métodos. (HENING, et al., 2014)

Um dos métodos culturais utilizados é a alteração do pH do solo. Em um experimento conduzido por Chet e Baker (1980) o pH do solo foi alterado de 8,1 para 5,7 e 6,5, observando a redução dos sintomas de damping-off em plântulas de alfafa, beterraba e rabanete. Constataram também que meios de culturas variando de 6,5 a 7,5 propiciaram melhor crescimento fúngico, demonstrando assim afinidade por meios com pH neutro.

Solos supressivos se apresentam como outra alternativa ao controle de fitopatógenos. A supressividade natural dos solos estão relacionados com suas propriedades químicas, biológicas e físicas, onde são classificados de acordo com a atividade do fitopatógeno, podendo ele não se estabelecer; se estabelecer e não produzir doença ou se estabelecer e causar uma doença temporária, vindo ao declínio após um certo período (BETTIOL, 2005). A supressividade de diferentes solos a *R. solani*, já foi descrito por GHINNI (2001), onde avaliaram sete tipos de solos, provenientes de pastos, pousio, mata, solo cultivados com cana-de-açúcar, milho e café. Os provenientes do pasto e pousio, seguidos da mata, foram os solos mais supressivos, enquanto que os solos provenientes de áreas de cultivo de cana-de-açúcar, milho, café e solo arado foram os mais conducentes. Os resultados obtidos se assemelharam a Schneider (1982), onde solos ecologicamente balanceados apresentam-se como supressivos, devido aos constituintes físico-químicos e microbianos do solo serem mais estáveis. Altos níveis de alumínio também estão relacionados com a supressividade natural de alguns solos a *R. solani* (KOBAYASHI; KO, 1985).

As técnicas de rotações de culturas devem ser empregada com cautela, devido à alta habilidade de competição saprofítica do fitopatógeno, mantendo-se viável em vários tipos de culturas. No entanto recomenda-se o plantio prévio de gramíneas não hospedeiras, visando a diminuição do inóculo (BACCHI; GOULART; DEGRANDE, 2001).

O controle químico deve ser utilizado como última alternativa, após emprego de todas as inovações tecnológicas disponíveis (ITO, 2013), porém sua maior eficiência se dá quando aplicado antes da severidade atingir o nível de 10% da área foliar atacada. (HENING, et al., 2014).

3.4. Controle Biológico

Uma das possíveis limitações da produtividade agrícola de maior destaque é a ocorrência de diferentes patógenos (REIS et al., 2001) Desta forma, o uso intensivo de defensivos agrícolas e fertilizantes pode acarretar em aumento do custo de produção. Além disso, o uso destas substâncias pode ser nocivo ao ambiente, reduzindo a qualidade e a sustentabilidade do solo (YANG et al., 2007).

Segundo dados da Organização Internacional do Trabalho/Organização Mundial da Saúde (OIT/OMS), estima-se que em países em desenvolvimento, ocorrem anualmente 70 mil intoxicações agudas ou crônicas, as quais, conseqüentemente ocasiona elevado investimento para a saúde humana, ambiental e agrícola. No Brasil, houve aumento de 700% no uso de agrotóxicos no período de 1970 a 2000, resultando em aproximadamente 1 bilhão de litros de agrotóxicos utilizados anualmente (SINTOX, 2017).

A busca por novas estratégias que visam à diminuição do uso de insumos químicos tem sido apontada como prioritária devido aos impactos negativos sobre o meio ambiente.

Contudo, o efeito biocontrolador de patógenos exercidos por microrganismos, pode ser resultado da ação de mecanismos tais como a produção de ácido cianídrico, antibióticos, competição por espaço, Fe⁺³ e outros nutrientes, parasitismo, indução de resistência e proteção cruzada (MARIANO et al., 2004).

Devido a estas relações biológicas, vários microrganismos já foram identificados como agentes de controle biológico (GNANAMANICAKAM, 2002) apresentando-se como uma alternativa ecologicamente viável (SOUSA et al., 2009; COMPANT et al., 2005).

Fungos e alguns isolados bacterianos tem grande utilidade no controle de pragas. O gênero *Bacillus* representa a principal bactéria comercializada para o controle biológico de diferentes pragas (MAZZUCHELLI, 2015). As actinobactérias apresentam características favoráveis como promotores de crescimento vegetal, e também potencial com agentes de biocontrole contra diferentes patógenos (BHATTACHARYYA; JHA, 2012).

Os fungos estão entre os maiores e mais diversos organismos fitopatógenos de solo, e dentre eles o gênero *Rhizoctonia* é caracterizado por causar perdas econômicas em diversas culturas. No Brasil, existem atualmente 47 fungicidas de origem química registrado no Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (AGROFIT) para o controle de *R. solani* em soja, no qual visa em sua maioria o tratamento das sementes. Alguns estudos têm apresentado microrganismos que se demonstraram eficientes na inibição do fitopatógeno. Dentre os microrganismos estudados encontram-se fungos do gênero *Tricoderma* (DIAS, 2013) e diversas bactérias isoladas do solo como rizobactérias (LUCON, 2013) e actinobactérias (GOUDJAL, 2014).

No entanto, mesmo que seja demonstrado ser uma alternativa viável, muito ainda precisa ser feito para que esses microrganismos de fato sejam empregados. Portanto, o melhor entendimento do modo de ação e maneiras mais adequadas para a aplicação de tais organismos, pode contribuir com resultados mais eficientes quando reproduzidos em condições de campo.

3.5. Manguezais

Os manguezais, inicialmente definidos pelo naturalista britânico Alfred Russel Wallace (1878) como florestas de margens dos mares tropicais; são ecossistemas altamente produtivos e típicos de áreas estuarinas tropicais e subtropicais, cujas distribuições biogeográficas estão limitadas a regiões costeiras, apresentando-se como ambientes de transições entre as áreas terrestres, marinhas e de água doce (HOLGUN et al., 2001; GIRI et al., 2011). Podem ser encontrados em diversas condições ambientais, sendo localizados em enseadas, desembocaduras de rios, lagunas, às margens de baías e reentrâncias costeiras, onde ocorra o encontro de águas doces com a marinha (SCHAEFFER-NOVELLI et al., 2000).

A área total estimada dos manguezais é de 4,1 milhões de hectares, distribuídos em 123 países e territórios (SPALDING, COLLINS, 2010). As maiores extensões são encontradas na Ásia (42%), África (20%), América do Norte e Central (15%), Oceania (12%) e América do Sul (11%) (Figura 3). Cerca de 75% de toda extensão dos manguezais estão concentrados em apenas 15 países e nas Américas, onde 41% da área total estão acomodados na Indonésia, Brasil, Austrália e México (GIRI et al., 2011). O Brasil é considerado o segundo maior país que abriga esse ecossistema, representando 8,5 % da área

total encontrado no mundo (13.000 km²), atrás apenas da Indonésia com cerca de 20,9% (GHIZELINI et al., 2012; GIRI et al., 2011; SPALDING & COLLINS, 2010; ANDREOTE et al., 2012; GHOSH et al., 2010).

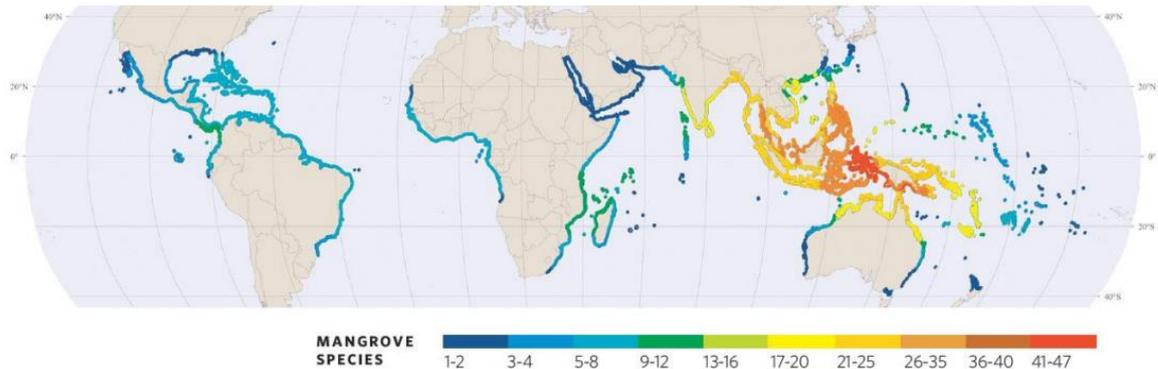


Figura 3. Distribuição global de mangues, e respectiva diversidade vegetal. Fonte: US Department of Commerce (2014).

No Brasil, os manguezais recobrem grande parte da costa nacional, banhando os litorais de 16 Estados (Figura 4). Sua distribuição estende-se desde a cidade de Cabo Orange, no Estado do Amapá, até a cidade de Laguna, localizada no Estado de Santa Catarina (Schaeffer-Novelli, 1995). Contudo, são relatadas apenas sete espécies arbóreas de ocorrência nos manguezais brasileiros, distribuídos em quatro gêneros: *Rhizophora*, *Avicennia*, *Laguncularia* e *Conocarpus* (SCHAREFFER-NOVELLI, 2000).



Figura 4. Distribuição das áreas de manguezais no Brasil, e as respectivas espécies vegetais encontradas. Fonte: US Department of Commerce (2014).

Os manguezais possuem grande importância na manutenção da biodiversidade marinha, fornecendo matérias orgânicas para áreas costeiras adjacentes que posteriormente irão atuar como fonte de nutrientes, sendo a base de uma extensa cadeia alimentar. Como complemento, os manguezais fornecem alimentos e abrigos para crustáceos, moluscos peixes e pássaros (Holguin et al., 2001), além de protagonizar o papel de berçário para algumas espécies (CUNHA-LIGNON et al., 2009). Segundo Spalding et al., (2010) Existem 9 ordens, 20 famílias, 27 gêneros e mais de 70 espécies de animais e vegetais associado aos manguezais no mundo.

Além dos aspectos na biodiversidade marinha, os manguezais desempenham um papel importante como barreiras de proteção contra catástrofes naturais (ciclones e tsunamis), além de evitar a erosão do solo pelas marés, reduzir o assoreamento dos portos e diminuir os impactos oriundos da lixiviação de compostos químicos (BAIRD et al., 2009; DAS et al., 2009). Estudos recentes apontam que os manguezais possuem níveis mais

elevados de produtividade primária quando comparadas as demais florestas tropicais e subtropicais. Mesmo em florestas de baixa estatura, sua biomassa pode ser elevada, devido a uma grande parte vegetal ficar abaixo do nível do sedimento (OTTONI, 2015). Contudo, esses fatores consorciados a capacidade de estocagem de carbono orgânico no sedimento, podem desempenhar um papel importante nas reduções das cotas de carbonos influenciando diretamente nas mudanças climáticas (SPALDING & COLLINS, 2010).

Dentre as principais características dos ecossistemas de manguezais estão relacionados a alta salinidade, elevado teor de matéria orgânica e a deficiência de alguns nutrientes, especialmente o nitrogênio e o fósforo (ALONGI et al., 1994; HOLGUIN et al., 1999). Esse ecossistema está sujeito a diversas variações em um curto período de tempo, passando por condições secas a alagadas em questão de horas, que podem ocasionar alterações nos teores de salinidade, na aeração do solo, na alteração do pH, entre outros. (BARKER, 2009).

As constantes mudanças presentes neste ecossistema, controlam diversos processos, como os ciclos biogeoquímicos os ciclos metabólicos e as dispersões microbianas, afetando uma complexa gama de interações que influenciam o ambiente (CADETE, 2014). As consequências destas mudanças são evidenciadas em diferentes comunidades, a exemplo das comunidades arbóreas dos manguezais, dotadas de estruturas especializadas como pneumatóforos e alterações nas raízes, que influenciam diretamente nas características dos solos (DIAS et al., 2011; LIMA et al., 2013). Essas plantas apresentam capacidade de tolerância à salinidade e fornecem ao ambiente nutrientes e oxigenação resultantes dos seus processos metabólicos (FERREIRA et al., 2007; KRAUS et al., 2014).

Assim como as comunidades arbóreas, as microbianas dispõem de adaptações necessárias para a sobrevivência neste ambiente, o que lhes confere vias metabólicas únicas (THATOI et al., 2013). Os microrganismos são responsáveis pelas maiores transformações de nutrientes dentro dos manguezais (HOLGUIN et al., 2001), sendo fundamentais na manutenção da produtividade e na conservação e recuperação de áreas impactadas (OTTON, 2010). A maior parte dos microrganismos presentes no mangue é constituída por bactérias e fungos (91%), seguidas de algas (7%) e protozoários (2%) (GHIZELINI et al., 2011).

Nos manguezais, os microrganismos são responsáveis por vários processos de transformações e ciclagem de nutrientes, sendo fundamentais para o funcionamento desse ecossistema. São associadas também aos processos de ciclagens do carbono, do enxofre e do nitrogênio; além de estarem envolvidos em processos fotossintéticos, na solubilização do

fosfato, redução de sulfato, e na produção de substâncias antibióticas ou enzimas de interesses comerciais (ABRAHAM et al., 2004; SANTOS et al., 2011; DIAS et al., 2012; TAKETANI et al., 2010; VARON-LOPEZ et al., 2014).

Neste contexto, as enzimas apresentadas por estes microrganismos apresentam um grande potencial, estando frequentemente relacionados a bioprocessos industriais, sendo constantemente necessárias a prospecção de novas estruturas que possam fornecer maiores versatilidades e vantagens processuais, além de impactar o mercado econômico com a competição de produtos (ADRIO & DEMAIN, 2014). A demanda crescente dos mercados por produtos derivados de bactérias levaram a exploração para os manguezais, expandindo as descrições de novos metabólitos, onde em 2014, foram possível a obtenção de 23 novas moléculas de interesse comercial, entre eles a Mangromicina A, exibindo uma potente atividade antitripanossômica e sequestrante de radicais (NAKASHIMA et al., 2014; SECCON, 2016). De toda a diversidade biológica bacteriana descrita, cerca de 45% possuem ação antibiótica, sendo que 38% foram obtidas de sedimentos (KELECOM, 2002). Isto faz com que os sedimentos marinhos sejam extremamente potenciais na prospecção de metabólicos oriundo de bactérias (SECCON, 2016).

Apesar de todas as importantes funcionalidades exercidas pelas atividades microbianas, suas diversidades taxonômicas e funcionais são pouco exploradas, estimando-se que apenas 5% da diversidade total tenham sido descritos (THATOI et al., 2013).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1.1. Coleta das amostras de solo

Amostras de solo foram coletadas em áreas de restinga, mangue seco, mangue molhado e mar aberto nos estados de São Paulo e Rio de Janeiro, consideradas com baixa influência humana. Em São Paulo, as amostras de solo foram obtidas no Parque Estadual Serra do Mar, núcleo Picinguaba, localizada na cidade de Ubatuba, litoral norte de São Paulo. No Rio de Janeiro as amostras foram coletadas na cidade de Paraty, litoral sul do estado. Para cada coleta, uma grama de solo foi colocado em tubos de ensaio contendo 9 ml de solução salina (0,85% NaCl), agitados por 5 minuto em agitador Vortex, a fim de promover a liberação e homogeneização da suspensão bacteriana. Em seguida, foram realizadas diluições em série até 10^{-4} . Alíquotas de 0,1 ml das últimas diluições foram plaqueadas em meios específicos para seleção de bactérias de acordo com Melo e Valarini, (1995), utilizando o meio Tryptone Soya Agar (TSA) para o isolamento de bactérias e o meio de Glucose Yeast (GY) para o isolamento de actinobactérias. Após o crescimento, os foram purificadas e mantidas em placas para análises posteriores. Um total de 157 bactérias foram isoladas e avaliadas quanto ao potencial para controle do fitopatógeno *R. solani*.

4.1.2. Isolamento de bactérias

Para o isolamento das bactérias, uma grama de solo foi colocado em tubos de ensaio contendo 9 ml de solução salina (0,85% NaCl), posteriormente foram agitados por 5 minuto em Vortex a fim de homogenizar a suspensão bacteriana. Em seguida, foram realizadas diluições em série até 10^{-4} . Alíquotas de 0,1 ml das últimas diluições foram plaqueadas em meios específicos para seleção de bactérias de acordo com Melo e Valarini (1995). Utilizou-se o meio Tryptone Soya Agar (TSA) para o isolamento de bactérias e o meio de Glucose Yeast (GY) para o isolamento de actinobactérias (Yang et al., 2008). Após o crescimento, os isolados foram purificadas e mantidas em estufas a 25°C.

4.1.3. Preparação dos meios de cultivo para o crescimento das bactérias

4.1.4. Tryptic Soy Ágar (TSA)

O Meio de cultivo Tryptic Soy Ágar (TSA) sólido foi enriquecido com Cloreto de sódio a 1%, e acrescentou-se os seguintes ingredientes:

• H ₂ O destilada	1000 mL
• Glucose monohidratada	2,5 g
• Cloreto de Sódio	15,0 g
• Hidrogenofosfato dipotássico	2,5 g
• Peptona de caseína	17 g
• Peptona de soja	3 g
• Ágar	15 g

Para o cultivo em meio sólido, os ingredientes foram colocados em frascos erlenmeyer de 1L e homogeneizados, esterilizado por 15 minutos a 120°C em autoclave. Posteriormente foram vertidos 20 mL em placas de Petri de acrílico, de 90X15 mm, em câmara de fluxo laminar. O meio solidificado foi armazenado em geladeira, com temperaturas de 6 a 10 °C. Para o cultivo em meio líquido, não houve a adição de Ágar, sendo todos os ingredientes colocados em frascos erlenmeyer de 250 mL e esterilizado conforme descrito.

4.1.5. Glucose Yeast (GY)

O Meio de cultivo Glucose Yeast (GY) sólido foi enriquecido com Cloreto de sódio a 1%, e acrescentou-se os seguintes ingredientes:

• H ₂ O destilada	1000 mL
• Glucose	10g
• Extrato de Levedura	10 g
• Ágar	15 g
• Cloreto de Sódio	10 g

Os ingredientes foram colocados em frascos erlenmeyer de 1L e homogeneizados, esterilizado por 15 minutos a 120°C em autoclave. Posteriormente foram vertidos 20 mL em

placas de Petri de acrílico, de 90X15 mm, em câmara de fluxo laminar. O meio solidificado foi armazenado em geladeira, com temperaturas de 6 a 10 °C. Para o cultivo em meio líquido, não houve a adição de Ágar, sendo todos os ingredientes colocados em frascos erlenmeyer de 250 mL e esterilizado conforme descrito.

4.2. Isolado do fungo *Rhizoctonia solani*

O isolado de *Rhizoctonia solani* de soja foi cedido pelo laboratório de Patologia de Sementes, localizado no Instituto Biológico de São Paulo - SP. O isolado está depositado na coleção de fungos fitopatogênicos do Instituto Biológico - Micoteca "Mário Barreto Figueiredo" credenciada pelo World Federation for Culture Collections (WFCC), sob o registro WDCM942.

4.2.1. Cultivo de *Rhizoctonia solani*

Para o cultivo do inóculo do fungo, em todos os tratamentos, foi utilizado o meio sólido BDA, incubado em estufas de crescimento por 3 dias a 25°C no escuro. Composição do meio sólido:

• H2O destilada	1000 mL
• Batata	200 g
• Dextrose	15 g
• Ágar	15 g

Os ingredientes foram colocados em frascos Erlenmeyer de 1L e homogeneizados, esterilizado por 15 minutos a 120°C em autoclave. Posteriormente vertidos 20 mL em placas de Petri de plástico, de 90X15 mm, em câmara de fluxo laminar. O meio solidificado foi armazenado em geladeira, até a inoculação do fungo.

4.2.2. Teste de patogenicidade em sementes de soja

Para avaliar o potencial patogênico do isolado fúngico sobre sementes de soja, foi realizado um teste de patogenicidade em condições *in vivo*. Para o teste foram estabelecidos

dois tratamentos, um caracterizado com a inoculação do fitopatógeno sobre as sementes de soja e o tratamento controle, sem a presença do fungo.

Os tratamentos foram constituídos por 6 repetições. Cada repetição foi representada por uma placa de Petri estéril contendo dois papéis filtro umedecidos e autoclavados com 5 sementes de soja desinfestadas superficialmente com álcool 70% (1 minuto), hipoclorito de sódio 2% (7 minutos), álcool 70% (1 minuto), seguido de três lavagens sucessivas com água destilada esterilizada.

Para a inoculação do fungo, foi adicionado em cada semente um disco de 5 mm de meio BDA contendo o crescimento micelial do fungo (3 dias de incubação sob 25°, no escuro), enquanto, para o tratamento controle foi adicionado apenas o meio de cultivo BDA (sem a presença do fungo). Os tratamentos foram armazenados em estufa incubadora BOD a 25°C no escuro, por período de 12 dias. Para a avaliação, as sementes foram verificadas a fim de encontrar evidências de necrose nos tecidos, escurecimento do tegumento e/ou a presença de micélios, provenientes do fitopatógeno. A severidade da doença foi avaliada utilizando escala de nota, seguindo o mesmo protocolo da escala diagramática do tópico 4.5.7. Como confirmação final de patogenicidade, o fitopatógeno foi re-isolados dos tecidos através da inoculação em meio BDA.

4.3. Avaliação prévia de bactérias por pareamento coletivo

Para a seleção prévia das bactérias com potencial antagônico ao crescimento micelial de *R. solani*, os isolados foram semeados em meio BDA, estriadas (1 cm) em quatro pontos (simulando os vértices de um quadrado), a três centímetros de distância do centro da placa de Petri, sendo que cada estria representou um isolado diferente de bactéria (Figura 5). Ao centro da placa, inoculou-se um disco de 0,5 cm de diâmetro do meio BDA contendo o micélio do isolado fitopatogênico de *Rhizoctonia solani* da soja. O experimento foi realizado em duplicatas e posteriormente incubados a 25°C no escuro. Placas sem a presença dos isolados de bactéria serviram como controle. A avaliação qualitativa foi realizada três dias após por meio da visualização do halo de inibição de crescimento micelial. Os isolados que permitiram o crescimento total do fungo não foram selecionados para posteriores avaliações.

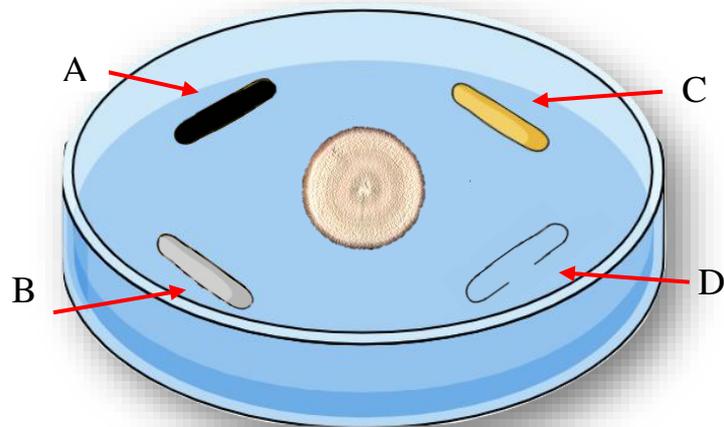


Figura 5. Ilustração das repetições. Cada letra representa uma bactéria diferente, estriadas por 1 cm, dispostas equidistantes. Ao centro um disco (5 mm) do micélio de *R. solani*.

4.3.1. Avaliação prévia de bactérias por pareamento único (singular)

Os 20 isolados com os maiores halos de inibição foram selecionados e avaliados quanto a atividade antagônica para *R. solani*. Para cada bactéria foram realizadas quatro repetições, sendo cada repetição constituída por uma placa de Petri (9 cm) contendo o meio BDA. Cada isolado selecionado foi estriado (1cm) em quatro pontos (simulando os vértices de um quadrado) da placa de Petri, a três centímetros de distância do seu centro (Figura 6). Posteriormente as placas foram incubadas por um dia a 25°C e, então, inoculadas no centro com um disco de micélio de *R. solani* (0.5 cm de diâmetro) após o crescimento da bactéria e posterior acúmulo de metabólitos no meio. As placas foram novamente incubadas a 25°C no escuro. Como controle foram usadas placas sem os isolados de bactérias.

A avaliação foi realizada três dias após medindo-se o diâmetro do crescimento (mm) micelial do fungo *R. solani*. Em seguida foi determinado as porcentagens de inibições com base na fórmula:

$$PI = \frac{C}{C-T} \times 100$$

Onde:

PI, Porcentagem de Inibição; C, crescimento em milímetros de *R. solani* na ausência de bactérias; T, crescimento em milímetros de *R. solani* na presença de bactérias.

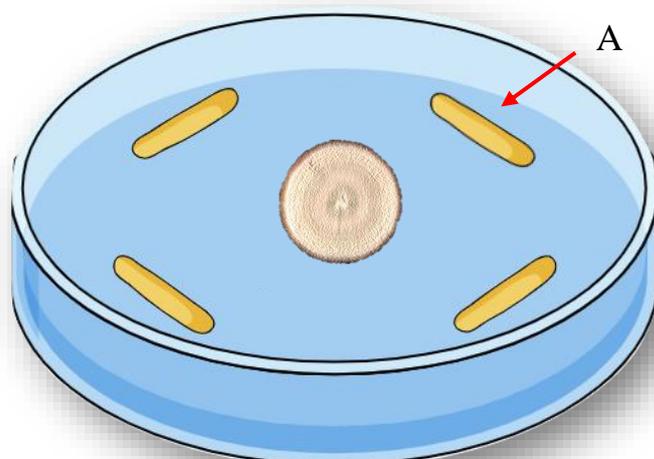


Figura 6. Ilustração da repetição. Em A é possível ilustrar o isolado bacteriano, disposto em quatro estrias (1 cm) equidistantes. Ao centro um disco (5 mm) do micélio de *R. solani*.

4.3.2. Avaliação de bactérias por incorporação dos metabólitos no meio de cultura

Os quatorze isolados bacterianos que apresentaram maiores porcentagens de inibição de *R. solani*, selecionados no experimento anterior, foram avaliados quanto a atividade dos seus metabólitos secundários no crescimento micelial de *R. solani*. Os isolados foram cultivados em Erlenmeyer contendo 150 mL do meio de cultivo GY, mantidos sob agitação de 150 rpm por 6 dias.

Para a extração dos metabólitos secundários, livres de células, os caldos de crescimento bacterianos foram centrifugados a 3800 rpm durante 2 hs em tubos Falcon, contendo 50 mL do caldo de cultivo. Posteriormente, os sobrenadantes foram filtrados em filtros de celulose (porosidade 0,2 μm) com o auxílio de bomba a vácuo.

Cada isolado de bactérias foi testado em três concentrações diferentes dos seus filtrados, de 10%, 30% e 50%. Para cada tratamento foram realizadas 10 repetições, sendo cada repetição constituída de uma placa de Petri contendo o meio de cultivo BDA adicionado da respectiva concentração dos filtrados. Cada placa de Petri foi inoculada, no centro, com um disco de micélio de *R. solani* (0,5 cm de diâmetro), e incubada a 25°C no escuro. Como controle, o meio BDA foi adicionado apenas do meio de cultivo GY nas concentrações de 10%, 30% e 50%.

A avaliação foi realizada após três dias, quando o fungo no tratamento controle ocupou toda a área do meio de cultura, com base na medição do diâmetro do crescimento micelial (cm). O experimento foi conduzido duas vezes no tempo.

4.3.3. Avaliação de bactérias por dois métodos de aplicação do caldo de cultivo em sementes de soja – Teste de laboratório

As bactérias selecionadas no teste anterior, as quais apresentaram as maiores porcentagens de inibição micelial na menor concentração dos filtrados (10%), foram avaliadas quanto a eficácia para inibição de *R. solani* em sementes de soja (variedade BMX Potência – Embrapa), mediante 2 métodos de aplicação, mergulhando a semente nas culturas das bactérias por 60 minuto, e revestindo a semente com a cultura da bactéria emgrossada pela adição de goma xantana (4%).

Para cada método de aplicação, foram estabelecidos 14 tratamentos representados pelos isolados PR02, PR10, PR28, MA07 e MA08, e pelas testemunhas H2O e meio GY, todos os tratamentos testados com e sem o fungo *R. solani*.

Para cada tratamento foram realizadas três repetições, sendo cada repetição representada por uma placa de Petri contendo dois papéis filtros previamente esterilizados e umedecidos, com 5 sementes cada.

As bactérias foram produzidas dentro de frascos Erlenmeyer contendo o meio líquido (GY), mantidos em agitação de 150 rpm por 6 dias no escuro. Após esse período, sementes de soja foram previamente desinfestadas com álcool 70% (3 minutos), hipoclorito de sódio 2% (7 minutos), álcool 70% (1 minuto), seguido de três lavagens sucessivas com água destilada esterilizada. Após a desinfestação, as sementes foram tratadas com as bactérias por dois métodos de aplicações: mergulhadas no caldo de crescimento bacteriano por uma hora, e revestidas pela mistura da cultura bacteriana com o fixador goma xantana (4%). Para ambos os métodos de aplicação, foi usado a concentração de 10% dos caldos bacterianos, diluídos em meio de cultivo GY. Após a aplicação das bactérias, metade das sementes foram inoculadas com 1 disco de 5 mm do micélio de *R. solani*. Sementes sem micélio do fungo foram utilizados como tratamento controle.

As placas foram incubadas em câmara climatizada a 25°C, no escuro, até ocorrer a formação das radículas no grupo controle.

A avaliação foi realizada 12 dias após com base na severidade da doença, expressa por uma escala de incidência da doença ou dano (Figura 7), de:

100% - Semente sem nenhuma emissão de radícula;

66,66% - Semente com início de emissão de radícula e com necrose;

33,33% - Semente com emissão completa de radícula, mas com necroses;

0% - Semente com emissão completa de radícula e sem necroses.



Figura 7. Índices de danos/doença em sementes de soja. A- 100%, sem emissão de radícula pela semente; B- 66,66%, sementes com emissão de radícula necrosada; C- 33,33%, sementes com emissão de radícula completas, mas com necrose; D – 0%, sementes com emissão de radícula completa sem necroses.

O experimento foi conduzido duas vezes no tempo, considerando as mesmas condições de montagens e avaliação.

4.3.4. Avaliação de bactérias por dois métodos de aplicação do caldo de cultivo em sementes de soja – Teste em casa de vegetação

Esta etapa teve por objetivo avaliar o potencial de controle dos isolados PR02 e PR10 em condições de casa de vegetação, utilizando dois métodos de aplicação dos caldos bacterianos. Foram estabelecidos 12 tratamentos (tabela 2) representados pelas duas bactérias e pelo meio GY, aplicados por dois métodos diferentes, todos esses tratamentos com e sem a inoculação do fungo *R. solani*.

O fungo foi cultivado em substrato areno-orgânico (1:3) com 2% de farelo de aveia (p/v) e 20 % de umidade, previamente autoclavado (FENILE, 1999). O substrato foi adicionado de 1 % da torta de mamona (*Ricinus communis*.) como fonte de matéria orgânica e distribuídos em frascos de 50 mL. A superfície do substrato foi inoculada com três discos do crescimento micelial de *R. solani* obtidos de culturas em meio BDA. Os frascos foram tampados com papel alumínio e incubados a 25°C por 7 dias no escuro até ocorrer o total crescimento do fungo. Posteriormente, vasos plásticos de 500 mL foram preenchidos com 300 ml de substrato areno-orgânico Vivatto Pro® e incorporados com 10% do inóculo (p/v - peso por volume do

substrato), exceto para o grupo controle. Para a colonização do fitopatógeno ao solo, estabeleceu-se o período de 7 dias antes da instalação do experimento. Os vasos inoculados com o fungo foram mantidos em casa de vegetação por 7 dias, irrigados três vezes ao dia.

Após a colonização do fitopatógeno nos vasos, as sementes foram desinfestadas superficialmente conforme descrito anteriormente. Posteriormente as sementes foram tratadas com o caldo bacteriano diluído a 10% em meio, por dois métodos de aplicação. Em um método, a bactéria foi aplicada no substrato, sobre a semente, adicionando-se 20 mL/vaso (tendo como base a aplicação no campo de 200 L/ha). Em outro método, as sementes foram mergulhadas em 250 mL do caldo bacteriano (10%), dentro de um Erlenmeyer, e mantidas em agitação de 150 rpm por 1 hora. Para testemunha foi utilizado apenas água.

Os vasos foram mantidos em casa de vegetação com temperaturas variando de 19°C a 30°C por 21 dias. Os ensaios foram irrigados por aspersão três vezes ao dia, por 15 minutos cada. A avaliação foi realizada após uma semana com base na porcentagem de germinação (% plantas emergidas), e 21 dias após com base na porcentagem de plantas sobreviventes. O experimento foi conduzido duas vezes no tempo, considerando as mesmas condições de montagens e avaliação.

4.4. Identificação molecular dos isolados de interesse

4.4.1. Extração do DNA genômico bacteriano

A partir das amostras previamente isoladas, foi realizada extração do DNA genômico utilizando o kit de purificação de DNA genômico Wizard (promega), de acordo com as instruções do fabricante. Seguindo o protocolo, 1ml da cultura de células bacterianas, foi centrifugada por 2 minutos a 13,000- 16,000 x g*, para obtenção do pellet. O sobrenadante foi descartado. Essa configuração de centrifugação foi a mesma para todas as centrifugações posteriores.

O pellet obtido foi ressuspenso em 480ul de EDTA 50mM, onde foi adicionado 120ul de enzimas líticas. A solução foi incubada à 37°C por 60 minutos, e então centrifugadas para formação do pellet. Novamente o sobrenadante foi descartado.

Para lise das membranas celulares, foi adicionado 600ul da solução “Nuclei Lysis”, incorporado ao pellet pelo movimento de *up and down*, gentilmente com a pipeta. Após homogeneização, o material foi incubado por 5 minutos à 80°C, e depois resfriado até atingir temperatura ambiente.

Em seguida foi adicionada 3ul de solução de RNase, homogeneizado e incubado a 37°C por 15 minutos, e então resfriado novamente até a temperatura ambiente.

Para a etapa de precipitação das proteínas, foi adicionado 200ul da solução de precipitação proteica. A solução resultante foi homogeneizada no vórtex, incubada no gelo por 5 minutos e centrifugada novamente por 3 minutos.

A última etapa da extração, consistiu na precipitação do DNA e reidratação. Para tal, o sobrenadante formado na etapa anterior, foi transferido para um novo tubo contendo 600ul de isopropanol em temperatura ambiente, o qual foi homogeneizado e mais uma vez centrifugado. O sobrenadante foi descartado, e foi adicionado 600ul de etanol 70%. Mais uma vez o material foi centrifugado para separação do etanol. Os sobrenadantes foram secados por 15 minutos. Por fim, foi realizada a reidratação do pellet, com 100ul da solução de reidratação do kit por 1 hora a 65°C e overnight a 4°C.

4.4.2. Amplificação dos genes 16S rRNA

Para amplificação do gene 16S rRNA, foram utilizados os primers: pA “Foward” (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG -3') e pc5B “Reverse” (5'-TAC CTT GTT15 ACG ACT T-3') recomendados por KUSKE et al., (1997). A reação de PCR foi feita com volume de 25µL (dNTPs de 2,5mM; tampão 10x com MgCl₂; iniciadores (5pmoles/µL, Taq DNA polimerase 5U/µL) e DNA bacteriano na concentração entre (10-30ng). A amplificação foi realizada no equipamento termociclador Biocycle, com os seguintes ciclos de temperatura: desnaturação a 95°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos com desnaturação do template a 95°C por 1h40 segundos; anelamento dos iniciadores a 58°C por 40segundos, extensão a 72°C por 2 minutos e extensão final de 72°C por 5 minutos. Após a reação de amplificação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8%. Por fim foram coradas com 0,5 µg/ mL de brometo de etídeo e fotografadas sob luz UV em fotodocumentador (Bio Agency 302 nm UV) para verificação do tamanho e concentração dos fragmentos 16S rRNA amplificados.

4.4.3. Purificação das amostras

Os fragmentos de DNA amplificados na reação de PCR, foram purificados utilizando kit GFX PCR DNA Kit (GE HealthCare), de acordo com as recomendações do fabricante. Foram utilizados para purificação 50 µL de produto de PCR e, ao final da purificação o precipitado foi ressuspensionado em 20 µL de água. O material obtido neste experimento foi utilizado na reação de sequenciamento.

4.4.4. Sequenciamento e análise das sequências

Para sequenciamento do DNA, foram utilizados 2ul do DNA purificado na etapa anterior, 2ul de cada primer, 2ul de tampão 5X (Tris-HCl 1M; MgCl₂ 1M) e 0,3μL de ABI BigDye (do kit de reação BigDye Terminator Cycle Sequencing Applied Biosystems). A solução final foi amplificada em termociclador (Applied Biosystems, 3500 Genetic Analyzer), onde passou por 25 ciclos de desnaturação a 96°C por 10 segundos; anelamento a 50°C por 15 segundos e extensão a 60°C por 1h20 minutos. Após a reação de sequenciamento foi feita a precipitação dos produtos seguindo o protocolo de EDTA, onde foi adicionado 32,5 μL de mix EDTA (2.5 μL EDTA 125mM; 30μL de Etanol 100%), em seguida o material foi agitado por inversão e centrifugado durante 25 minutos em 2500 rcf a 4°C. Por fim, o excesso de etanol foi retirado e substituído por 30μL de etanol 70%. Novamente o material foi centrifugado por 15 minutos em 1450 rpm a 4°C, e incubado em estufa durante 15 minutos a 37°C. Após a incubação, o material foi ressuspensionado em 10 μL de formamida e homogeneizado por vórtex. O DNA foi desnaturado mais uma vez em termociclador a 95°C durante 1 minuto. Ao final as amostras foram submetidas à eletroforese capilar em sequenciador (3500 Genetic Analyzer-Applied Biosystems).

4.4.5. Análises por Bioinformática e análise filogenética

Após a obtenção das sequências, foi feita uma busca comparativa no banco de genomas bacterianos depositados no “GeneBank” utilizando a ferramenta BLASTn do “National Center for Biotechnology Information”(NCBI). Para avaliar a proximidade dos isolados deste trabalho com outros grupos bacterianos, foi feito um alinhamento em conjunto das sequências dos isolados obtidos juntamente com sequências de estirpes de referência obtidas no Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). O alinhamento destas sequências foi realizado utilizando o programa MEGA X (KUMAR et al., 2018) através da ferramenta ClustalW (THOMPSON *et al.*, 1997).

A análise filogenética foi realizada a partir do alinhamento das sequências obtidas no banco de dados Eztaxon (CHUN, 2007), e montagem da árvore filogenética dos isolados bacterianos, através do programa MEGA X (KUMAR et al., 2018), utilizando-se o método de distância Neighbor-joining (Saitou & Nei, 1987), com valores de *bootstrap* calculados a partir de 1.000 re-amostragens, o qual gera uma árvore a partir de matrizes de distâncias, agrupando sequências vizinhas. Como *outgroup* foi selecionada a sequência da actinobactéria *Saccharopolyspora spinosa* (DSM44228), para melhor agrupamento. A matriz de distância foi

calculada com o modelo Kimura (1980). Por fim, as distâncias das linhas evolutivas foram realizadas através da análise de Pairwise (Stackebrandt & Goebel, 1994).

4.5. Análises estatísticas dos dados.

Para o teste *in vitro* de seleção dos isolados, os dados foram transformados pela equação $\arcsen \sqrt{X}/100$, sendo X o valor de inibição de repetição por tratamento. O programa utilizado foi o SISVAR, versão 5.6. Os dados transformados posteriormente foram analisados com o teste de Scott-knott a 5% de significância.

Para o teste *in vitro* incorporando o metabolito no meio, todos os dados de inibição obtidos em relação ao controle foram transformados pela equação $\arcsen \sqrt{X}/100$, sendo X o valor de inibição de repetição por tratamento. A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o programa SPSS, versão 11. Onde o teste de Tukey a 5% foi empregado para comparação das médias dos tratamentos.

Para a análise das porcentagens nos experimentos *in vivo*, os dados foram transformados pela equação $\arcsen \sqrt{X}/100$, sendo X o valor de inibição de repetição por tratamento. O programa utilizado foi o SPSS, versão 11. Os dados transformados foram posteriormente analisados pelo teste de Tukey a 5% para comparação das médias dos tratamentos, exceto para os dados de peso de plantas cujo teste aplicado foi Scott-knott a 5% de significância.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Isolamentos de microrganismos

No total foram isoladas 157 bactérias provenientes de diferentes ambientes do litoral paulista e carioca, sendo 24% originadas do mangue molhado, 30% do mangue seco, 14% do mar aberto e 32% da restinga (Tabela 1). A seleção das bactérias ocorreu com base apenas em características morfológicas, sendo purificadas aquelas que apresentaram colônias com crescimentos distintos nas placas.

Tabela 1. Quantidade de microrganismos isolados nas diferentes regiões de coleta das amostras. As regiões correspondem respectivamente as áreas de coletas; MM, Mangue Molhado (Paraty-RJ); MS, Mangue Seco (Paraty-RJ); MA, Mar Aberto (Paraty-RJ) e PR, Picinguaba Restinga (Picinguaba- SP).

Local	Regiões	Bactérias	Actinobactérias	Total	Total regiões /total coletado
Paraty - RJ	MM	28	9	37	24%
	MS	37	10	47	30%
	MA	22	0	22	14%
Picinguaba -SP	PR	33	18	51	32%

As bactérias isoladas foram distribuídas em dois grupos, um de bactérias e outro de actinobactérias (Figura 8), mas não representam a diversidade do solo, já que apenas fenótipos de colônias com características de crescimento diferentes foram selecionadas. Segundo AMANN et al. (1994), apenas 10% das bactérias presentes no solo são cultiváveis em meios artificiais.

Para identificar as actinobactérias, foram observadas as características macroscópicas essenciais desse grupo (GOODFELLOW, 2012) como crescimento lento, aparência seca, e aderida ao ágar. (GOODFELLOW et al., 1983). As actinobactérias são microrganismos unicelulares procariontes Gram-positivos, colonizando também ambientes extremos, podendo ser heterotróficas ou quimiotróficas. Podem ser acidófilas, alcalófilas e halófilas. (KONEMAN et al., 2008). As bactérias e as actinobactérias isoladas do mangue são provavelmente halófilas, pois os locais de coleta das amostras possuem alta salinidade.

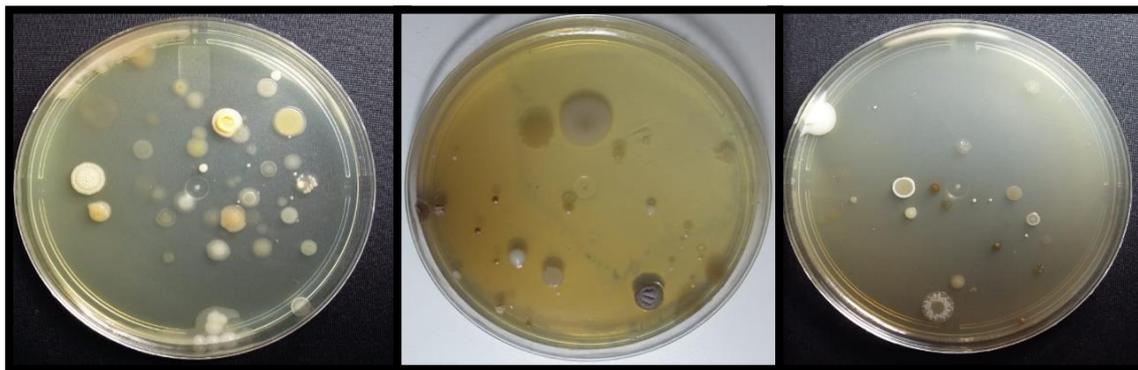


Figura 8. Diversidade morfológica do crescimento de colônias em plaqueamento das amostras de solo nas diluições de 10^{-5} . Fonte: Ana Gabriele B. CASTELANI (2017).

5.2. Patogenicidade de *Rhizoctonia solani* para sementes de soja

O isolado de *R. solani* colonizou 100% das sementes em todas as repetições do tratamento inoculado. As sementes apresentaram evidências de necrose dos tecidos, escurecimento do tegumento e presença de micélios, indicando incidência da doença. O fungo afetou principalmente o início da germinação, colonizando totalmente as sementes e impedindo-as de produzir radículas. Para confirmação da patogenicidade, sementes colonizadas foram dispostas sobre meio de cultivo BDA, resultando em crescimento micelial marrom, com hifas septadas e ramificadas a 90°, características morfológicas do patógeno do gênero *R. solani*. (GOULART, 1997).

As sementes não inoculadas (controle) apresentaram radículas completas com emissão de radículas, sem sintomas de necrose ou evidências da colonização do fungo (Figura 9). Assim, os postulados de Koch foram cumpridos no presente experimento.



Figura 9. Teste de patogenicidade com *Rhizoctonia solani* em sementes de soja. Em A tratamento controle, sem adição do fungo; Em B, sementes com adição do disco de crescimento micelial de *R. solani*, demonstrando sinais de colonização fúngica e sintomas da doença.

5.3. Avaliação prévia de bactérias por pareamento coletivo

Todos os 157 isolados obtidos foram avaliados a fim de identificar o potencial antagonico para *R. solani*, sendo selecionadas 16 bactérias e 4 actinobactérias. Desses 20 isolados de bactérias oriundos de diferentes ambientes, 19% foram originadas do mangue molhado, 4,3% do mangue seco, 9,1% do mar aberto e 17,6% da restinga (Tabela 2).

Segundo Canova (2009), a proximidade dos vegetais com o mar pode modular as comunidades de actinobactérias presentes nos solos devido ao aumento das concentrações de salinidade do local.

Tabela 2. Microrganismos que apresentaram inibição do patógeno quando submetidos a técnica de confrontamento direto em placa.

Origem		Isolado
Mangue Molhado (Paraty- RJ)	MM02	Bactéria
	MM03	Bactéria
	MM05	Bactéria
	MM08	Actinobacteria
	MM09	Actinobacteria
	MM11	Bactéria
	MM13	Bactéria
Mangue Seco (Paraty- RJ)	MS02	Bactéria
	MS11	Actinobacteria
Picinguaba Restinga (Picinguaba-SP)	PR02	Bactéria
	PR03	Bactéria
	PR10	Bactéria
	PR22	Bactéria
	PR23	Bactéria
	PR28	Bactéria
	PR45	Bactéria
	PR30	Actinobacteria
PR04	Bactéria	
Mar aberto (Paraty- RJ)	MA07	Bacteria
	MA08	Bacteria

5.4. Avaliação prévia de bactérias por pareamento único (singular)

O isolado PR02 apresentou a maior porcentagem de inibição (71%), diferindo significativamente dos demais isolados (Figura 10) ($F_{24, 239}=68,841$; $P < 0.001$). Os isolados de bactérias MM08, MM05, MM11 PR22, PR23 e PR28 e MM02 apresentaram inibição do crescimento fúngico variando de 66,7% a 51,7%, formando três grupos que diferenciaram entre si ($F_{24, 239}=68,841$; $P < 0.001$). Já as bactérias PR10, PR04, MA07, PR30, PR45 e MA08 apresentaram índices de inibição abaixo de 50 e acima de 40%, formando dois grupos que diferenciaram entre si ($F_{24, 239}=68,841$; $P < 0.001$).

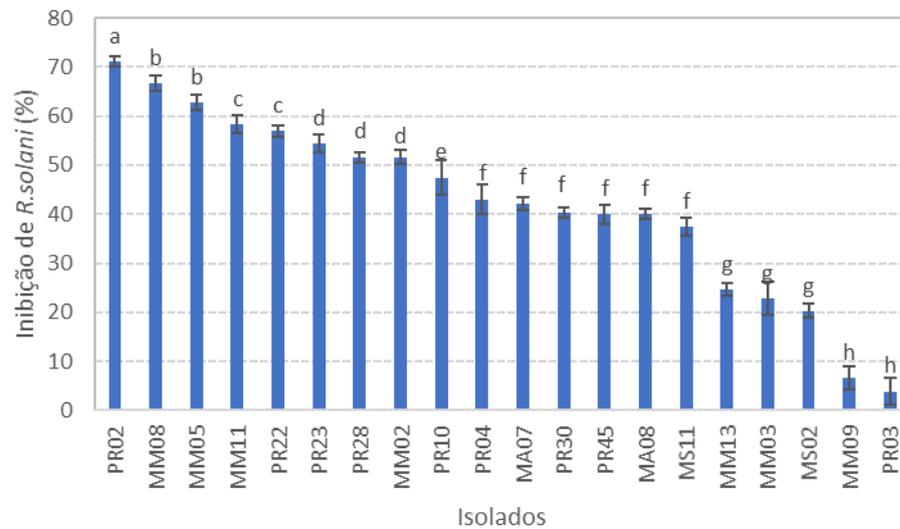


Figura 10. Taxa de inibição do crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* por ação de bactérias e actinobactérias oriundas do litoral de São Paulo e Rio de Janeiro. PR=restinga, MS=mangue seco, MM=mangue molhado, MA=mar aberto. *As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

O perfil heterogêneo de inibição apresentado pelos isolados sugere uma diversificação de espécies atuando nesse patógeno. As formas de atuação dos microrganismos podem diferir entre si, pois produzem metabólitos secundários, compostos voláteis e outros mecanismos de defesa. A diferente coloração apresentada pelo fungo em condições de estresse (Figura 11) pode estar relacionada à liberação de metabólitos secundários pelas bactérias testadas, no combate ao agente estressor. Segundo ETHUR (2001), compostos não voláteis resultantes do metabolismo de *Trichoderma spp.* são evidenciados pela coloração escura no meio.

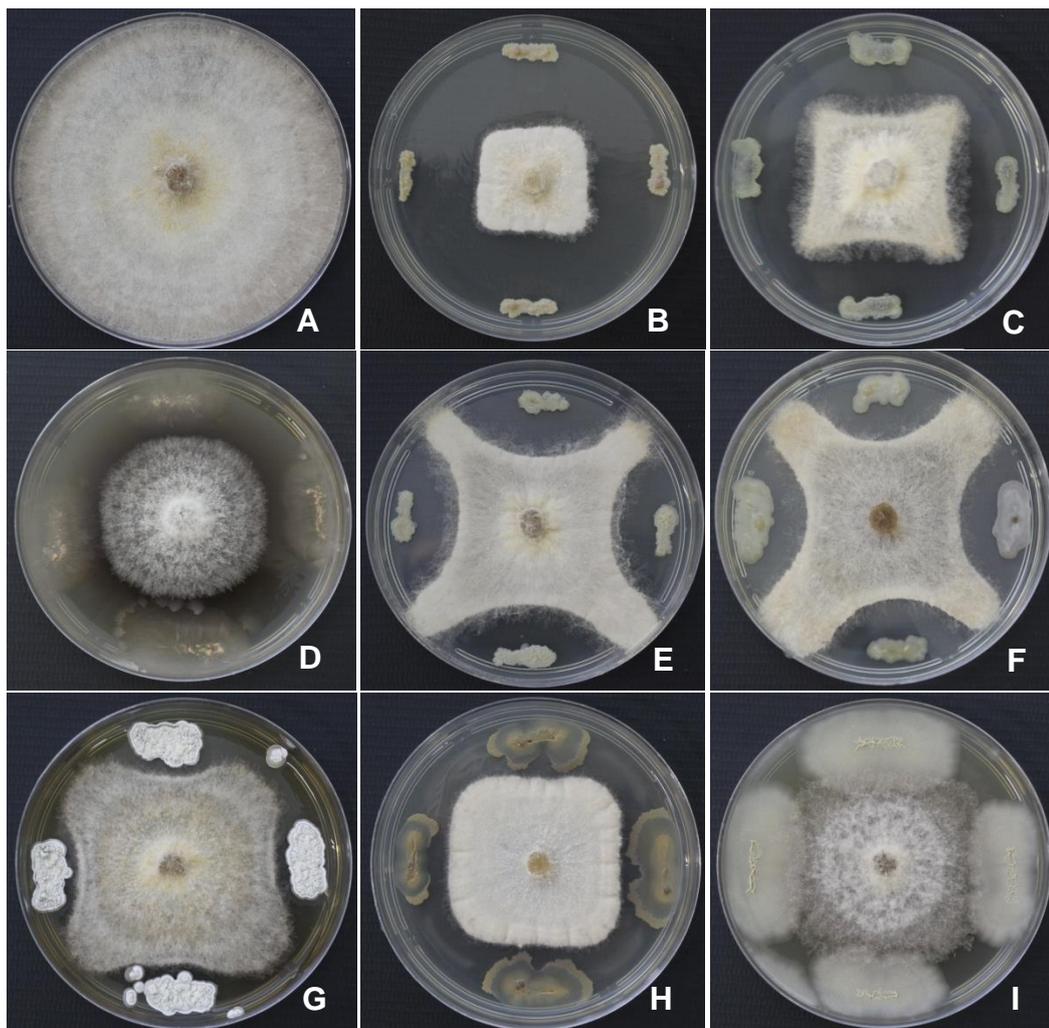


Figura 11. Inibição do crescimento micelial de *Rhizoctonia solani*, por ação de bactérias oriundas do solo das regiões litorâneas de Picinguaba-SP e Paraty-RJ. (A) Tratamento controle; (B) PR02; (C) PR22; (D) PR23; (E) PR28; (F) PR45; (G) MS11; (H) MM02 e (I) MA08.

Lucon (2013) avaliou a inibição micelial de *R. solani* em plantas de pepinos com a aplicação de rizobactérias, tendo obtido no máximo 5,7% de inibição, resultado inferior ao obtido no presente trabalho (71%).

Estudos com bactérias provenientes do mangue foram realizados por Canova (2009) para o controle de fitopatógenos, tendo 75% das actinobactérias promovido a inibição micelial total do fungo *Phytophthora alphanidermatum* e *Phytophthora* sp.

CORRÊA et al (2010) verificaram que bactérias isoladas de manguezais permitiram a sobrevivência de plântulas de pepinos (71%) quando infectadas com o fungo *Pythium alphanidermatum*, indicando potencial para o uso no controle biológico.

O efeito antagônico exercido por bactérias sobre patógenos pode ser caracterizado por diferentes mecanismos como a competição por nutriente e espaço, síntese de compostos voláteis, sínteses de substâncias antifúngicas e antimicrobianas, secreção de enzimas líticas e alteração do pH (DE SOUZA et al., 2015). O efeito antagônico das actinobactérias são provenientes de sua capacidade de produzir compostos antibióticos, antifúngicos, enzimas extracelulares como quitinases, peroxidases, glucanases, terpenóides, entre outros (ANDRADE,2016).

5.5. Avaliação de bactérias por incorporação dos metabólitos no meio de cultura

Os 14 isolados testados apresentaram uma grande variação na porcentagem de inibição do crescimento fúngico de *R. solani*, demonstrando todos eles uma taxa de inibição progressiva conforme o aumento da concentração dos filtrados, com exceção do isolado PR02 que se manteve constante em 100% desde a menor concentração (10%), e dos isolados MM08 e MM09, que apresentaram uma queda de inibição na concentração de 50% dos filtrados (Tabela 3).

Para o ensaio com 10% dos filtrados bacterianos, os isolados PR02, PR28, PR10, MA07 e MA08 apresentaram atividades de inibição do crescimento acima de 50%, sendo os isolados PR02 e PR28 responsáveis pelas maiores inibições, de 100% e 74%, respectivamente, diferenciando-se significativamente entre si e dos demais isolados ($F_{13, 139}=90,538$; $P < 0.001$). Em contrapartida, os isolados MS11 e MM09 apresentaram as menores atividades inibitórias, diferenciando significativamente dos demais isolados ($F_{13, 139}=90,538$; $P < 0.001$) mas não entre si.

A estabilidade apresentada pelo isolado PR02, com inibição de 100% desde a menor concentração (10%), pode estar relacionada a produção de metabólitos secundários com uma ou mais propriedades antifúngicas, que favoreçam os mecanismos de defesa da bactéria, resultando em um alto poder inibição. Resultados semelhantes de inibição foram obtidos por Lingyun Hao, et al (2019) quando filtrados de rizobactérias extraídas dos manguezais foram avaliadas para o controle de *Alternaria solani*, fitopatógeno de tomate. Os filtrados foram inoculados em diferentes concentrações, proporcionando uma taxa de inibição média de 40 % nos ensaios *in vitro* utilizando a menor concentração (5 µg / ml), não diferenciando-se das maiores concentrações avaliadas. Os componentes ativos do filtrado utilizado, foram identificados por meio da cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa com

analisador por tempo-de-voo (LC-qTOF-MS), sendo possível identificar dois compostos antifúngicos Alteramida A e Fator Antifúngico Estável ao Calor (HSAF).

Tabela 3. Porcentagens de inibição *in vitro* do crescimento micelial de *R. solani* com a adição de 10%, 30% e 50% dos filtrados bacterianos.

Isolados	Inibição do crescimento micelial em diferentes concentrações (%)		
	[10%]	[30%]	[50%]
MA07	56 ± 0,82 bc	71 ± 1,22 cd	86 ± 2,54 b
MA08	60 ± 1,54 bc	65 ± 1,37 d	66 ± 0,73 ef
MM03	46 ± 0,74 c	49 ± 0,42 ef	59 ± 0,79 f
MM05	8 ± 2,98 d	51 ± 1,22 e	56 ± 1,16 f
MM08	44 ± 3,99 c	78 ± 0,91 bc	75 ± 1,01 cde
MM09	1 ± 0,0 e	4 ± 2,06 g	3 ± 1,78 h
MM13	44 ± 0,57 c	75 ± 0,87 bc	100 ± 0,00 a
MS11	0 ± 0,0 e	1 ± 0,94 g	13 ± 1,16 g
PR02	100 ± 0,0 a	100 ± 0,0 a	100 ± 0,00 a
PR04	20 ± 1,92 d	49 ± 0,90 e	56 ± 2,43 f
PR10	58 ± 8,17 bc	84 ± 0,68 b	81 ± 1,27 bc
PR22	11 ± 2,40 d	39 ± 3,18 f	56 ± 1,21 f
PR23	46 ± 5,15 c	49 ± 2,59 e	71 ± 1,44 de
PR 28	74 ± 4,10 b	79 ± 1,57 bc	80 ± 1,00 cd

Médias seguidas por letras distintas nas colunas diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Os compostos com atividades antifúngicas possuem em geral dois modos de ação, fungicida ou fungistático, sendo esse último diferenciado pelo fato do fungo ser capaz de retomar seu crescimento após a remoção do composto (Ali et al, 2016). No trabalho realizado por Lingyun Hao, observou-se que o extrato bruto de actinomicetos afeta o tubo germinativo dos conídios, mas não tem efeito sobre a germinação dos conídios, com um modo de ação fungistático,

A produção de compostos antifúngicos é um dos principais mecanismos utilizado para o controle de fitopatógenos, sendo eles produzidos na forma de voláteis e não voláteis (Cazar et al., 2005). Segundo Hamzah et al (2018), um dos métodos mais simples e eficazes para identificar agentes antagônicos é o emprego de ensaios utilizando compostos não voláteis. Com base no presente estudo, é evidente que os compostos produzidos apresentaram atividades

inibitórias sobre *R. solani*, causando a redução do crescimento micelial em diferentes concentrações dos filtrados.

Durante o ensaio foi possível observar a formação de pigmentação marrom escura pelas hifas *R. solani* quando em contato com os filtrados dos isolados antagônicos, enquanto que no tratamento controle as colônias apresentaram coloração castanho-claro. Segundo Isaac et al (1994), em condições naturais, a escassez de nutrientes induz os micélios fúngicos a mudarem suas atividades bioquímica para as vias do metabolismo secundário que se manifestam como pigmentações. Tais pigmentações já foram descritas por Hamzah et al (2018), observando que os isolados fitopatogênicos *Xylaria* sp e *Fusarium solani* apresentaram pigmentações quando submetidas em cultura mista, na presença de microrganismos antagônicos.

Há uma variedade de pigmentos produzidos por fungos, incluindo carotenóides, melaninas, flavinas e fenazinas (Mapari et al., 2010 ; Dufossé et al., 2014). A produção dos pigmentos tem como função a proteção dos micélios afim de impedir a hidrólise proveniente de enzimas produzidas pelos agentes antagônicos.

5.6. Identificação molecular dos isolados de interesse

Os sete isolados PR02, PR10, PR28, MA07, MA08, MM02 e MM13 que proporcionaram as maiores inibições do fungo in vitro, na menor concentração (10%), foram selecionados para sequenciamento molecular do gene ribossomal 16S (Tabela 4) afim de identifica-los a nível de gênero e espécie.

Tabela 4. Relação dos isolados selecionados para serem identificados molecularmente, com seus respectivos locais de coleta.

Isolados	Local de Coleta
<i>PR02</i> <i>PR10</i> <i>PR28</i>	Picinguaba Restinga (PR)
<i>MA05</i> <i>MA07</i>	Mar Aberto (MA)
<i>MM02</i> <i>MM13</i>	Mangue Molhado (MM)

As sequências apresentaram uma taxa de similaridade que variou entre 99.5 a 100% de identidade em relação as depositadas no banco de dados do NCBI (Tabela 5). Os isolados originados da restinga, PR10 e PR28, apresentaram a mesma sequência genética do rRNA 16S sendo, portanto, espécie idênticas e 100% emparelhadas com *Burkholderia cepacia* (Figura 12). Já o isolado da restinga PR02, também foi identificado como *Burkholderia*, mas emparelhando-se na espécie *B. glumae* (Figura 13), com 99,24% de similaridade. Em relação aos isolados do mar aberto, MA07 e MA08, também apresentaram ser 100% idênticos, tratando-se da espécie *Pseudomonas aeruginosa*, com 100% de similaridade. Os isolados do mangue molhado, MM02 e MM13, foram identificados como pertencentes ao gênero *Bacillus*, tratando-se respectivamente das espécies *B. megaterium* e *B. altitudinis* (Figura 14), respectivamente, também com 100% de similaridade.

Tabela 5. Sequências dos isolados no Genbank compatíveis com as obtidas no presente trabalho, através da análise BLAST do rRNA 16S.

Isolado	Família	Gênero e Espécie	Tamanho do fragmento rRNA16S (pb)	Cobertura (%)	Identidade (%)	Sequência do Genbank com maior similaridade (N° Acessos)
PR02		<i>Burkholderia glumae</i>	1458	100	99.5	AB682222.1
PR10	<i>Burkholderiaceae</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>	1611	100	99.7	GQ359110.1
PR28		<i>Burkholderia cepacia</i>	1611	100	99.7	GQ359110.1
MM02		<i>Bacillus megaterium</i>	1601	100	100	MG489825.1
MM13	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus altitudinis</i>	1600	100	99.9	MN853778.1
MA08		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1592	100	100	MW330426.1
MA07	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1592	100	100	MW330426.1

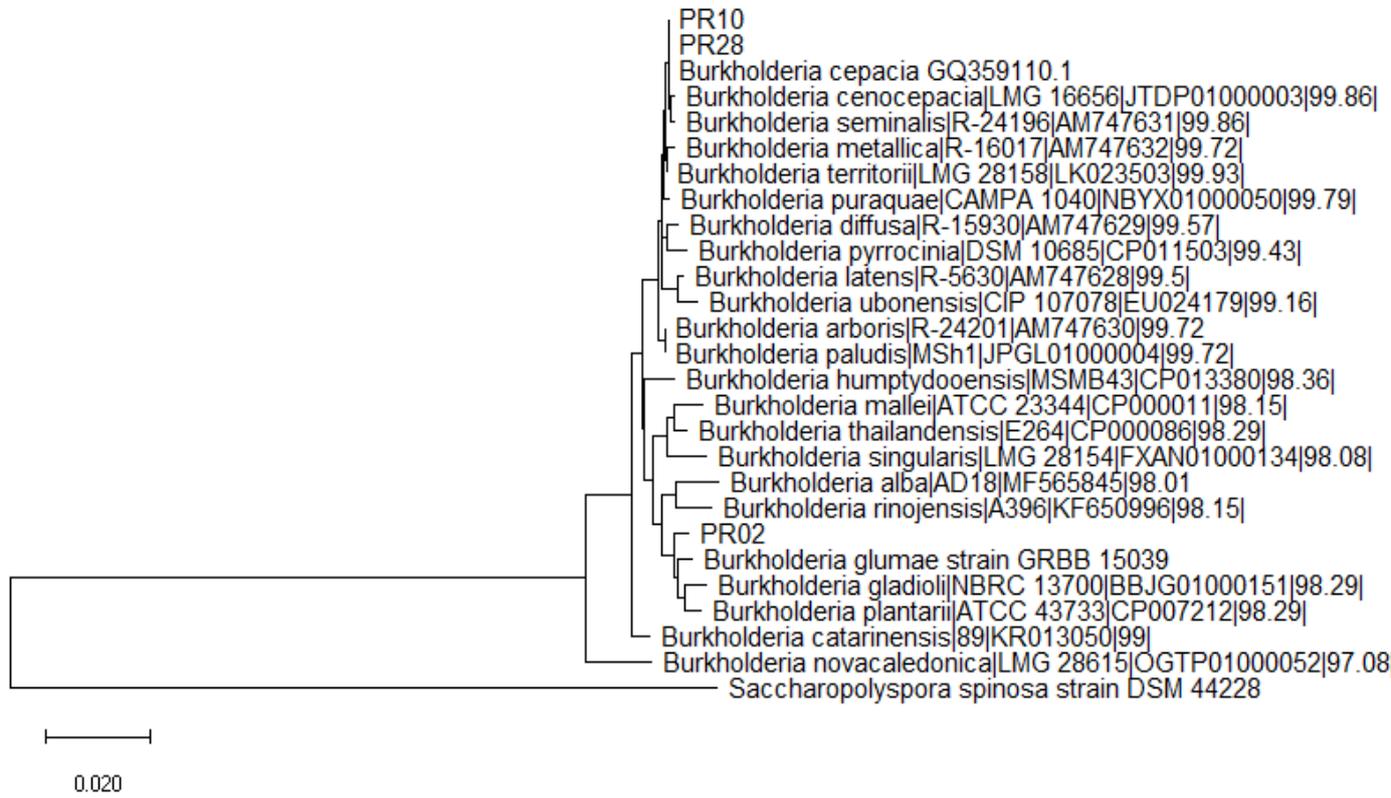


Figura 12. Análise de distância genética baseada na sequência parcial do gene ribossomal 16S demonstrando a relação entre os isolados PR02 e PR10 com sequências depositadas na base de dados do Eztaxon.

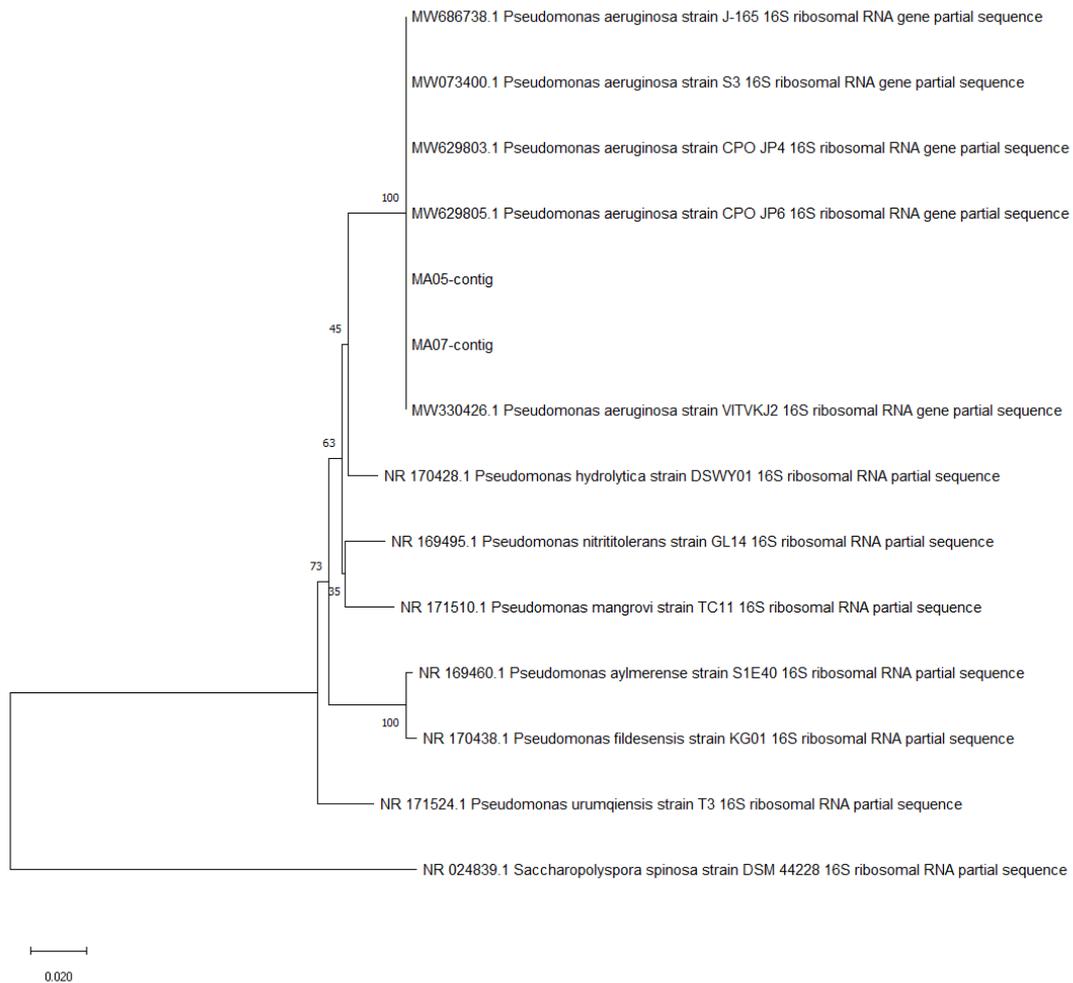


Figura 13. Análise de distância genética baseada na sequência parcial do gene ribossomal 16S expondo as relações entre os isolados *Pseudomonas aeruginosa* MA05 e *P. aeruginosa* MA07 com sequencias depositadas na base de dados do Genbank.

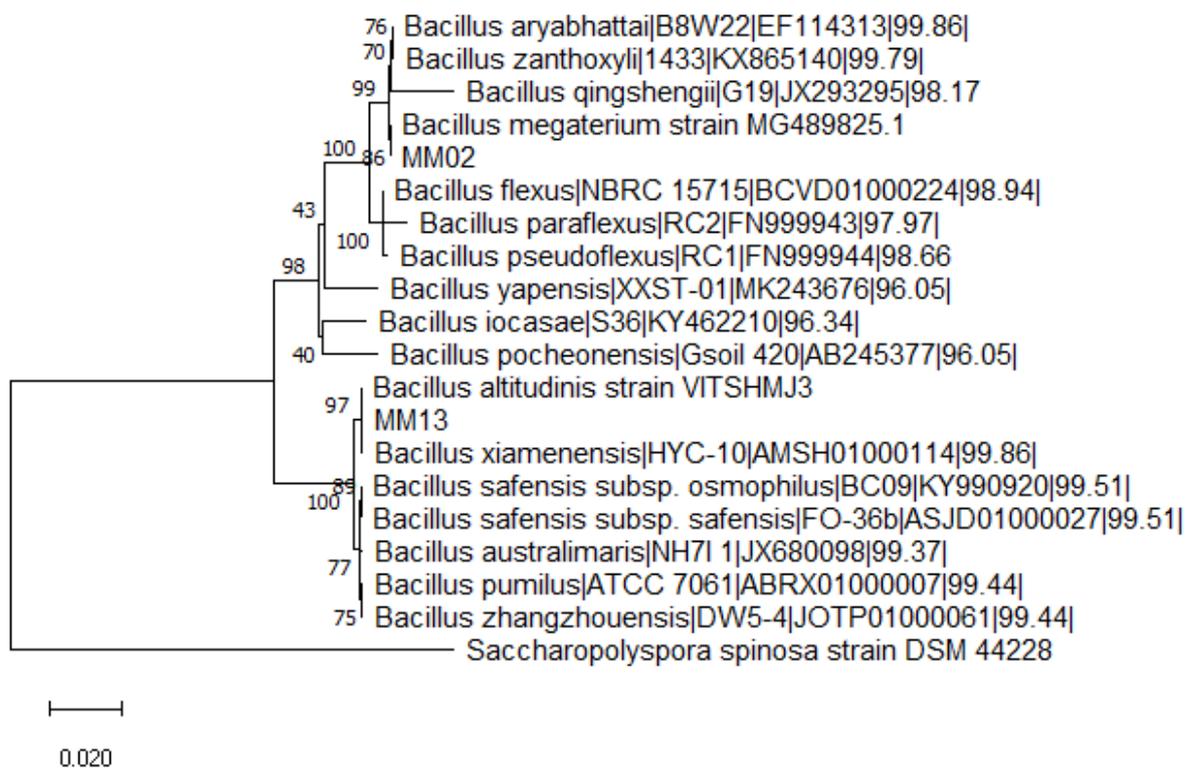


Figura 14. Análise de distância genética baseada na sequência parcial do gene ribossomal 16S demonstrando a relação entre os isolados MM02 e MM13 com sequências depositadas na base de dados do Eztaxon.

Gênero *Burkholderia*

Segundo KANG, et al. (2020), isolados de *Burkholderia cepacia* produzem um antibiótico (denominado AFC-BC11) que está associado a sua membrana celular, sendo responsável por controlar efetivamente o tombamento de algodão ocasionado por *R. solani*.

Solos de manguezais tem sido citados como fontes para isolamento de bactérias do gênero *Burkholderia*. Este ecossistema dispõe de muita matéria orgânica, favorecendo o crescimento de bactérias específicas (Prakash et al., 2014; Knappik et al., 2015; Liu et al., 2015). Segundo SOUSA et al. (2016), o gênero *Burkholderia* prefere ambientes úmidos e com maior disposição de matéria orgânica, como os manguezais. No Brasil, a espécie *Burkholderia pseudomallei* foi isolada a partir de solos de manguezais do estado do Amapá, enquanto que na china, foi isolada de manguezais com influência de petróleo nos solos. Em seu trabalho, Liang et al., (2019) identificaram espécies de *Burkholderia xenovorans* e *Burkholderia sartisoli* com relativa abundância nos solos contaminados com petróleo. Assim, a resistência do gênero a ambientes hostis e a afinidade por biomas úmidos pode explica a ocorrência do gênero

Burkholderia nos solos de restinga no presente estudo. A restinga, apesar de não ser úmida como os manguesais, pode ser considerada um ambiente hostil devido à alta salinidade.

Estudos com bactérias do gênero *Burkholderia* destacam esses agentes como potenciais para exploração agrícola e biotecnológica visando a biorremediação, promoção de crescimento vegetal e atividade antagônica a fitopatógenos (SAMPAIO et al., 2017; BACH, 2016). Segundo AHMADZADEH et al. (2009), isolados de *B. cepacia* prospectados de solos no Iran foram capazes de suprimir os sintomas de *Damping-off* (*Rhizoctonia solani*) em feijão. Os mecanismos relacionados ao controle foram associados a produção de metabólitos secundários antifúngicos, como sideróforos, cianeto de hidrogênio e protease, inibindo o fitopatógeno em condições *in vitro* e também em casa de vegetação. Tais efeitos antagônicos foram observados no presente trabalho com a inibição micelial *in vitro* de *R. solani* e os efeitos positivos no experimento de germinação das sementes de soja em casa de vegetação, proporcionados pelos isolados *B. glumae* PR02 e *B. cepacia* PR10.

Gênero *Pseudomonas*

Para o gênero *Pseudomonas*, os mecanismos de interação microbiana incluem a produção de moléculas quelantes com alta afinidade ao Fe^{3+} , denominado de Sideróforos (DE OLIVEIRA PEREIRA, 2019). Bactérias do gênero *Pseudomonas* possuem a capacidade de assimilar sideróforos com maior eficiência e em maiores quantidades. Sua alta capacidade de sequestrar o Fe^{3+} da rizosfera pode afetar o desenvolvimento de outros microrganismos, incluindo fitopatógenos, tornando o Fe^{3+} indisponíveis a estes microrganismos (DE MELO, 1998). Segundo LEE et al., (2003), filtrados da cultura de *P. aeruginosa* foram eficazes no controle de *Phytophthora* em pimenta, e de antracnose em plantas de pepino, possibilitado por moléculas de sideróforos ácido fenazina-1-carboxílico com capacidade de reduzir Fe^{3+} e atividade redox.

PLASENCIA-MÁRQUEZ (2017) relatou pela primeira vez a capacidade fitopagênica de *P. aeruginosa* para soja quando observou a incidência de doenças foliares causada por essa bactéria em uma área de cultivo de soja, na província de Pinar del Río, Cuba.

Com o sequenciamento dos genes *16S rRNA*, foi possível identificar que o agente etiológico da doença era *P. aeruginosa*, sendo este o primeiro relato de infecção em soja. No presente estudo, *P. aeruginosa* MA07 e *P. aeruginosa* MA05 inibiram a germinação das sementes de soja provavelmente pela ação dessas bactérias como patogênicas para a soja, deixando as sementes cloróticas e encharcadas, com características semelhantes ao descrito no trabalho citado.

Gênero Bacillus

O gênero *Bacillus* está entre os principais microrganismos com potenciais biotecnológicos. Sendo assim, diversos estudos acerca deste gênero vêm sendo realizados buscando entender melhor a interação entre os organismos com a microbiota presente e os efeitos em plantas (VILLARREAL-DELGADO. et al., 2018). *B. megaterium* já foi identificado como potencial para controle de *R. solani*, apresentando efeito antagônico relacionado a competição por colonização da raiz, tendo se estabelecido primeiramente impedindo a colonização do fitopatógeno (ZHENG, X. Y.; SINCLAIR, J. B., 2000).

B. altitudinis foi isolado por MOHAMED et al., (2018) a partir de sedimentos de manguezais no Egito, sendo capaz de produzir polissacarídeos extracelulares definidos como exopolissacarídeos (EPS) que promoveram ação inibitória de células cancerígenas, portanto, com potenciais antitumorais. (SEESURIYACHAN et al., 2012),

Para as plantas, os exopolissacarídeos (EPS) podem atuar no desenvolvimento vegetal e auxiliar em situações de estresses ambientais, como estresse salino, hídrico, variações de temperaturas, entre outros (TEIXEIRA, 2021). O EPS confere também aos microrganismos a aderência e colonização de superfícies sólidas, onde há acúmulo de nutrientes, além de proteger as células contra dessecação e estresses ambientais (BARRETO et al., 2013). A espécie de *B. altitudinis* produz quantidades elevadas de EPS, o que lhe confere a habilidade de colonizar ambientes considerados extremos, como o mangue. KAYALVIZHI (2019) confirma esta hipótese em seu estudo, apontando a predominância desta espécie em sedimentos de solo de manguezais, identificados através de técnicas metagenômicas.

Além das características como promotoras de crescimento vegetal, diversos autores associam o EPS como agente antagônico a patógenos e fitopatógenos. Eles mencionam que o antagonismo está relacionada a atividade quelante e privação de metais, oligoelementos ou nutrientes essenciais que limitam o crescimento de microrganismo (MOHAMED et al., 2018; KALICKA-WOZNIAK et al., 2012). No presente trabalho, o isolado *B. altitudinis* MM13 inibiu o crescimento micelial de *R. solani in vitro* quando utilizado somente o filtrado bacteriano. O mesmo foi observado por LU et al. (2012) quando filtrados da cultura de *B. altitudinis* inibiram o crescimento micelial do fitopatógeno *Phutophthora sojae in vitro*. Em condições de casa de vegetação, o isolado possibilitou 49,28% de redução nos sintomas das plantas de soja.

5.7. Avaliação de bactérias por dois métodos de aplicação do caldo de cultivo em sementes de soja – Teste de laboratório

Os cinco isolados PR02, PR28, PR10, MA07 e MA08 que proporcionaram as maiores inibições de *R. solani in vitro* na menor concentração (10%) foram selecionados para sua avaliação por dois métodos de aplicação do caldo de cultivo em sementes de soja, em teste de laboratório.

Pela análise fatorial, as bactérias aplicadas por imersão das sementes no caldo de cultivo bacteriano foram significativamente mais eficazes que as mesmas bactérias aplicadas pela fixação nas sementes utilizando goma xantana. Portanto, os testes com os dois métodos foram apresentados separadamente em 2 figuras (Figuras 15 e 16).

Para o teste com as sementes mergulhadas (Figura 15) no caldo, as bactérias *B. glumae* PR02, *B. cepacia* PR10 e *B. cepacia* PR28 possibilitaram os menores níveis de dano nas sementes inoculadas com o fungo, abaixo de 13%, diferenciando significativamente dos controles H2O e GY com *R. solani* (níveis de dano acima de 65%, respectivamente) ($F_{13,83}=24,040$; $P < 0.001$), mas não diferenciando desses controles sem o fungo (níveis abaixo de 5%) ($P=0,156$). As bactérias *P. aeruginosa* MA07 e MA08 resultaram nos maiores índices de dano nas sementes com o fungo (85,6 e 64,4% de danos, respectivamente), não diferenciando das testemunhas com *R. solani* ($P=0,213$) mas diferenciando daquelas sem o fungo ($P < 0.001$). A bactéria *P. aeruginosa* MA07 apresentou-se inclusive tóxica para as sementes já que causou índice de dano de 35% nas sementes sem *R. solani*, diferenciando significativamente das testemunhas sem o fungo ($P < 0.001$).

Para o teste com as sementes envolvidas na goma+bactéria (Figura 16), nenhuma das bactérias possibilitou redução nos índices de danos nas sementes com o fungo, já que os respectivos índices de dano (18,9% a 72,2%) não diferenciaram significativamente das testemunhas H2O e GY com o fungo (35,6% e 47,8%, respectivamente). A bactéria *P. aeruginosa* MA07 apresentou-se novamente tóxica para as sementes já que causou índice de dano de 74,4% nas sementes sem *R. solani*, diferenciando significativamente das testemunhas sem o fungo (6,7%).

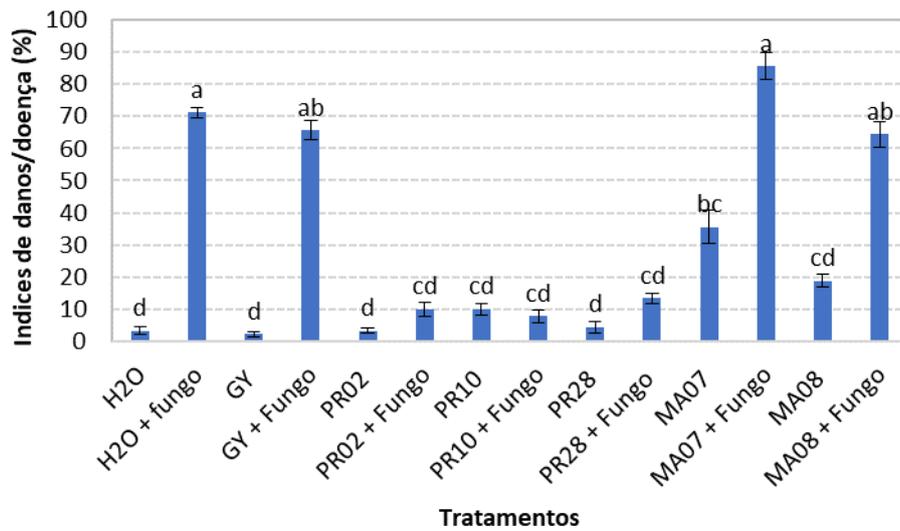


Figura 15. Índices de danos/doença (%) em sementes previamente mergulhadas no caldo de crescimento das bactérias *Burkholderia glumae* PR02, *Burkholderia cepacia* PR10 e *Burkholderia cepacia* PR28, e inoculadas com *Rhizoctonia solani*. *Letras diferentes significam diferenças entre tratamentos, de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

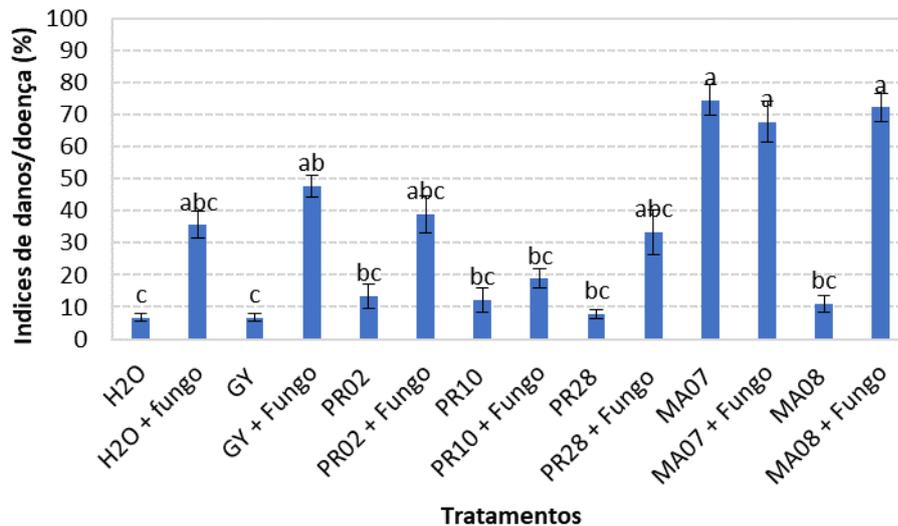


Figura 16. Índices de danos/doença (%) em sementes revestidas com a mistura de goma xantana mais as bactérias *Burkholderia glumae* PR02, *Burkholderia cepacia* PR10 e *Burkholderia cepacia* PR28, e inoculadas com *Rhizoctonia solani*. *Letras diferentes significam diferenças entre tratamentos, de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Inoculantes microbianos aplicados como tratamento de sementes agem diretamente na rizosfera da planta, local do solo que circunda as raízes e onde ocorre a interação entre a plantas e os microrganismos (Philippot et al.2013). Esta interação depende do fornecimento recíproco

de nutrientes e outros compostos, incluindo substâncias promotoras de crescimento e antibióticos (O'CALLAGHAN, 2016). O tratamento de sementes com microrganismos possibilita a introdução do inóculo na rizosfera, auxiliando no controle de diversos patógenos de solo, como a *Rhizoctonia*. Sendo assim, uma gama de antagonistas antifúngicos e bactericidas tem sido usadas experimentalmente e comercialmente (Butt and Copping 2000; Nelson 2004a ; Berg 2009).

A técnica de imersão de sementes em suspensões aquosas, tem sido utilizada com maior frequência para experimentos devido a maior facilidade na metodologia e aos resultados satisfatórios obtidos (O'CALLAGHAN, 2016). Os resultados obtidos neste estudo enfatizam o potencial antagônico dos isolados testados, com efeitos evidentes das interações entre os microrganismos e a semente. A colonização de sementes por microrganismos utilizando o método de imersão em suspensão aquosa já foi evidenciada por Correa et al. (2009) quando sementes de soja foram imersas em cultura de *Bacillus amyloliquefaciens* (BNM122). Nesse estudo, os fungicidas Carbendazim e Thiram alteraram significativamente o perfil metabólico da comunidade bacteriana presente na rizosfera, enquanto que a cepa de *B. amyloliquefaciens* não apresentou nenhuma alteração. O autor enfatiza as vantagens na utilização de microrganismos, destacando sua alta especificidade e seletividade em comparação aos produtos químicos que em sua maioria são de amplo espectro, não seletivos a organismos benéficos e maléficos.

Em outro estudo realizado por Pereira et al. (2011), sementes de milho mergulhadas em suspensão de *Bacillus amyloliquefaciens* tiveram menor incidência de *Fusarium verticillioides* em estufas e testes de campo. O inóculo do agente antagônico apresentou-se como um fator levemente estressante para planta, proporcionando pequenas alterações na resposta antioxidante da planta em seu estágio inicial de crescimento.

A vantagem da inoculação por imersão/mergulho também já foi evidenciada em comparação ao método de peletização de sementes. Segundo Moenne-Loccoz et al (2003), sementes peletizadas com *Pseudomonas flourecens* utilizando material comercial a base de partículas de argila e madeira (produzidos por Germain's (UK) Ltd (King's Lynn, UK)), apresentou menor poder germinativo em solo infestado com *Pythium* spp comparadas as sementes imersas em suspensão aquosa da bactéria. A peletização de semente necessita de um processo de secagem , sendo esse um fator significativo na redução da viabilidade do inóculo empregado (Fouilleux et al . 1994).

No presente estudo, a goma xantana usado como agente espessante possui como uma de suas propriedades a capacidade de retenção de umidade, podendo ter reduzido a eficiência dos microrganismos presentes no tegumento da semente, o que explicaria os resultados inferiores quando comparados ao tratamento com sementes imersas em suspensão aquosa. Kloepper et al (1981) concluíram que ao contrário das células em suspensões aquosas, as formulações com goma xantada induz a inativação fisiológica dos microrganismos, protegendo-os de estresses ambientais e aumentando sua viabilidade. Como demonstrado no presente trabalho, a inativação fisiológica dos microrganismos pode ter resultado numa menor eficiência contra o fitopatógeno, em contrapartida os tratamentos submetidos a imersão podem fazer com que os microrganismos não percam sua ação fisiológica, porém diminuam sua viabilidade.

5.8. Avaliação de bactérias por dois métodos de aplicação do caldo de cultivo em sementes de soja – Teste em casa de vegetação

A bactéria *B. cepacia* PR10 inoculada nas sementes por mergulho no caldo (Figura 17) possibilitou o maior índice de germinação das sementes (90%) na presença do fungo, diferindo-se significativamente da testemunha GY e da bactéria *B. glumae* PR02 aplicados pelos dois métodos (inoculadas nas sementes e no substrato), na presença do fungo (30% e 55%, respectivamente) ($F_{11, 71}=31,842$; $P < 0.001$), mas não diferindo dos demais tratamentos ($P=0,465$). Quando aplicada no substrato (Figura 18), a bactéria *B. cepacia* PR10 possibilitou o segundo melhor índice de germinação das sementes na presença do fungo (70%), diferindo-se significativamente da testemunha GY aplicada sobre a semente (30%) e sobre o substrato (30%), na presença do fungo, e dos demais tratamentos ($F_{11, 71}=31,842$; $P < 0.001$), exceto da testemunha GY aplicada sobre o substrato, sem o fungo (90%), e da bactéria *B. cepacia* PR10 aplicada nas sementes ($P=0,102$), e da bactérias *B. glumae* PR02 aplicada sobre as sementes e sobre o substrato, ambas com a presença o fungo ($P=0,313$).

Em relação a sobrevivência das plantas (Figura 18), a bactéria *B. cepacia* PR10 aplicada nas sementes também se destacou com 86,4% de sobrevivência na presença do fungo, diferindo-se significativamente da testemunha GY aplicada nas sementes (30%) e no substrato (30%), na presença do fungo ($F_{11, 71}=6,783$; $P < 0.001$), mas não diferindo-se dos demais tratamentos ($P=0,78$). Aplicada no substrato (Figura 18), a bactéria *B. cepacia* PR10 possibilitou 66,7% de sobrevivência das plantas na presença do fungo, não diferindo-se das

testemunhas GY aplicadas pelos dois métodos (semente e substrato), na presença do fungo, mas também não diferindo-se dos demais tratamentos com ou sem a presença do fungo ($P=0,279$)

A interação entre semente-bactéria já foi relatada em outros trabalhos. Em um experimento conduzido por Araújo et al., (2010) foi possível avaliar a influência de bactérias diazotróficas (*Herbaspirillum sp.*, *H.seropedicae*, *Burkholderia brasilensis* e *Azospirillum sp.*) sobre a germinação de sementes de arroz, evidenciando um aumento significativo nas porcentagens de germinação em relação as sementes não tratadas com os isolados. Além de apresentar características germinativas, os isolados inibiram *in vitro* o desenvolvimento do fitopatógeno de pós-colheita *Fusarium sp.* Os resultados se assemelham aos obtidos no presente trabalho, indicando que as bactérias além de apresentarem caráter germinativo, são antagônicas ao fitopatógeno estudado.

O caráter germinativo por isolados, utilizando o método de sementes mergulhadas sobre o caldo bacteriano, também foi descrito por Segundo MARQUES, et al., (2014), isolados de *Bacillus sp.* possibilitaram aumentos nas porcentagens de germinações de sementes de *Eucalyptus urophylla* e reduções nos tempos médios de germinação quando as semente foram previamente mergulhadas nos caldos bacterianos.

Interações entre bactérias e plantas certamente existem e podem influenciar a germinação das sementes, sendo alguns mecanismos dessas interações já citados na literatura. SCHLINDWEIN et al., (2008) observou que bactérias nodulares originalmente de *Acacia decurrens* aumentaram a taxa de germinações de sementes de alface devido a produção de ácido indolacético (AIA) em quantidades adequadas para a hortaliça. Diversos estudos relatam a produção de fito-hormônios por bactérias isoladas da rizosfera de plantas (ARAÚJO et al., 2010), essenciais no desenvolvimento fisiológico das plantas, atuando na regulação de parâmetros como a germinação de sementes, formação de raízes, entre outros (Raven et al., 2001).

Segundo MARQUES et al., (2014), no processo de germinação, após a absorção da água, há o acréscimo de enzimas e o conseqüente aumento na atividade metabólica. No presente estudo, o método utilizado para o tratamento de sementes, pode ter favorecido a penetração dos isolados bacterianos no momento de reidratação das sementes, influenciando significativamente no processo de germinação com a produção de enzimas pela bactéria ou pela própria semente.

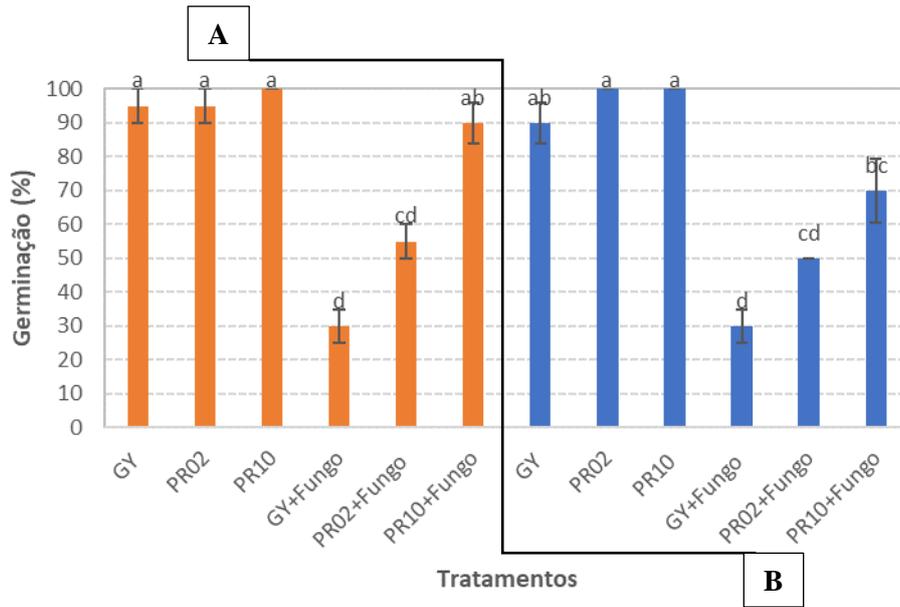


Figura 17. Porcentagens de sementes de soja germinadas em substratos infestados com *Rhizoctonia solani* e tratados com as bactérias *Burkholderia cepacia* PR10 e *Burkholderia glumae* PR02, aplicadas na semente (A) e no substrato (B). *Letras diferentes representam diferença significativa, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

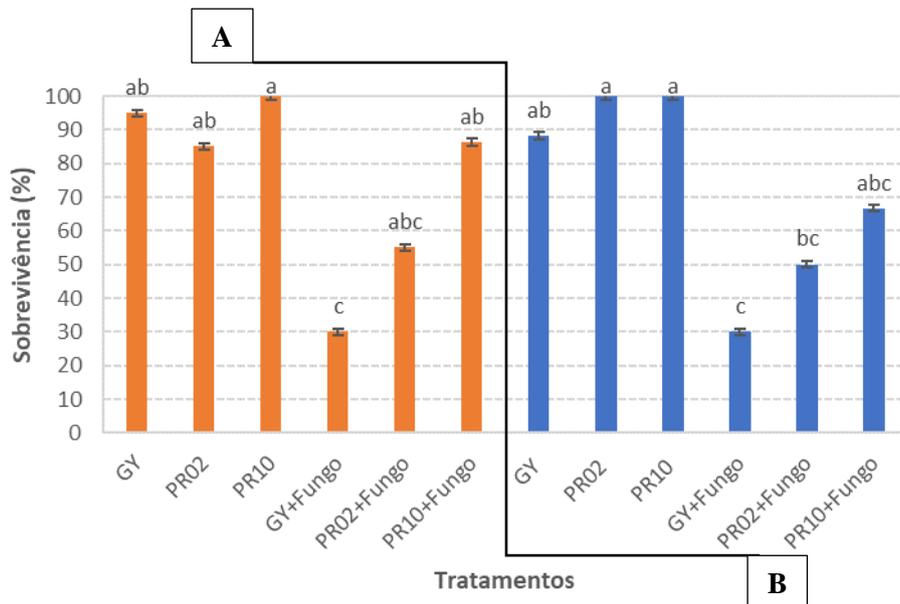


Figura 18. Porcentagens de plantas de soja sobreviventes em substratos infestados com *Rhizoctonia solani* e tratados com as bactérias *Burkholderia cepacia* PR10 e *Burkholderia glumae* PR02, aplicadas na semente (A) e no substrato (B). *Letras diferentes representam diferença significativa, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para ambas as bactérias, a aplicação mediante mergulho das sementes no caldo bacteriano possibilitou as menores severidades da doença, demonstrando ser o método mais indicado para o controle do fungo. O isolado *B. cepacia* PR10 destacou-se por possibilitar os menores índices da doença pelos dois métodos de aplicação, na presença do fungo. Já o isolado *B. glumae* PR02 não demonstrou a eficiência esperada apesar de, nos ensaios anteriores, ter apresentado melhores resultados em relação aos demais microrganismos. Geralmente, o antagonismo apresentando *in vitro* por um microrganismo em relação a um fitopatógeno, pode não ser considerado como uma evidência de sua eficácia quando avaliado em condições de casa de vegetação (REDDY, et al., 1994). Tais aspectos podem estar relacionados a diversos fatores, como o comportamento bacteriano em relação a um complexo maior de microrganismos, visto que a aplicação em casa de vegetação induz a uma maior interação entre a microbiota presente no solo. Outro aspecto a ser considerado está relacionado ao ambiente nutricional, pois a disposição de nutrientes na natureza difere consideravelmente dos meios de cultivos convencionais. Sendo assim ambos os aspectos podem afetar o desenvolvimento e a sobrevivência do microrganismo (BEVININO et al., 1998).

Em um estudo conduzido por BEVININO et al., (1998) ficou evidente a variação do potencial antagonístico de isolados de *B. cepacia* sobre *Fusarium spp.* Nesse estudo os isolados que apresentaram atividades antagônicas nos experimentos *in vitro* não foram eficazes no controle do fitopatógeno nos ensaios em casa de vegetação.

Em relação ao peso de biomassa (Figura 19), os melhores tratamentos foram as duas bactérias e o meio GY aplicados no substrato, na ausência do fungo, não diferenciando-se entre si e da bactéria *B. cepacia* PR10 aplicada na semente, mas diferenciando dos demais tratamentos ($F_{11, 172}=2,425$; $P=0.0081$). Esses resultados sugerem que a aplicação sobre o substrato promove menor eficácia da bactéria para o controle do fungo em relação a aplicação na semente por mergulho, porém possibilita um maior incremento de biomassa das plantas o que pode ser um fator de compensação para a recomendação também dessa técnica além do mergulhos das sementes.

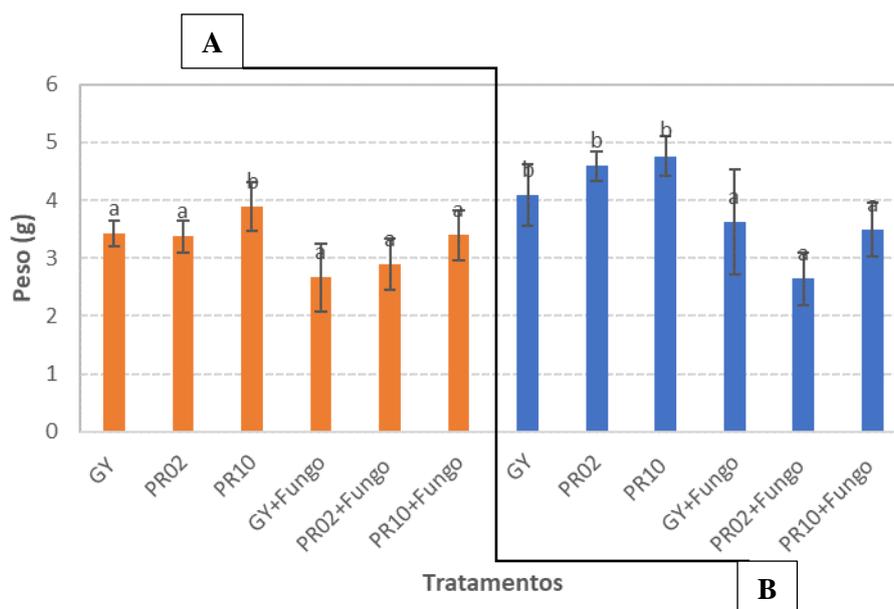


Figura 20. Média do peso (em gramas) das plantas de soja em substratos infestados com *Rhizoctonia solani* e tratados com as bactérias *Burkholderia cepacia* PR10 e *Burkholderia glumae* PR02, aplicadas na semente (A) e no substrato (B) . *Letras diferentes representam diferença significativa, pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

Uma provável explicação para o aumento de biomassa das plantas pelas aplicações no substrato pode estar relacionado a disponibilidade dos caldos e do meio por mais tempo no substrato, permitindo um melhor aproveitamento dos mesmos pela planta para seu desenvolvimento em relação ao mergulho das sementes, quando os caldos e o meio estariam restritos apenas a superfície das sementes. Esse efeito pode ser o mesmo proporcionado pelos condicionadores de solo.

As duas bactérias *B. cepacia* PR10 e *B. glumae* PR02 possibilitaram um rendimento de biomassa numericamente maior que do meio GY pelas aplicações no substrato, porém sem diferenças significativas. Segundo Gomes et al. (2003), isolados de *Bacillus pulmilus* e *Bacillus thuringiensis subvar. kenyae* aumentaram significativamente a biomassa de mudas de alface, em 50 % e 42% respectivamente. Outro estudo conduzido por Silveira et al. (2001), evidenciou o incremento da biomassa vegetal em mudas de pepido, estimuladas por isolados de *B. amyloliquefaciens* e *Enterobacter cloacae*.

Resultados semelhantes ao do presente estudo foram obtidos por MAHDY et al., (2006) quando avaliou *Bacillus thuringiensis* e *Trichoderma harzianum* para o controle de *R. solani* em soja, usando dois métodos de aplicação: tratamento do solo e tratamento de sementes. A bactéria *B.thuringiensis* possibilitou o maior índice de sobrevivência das plantas com menor

índice de doença para sua aplicação em tratamento de semente (46% e 65%, respectivamente) comparada a sua aplicação no solo (14% e 91,7%, respectivamente).

A aplicação de bactérias para o controle de fitopatógenos e promoção de crescimento tem se tornado uma prática cada vez mais explorada no Brasil, ressaltando a necessidade da bioprospecção de novos isolados cada vez mais eficazes para uso na agricultura. Entre os isolados encontrados no solo e na rizosfera, algumas espécies do gênero *Burkholderia* têm demonstrado propriedades potenciais esse fim, como para o controle biológico, biorremediação e promoção de crescimento vegetal (O'SULLIVAN; MAHENTHIRALINGAM, 2005). Um dos mecanismos apresentados por esse gênero, evidenciado por Batista (2013) com estudos *in vitro*, é a produção de ácido indol acético, sideróforos e fixação biológica de nitrogênio, que podem resultar em um aumento expressivo na altura e peso de plantas de soja, com incremento de 46% e 102% respectivamente, após 60 dias de crescimento. No presente trabalho, *B. cepacia* PR10 e *B. glumae* PR02 aplicados sobre o substrato parecem favorecer o crescimento e desenvolvimento das plantas.

Além das propriedades bioestimulantes, o gênero *Burkholderia* já foi citado como antagonistas a fungos fitopatógenos como *Fusarium* e *Rhizoctonia* em sementes de soja. Bevinino et al., (1998), avaliou o potencial antagônico de 14 cepas de *B. cepacia* sobre 12 isolados fúngicos de *Fusarium Liseola*, associados a plantas de milho *in vitro*. Todos os isolados inibiram significativamente o crescimento micelial dos 12 isolados do fungo.

Concluindo, no presente estudo, os isolados não apresentaram caráter fitotóxico ou efeitos negativos no desenvolvimento das plantas de soja, exercendo efeitos positivos e sobressaindo como antagonista potencial para o controle de *R. solani*.

6. CONCLUSÕES

- O isolado *B. glomae* PR02 demonstrou maior porcentagem de inibição (71%) do fitopatógeno *R. solani in vitro*;
- Os filtrados bacterianos do isolado *B. glomae* PR02 destacou-se, apresentando 100% de inibição em todas as concentrações avaliadas;
- O método de aplicação das bactérias com as sementes mergulhadas no caldo de cultivo apresentou melhores resultados comparado ao revestimento das sementes com goma xantana mais os caldos;
- O isolado *P. aeruginosa* MA07 demonstrou-se fitopatogênico a sementes de soja, causando maior severidade no tratamento com goma xantana;
- Os isolados *B. glomae* PR02 e *B. cepacia* PR10 proporcionaram maior inibição do fungo *in vivo*, no método de aplicação por mergulho;
- O isolado *B. cepacia* PR10 controlou o fungo em casa de vegetação;
- A comunidade bacteriana presente no mangue possui potencial biotecnológico para o controle de *R. solani* em sementes de soja.

7. REFERÊNCIAS

ABRAHAM, T. J., Ghosh, S. T. S., Nagesh, D. S. (2004) Distribution of bacteria involved in nitrogen and sulphur cycles in shrimp culture systems of West Bengal, India. *Aquaculture* 239: 275-288.

ADRIO, J. L., Demain, A. L. (2014) *Microbial Enzymes: Tools for Biotechnological Processes*. *Biomolecules*, 4: 117-139.

AGROFIT- Ministério da Agricultura, pecuária e Abastecimento – Coordenação-Geral de Agrotóxicos e Afins/DFIA/DAS. Acessado dia 02/06/2019 Disponível em http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons

ALMEIDA, Renato. *Ecologia de manguezais: dinâmica da serapilheira e funcionamento do ecossistema, Ilha do Cardoso, Cananéia, São Paulo, Brasil*. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2005.

AMARAL, Vera Maria Gurgel; et al. *A importância da soja como alimento funcional para qualidade de vida e saúde*. 2006.

ALONGI, D.M.; CHRISTOFFERSEN, P.; TIRENDI, F. The influence of forest type on microbial-nutrient relationships in tropical mangrove sediments. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.*, v. 171, p. 201-223, 1993.

ANDREOTE, F.; Fasanella, C. C.; Lopez., M. V.; Baena, S.; Taketani, R. G.; Melo, I. S. 302 (2012) The microbiome of Brazilian mangrove sediments as revealed by metagenomics. *PLoS ONE*, v. 7(6), p. 1-14.

ANDREOTE, F.D., PEREIRA e SILVA, M.C.P.; *Microbial communities associated with plants: learning from nature to apply it in agriculture*. *Current Opinion in Microbiology*, v. 37, p. 29-34, 2017.

ANCHEEVA, Elena; DALETOS, Georgios; PROKSCH, Peter. Lead Compounds from Mangrove-Associated Microorganisms. *Marine Drugs*, [s.l.], v. 16, n. 9, p.319-349, 7 set. 2018.

AHMADZADEH, Masoud; SHARIFI TEHRANI, Abbas; NABI ZADEH, Maryam. Biological control of *Rhizoctonia solani* Kuhn casual agent of common bean damping-off through *Burkholderia cipoana* (ex. Burk) Yabuuchi. **Iranian Journal of Plant Protection Science**, v. 39, n. 1, 2009.

ARAÚJO, A. E. S. et al. Germinação e vigor de sementes de arroz inoculadas com bactérias diazotróficas. **Ciência e Agrotecnologia**, v.34, n.4, p.932-939, 2010.

BAIRD, Andrew H. et al. Do mangroves provide an effective barrier to storm surges?. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 106, n. 40, p. E111-E111, 2009.

BAI, Yuming; ZHOU, Xiaomin; SMITH, Donald L. Enhanced soybean plant growth resulting from coinoculation of *Bacillus* strains with *Bradyrhizobium japonicum*. *Crop science*, v. 43, n. 5, p. 1774-1781, 2003.

BARRA, Victor Rafael et al. Antagonismo direto e biocontrole da podridão-mole-do-tomateiro pelo uso de procariontes. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 44, n. 3, p. 327-330, 2010.

BALARDIN, Ricardo. Fungicidas sistêmicos: benzimidazóis, triazóis e estrobilurinas. Disponível em: <<https://elevagro.com/materiais-didaticos/fungicidas-sistemicos-benzimidazois-triazois-e-estrobilurinas/>>. Data de acesso: 21 de junho de 2019.

BARKER, E.M.A.T. *Wetlands in the natural environment: how do wetlands work ?* (Ed.). *The wetlands handbook*. Oxford: Science, 2009.p. 155-170

BEN, Cássio Alberto Vielmo et al. Avaliação de cultivares de soja [*Glycine max* (L.) MERRILL] quanto à tolerância à *Rhizoctonia solani*. 2015.

BACH, Evelise. Utilização de *Burkholderia* sp. 89 para o controle biológico de fungos fitopatogênicos e identificação de moléculas de seu metabolismo secundário envolvidas nesse processo. 2016.

BATISTA, Bruna Durante. Promoção de crescimento em milho (*Zea mays* L.) por rizobactérias associadas à cultura do guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*). 2013. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de

Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013. doi:10.11606/D.11.2013.tde-25032013-154749. Acesso em: 2021-06-17.

BEVIVINO, Annamaria et al. Characterization of a free-living maize-rhizosphere population of *Burkholderia cepacia*: effect of seed treatment on disease suppression and growth promotion of maize. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 27, n. 3, p. 225-237, 1998.

BHATTACHARYYA, P.N., JHA, D.K., 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28, 1327–1350. 2012.

CANOVA, Sarah Pigato. Diversidade e bioprospecção de actinobactérias isoladas de manguezais . 2009. 66 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biotecnologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

CÂMARA, G. M. S. Ecofisiologia de soja e rendimento: Tecnologia da Produção. Piracicaba: USP, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”,p.256-275. 1998.

CATTER, K. M. et al. Bactérias isoladas de mangues do Rio Cocó e do Riacho das Guaribas (CE) e seu potencial na degradação de derivados e constituintes de petróleo. 2007.

CARRÃO-PANIZZI, Mercedes Concórdia; SILVA, JB da. Soja na alimentação humana: qualidade na produção de grãos com valor agregado. In: Quinto Congresso de la Soja del Mercosur. 2011.

CADETE, Luana Lira. Descrição da comunidade microbiana ativa em solos de manguezais por metagenômica e metatranscriptômica. 2014. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

CELESTINO, G. G.; GODOY, C. V. Ensaio cooperativo para avaliação da eficiência de fungicidas protetores no controle de doenças na cultura da soja. In: Embrapa Soja-Artigo em anais de congresso (ALICE). In: JORNADA ACADÊMICA DA EMBRAPA SOJA, 11. 2016, Londrina. Resumos expandidos... Londrina: Embrapa Soja, 2016.

COLE, James R. et al. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic acids research*, v. 42, n. D1, p. D633-D642, 2014.

COMPANT, Stéphane et al. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and environmental microbiology*, v. 71, n. 9, p. 4951-4959, 2005.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Custos de produção agrícola: a metodologia da Conab. 2018.

CORRÊA, Élide Barbosa; GALVÃO, José Abrahão Haddad; BETTIOL, Wagner. Controle biológico da podridão radicular e promoção de crescimento em pepino hidropônico com microrganismos de manguezais. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, p. 130-136, 2011.

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.

CORREIA, J. L. A. et al. Isolamento, identificação e avaliação do potencial enzimático de bactérias autóctones de sedimento de mangue da Lagoa do Araçá-PE. In: XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química p. 19-22. 2014.

COSTA, Marília Oliveira et al. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR (ITS-rDNA) DE FUNGOS RHIZOCTONIA ISOLADOS DE SOLOS BRASILEIROS. 2018.

CONTE, Osmar et al. Resultados do Manejo Integrado de Pragas da Soja na safra 2016/17 no Paraná. Embrapa Soja, 2017.

CUNHA-LIGNON, Marília et al. Analysis of mangrove forest succession, using sediment cores: a case study in the Cananéia-Iguape coastal system, São Paulo Brazil. *Brazilian Journal of Oceanography*, v. 57, n. 3, p. 161-174, 2009.

CHUN, Jongsik et al. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. ***International journal of systematic and evolutionary microbiology***, v. 57, n. 10, p. 2259-2261, 2007.

DAS, Saudamini; VINCENT, Jeffrey R. Mangroves protected villages and reduced death toll during Indian super cyclone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 106, n. 18, p. 7357-7360, 2009.

DE SOUSA, Fabio Alves et al. PATOLOGIA EM SEMENTES DE SOJA. *Revista Científica-Cultural*, v. 1, n. 01, p. 7, 2016.

DE OLIVEIRA PEREIRA, Thays. Regulação da expressão de pioverdina dependente de contato em *pseudomonas aeruginosa*. 2019.

DE MELO, I. S. Rizobacterias promotoras de crescimento de plantas: descricao e potencial de uso na agricultura. **Embrapa Meio Ambiente-Capítulo em livro científico (ALICE)**, 1998.

DIAS, Armando C. F. et al. Diversity and biotechnological potential of culturable bacteria from Brazilian mangrove sediment. **World Journal Of Microbiology And Biotechnology**, [s.l.], v. 25, n. 7, p.1305-1311, 14 mar. 2009. Springer Science and Business Media LLC.

DIAS, Armando Cavalcante Franco. Diversidade de bactérias do sedimento de manguezal da ilha do Cardoso Cananéia-São Paulo. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2008

DIAS, Pedro Paulo; BERBARA, Ricardo Luis Louro; DE ARAÚJO FERNANDES, Maria do Carmo. Controle de *Rhizoctonia solani* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* por biopreparados de isolados de *Trichoderma* spp. *Summa Phytopathologica*, v. 39, n. 4, p. 258-262, 2013

DIAS, Léo Ruben Lopes et al. Bioprospecção de Microorganismos de Interesse Biotecnológico Isolados em Ecossistema de Manguezal. *Revista de Investigação Biomédica*, v. 9, n. 1, p. 24-30, 2017.

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

ETHUR, Luciana Zago; CEMBRANEL, Cláudia Zago; SILVA, Antonio Carlos Ferreira da. Selection of *Trichoderma* spp. seeking the control of *Sclerotinia sclerotiorum*, *in vitro*. *Ciência Rural*, v. 31, n. 5, p. 885-887, 2001.

FAO. Food and Agricultural Organization of the United Nations. Hunger. Disponível em: <www.fao.org/hunger>. Acesso em: 15 Abri. 2018.

Fenton, A. M., Stephens, P. M., Crowley, J., O'callaghan, M., & O'gara, F. (1992). Exploitation of gene (s) involved in 2, 4-diacetylphloroglucinol biosynthesis to confer a new biocontrol capability to a *Pseudomonas* strain. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(12), 3873-3878.

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

FENILLE, Roseli Chela; SOUZA, Nilton Luiz de. Efeitos de materiais orgânicos e da umidade do solo na patogenicidade de *Rhizoctonia solani* Kühn GA-4 HGI ao feijoeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 34, n. 10, p. 1959-1967, 1999.

FERNANDES, Fabrício Oliveira. Desempenho de cultivares de milho e soja para resistência a Noctuídeos e Pentatomídeos e análise econômica. 2017. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Pelotas.

FERREIRA, Léo Pires; LEHMAN, P. S.; ALMEIDA, A. M. R. Doenças da soja no Brasil. Embrapa Soja-Circular Técnica (INFOTECA-E), 1979.

FERREIRA, T. O. et al. Are mangrove forest substrates sediments or soils? A case study in southeastern Brazil. *Catena*, v. 70, n. 1, p. 79-91, 2007.

GOMES, Nei Sebastião Braga; GRIGOLETTI JUNIOR, A.; AUER, Celso Garcia. Seleção de antagonistas para o controle de *Cylindrocladium spathulatum* em erva-mate. **Embrapa Florestas-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2001.

GHOSH, A., Dey, N., Bera, A., Tiwari, A., Sathyanitanjan, K. B., Chakrabarti, K., Chattopadhyay, D. (2010) Culture independent molecular analysis of bacterial communities in the mangrove sediment of Sundarban, India. *Saline Systems* 6:1

FOX, Tim; FIMECHE, Ceng. Global food: waste not, want not. London: Institution of Mechanical Engineers, 2013.

FOUILLEUX, Georges; REVELLIN, Cécile; CATROUX, Gérard. Short-term recovery of *Bradyrhizobium japonicum* during an inoculation process using mineral microgranules. **Canadian journal of microbiology**, v. 40, n. 4, p. 322-325, 1994.

GIRI, C., Ochieng, E., Tieszen, L. L., Zhu, Z., Singh, A., Loveland, T., Masek, J., Duke, N. (2011) Status and distribution of mangrove forests of the world using Earth observation satellite data. *Global Ecology and Biogeography*, 20: 154-159.

GOMES, Marisa Prado et al. Agricultura mundial: evolução, avanços e novos desafios. Desafios do cerrado: como sustentar a expansão da produção com produtividade e competitividade-Cuiabá: Associação Mato-grossense dos Produtores de Algodão, p. 11-44, 2016.

GODOY, Cláudia Vieira. Manejo de doenças na cultura da soja. In: Embrapa Soja-Artigo em anais de congresso (ALICE). In: WORKSHOP CTC AGRICULTURA, 16., 2017, Rio Verde. Agricultura-Resultados 2017. Rio Verde: Centro Tecnológico Comigo, 2017.

GOULART, Augusto César Pereira. Fungos em sementes de soja: detecção e importância. **Embrapa Agropecuária Oeste-Documentos (INFOTECA-E)**, 1997.

GOUDJAL, Yacine et al. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off and promotion of tomato plant growth by endophytic actinomycetes isolated from native plants of Algerian Sahara. *Microbiological research*, v. 169, n. 1, p. 59-65, 2014.

GHINI, R.; ZARONI, M.M.H. Relacao entre coberturas vegetais e supressividade de solos a *Rhizoctonia solani*. *Fitopatologia Brasileira*, v. 26, n. 1, p. 10-15, 2001.

GHIZELINI, A. M., Mendonça-Hagler, L. C. S., Macrae, A. (2012) Microbial diversity in Brazilian Mangrove sediments – a mini review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 1242-1254.

GRIGOLLI, JFJ. Manejo de Doenças na Cultura da Soja. LOURENÇÃO, AL F.; GRIGOLLI, JFJ; MELOTTO, AM; PITOL, C, p. 205-223, 2014.

GNANAMANICAKAM, S.S. Biological controlo *f crop* diseases. Springer. New York, NY. 2002.

HAMZAH, Tuan Noraida Tuan et al. Diversity and characterization of endophytic fungi isolated from the tropical mangrove species, *Rhizophora mucronata*, and identification of potential antagonists against the soil-borne fungus, *Fusarium solani*. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 1707, 2018.

HOLGUIN, G. et al. La Microbiologia de los manglares. Bosque em la frontera entre el mar y la tierra. *Cienc. Desarro.*, n. 25, n. 144, p. 26-35, 1999.

HOLGUIN, G., Vazquez, P., Bashan, Y. (2001) The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation, and rehabilitation of mangrove ecosystems: an overview. *Biology and Fertility of Soil*, 33: 265-278.

HAO, Lingyun et al. Inhibition of tomato early blight disease by culture extracts of a *Streptomyces puniceus* isolate from mangrove soil. **Phytopathology**, v. 109, n. 7, p. 1149-1156, 2019.

ITO, Margarida Fumiko. PRINCIPAIS DOENÇAS DA CULTURA DA SOJA E MANEJO INTEGRADO. *Nucleus*, Ituverava, v. 10, n. 3, june 2013. ISSN 1982-2278. Disponível em: <<http://www.nucleus.feituverava.com.br/index.php/nucleus/article/view/908>>. Acesso em: 24 june 2019. doi:<http://dx.doi.org/10.3738/nucleus.v0i0.908>.

KAVAMURA, V. N.; TAKETANI, R. G.; LANCONI, M. D.; ANDREOTE, F. D.; MENDES, R.; MELO, I. S.. Water regime influences bulk soil and rhizosphere of *Cereus jamacaru* bacterial communities in the Brazilian Caatinga biome. *Plos One*, 2013.

KALICKA-WOZNIAK, Krystyna et al. Evaluation of polysaccharides content in fruit bodies and their antimicrobial activity of four *Ganoderma lucidum* (W Curt.: Fr.) P. Karst. strains cultivated on different wood type substrates. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, v. 81, n. 1, 2012.

KAYALVIZHI, K.; KATHIRESAN, K. Microbes from wastewater treated mangrove soil and their heavy metal accumulation and Zn solubilization. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 22, p. 101379, 2019.

KELECOM, A. (2002) Secondary metabolites from marine microorganisms. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*, v. 74(1), p. 151-170

KIMURA, M. (1980) A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16:111-120.

KINKARTZ, S. Crescimento populacional e o desafio da alimentação. Disponível em: <<http://www.ufjf.br/ladem/2012/02/28/crescimento-populacional-e-o-desafio-da-alimentacao-por-sabine-kinkartz/>> Acesso: 15 abril 2018.

KLOEPPER, J. W.; SCHROTH, M. N. Development of a powder formulation of rhizobacteria for inoculation of potato seed pieces. **Phytopathology**, v. 71, n. 6, p. 590-592, 1981.

KNAAK, Neiva et al. Interações de *Bacillus thuringiensis* e o controle de fitopatógenos. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, v. 38, p. 48-53, 2009.

KUMAR, Sudhir et al. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular biology and evolution**, v. 35, n. 6, p. 1547, 2018.

KUSKE, C. R. et al. Diverse uncultivated bacterial groups from soils of the arid southwestern United States that are present in many Geographic regions. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.63, n.09, p. 3614-21,1997.

LANNA FILHO, Roberto; FERRO, Henrique Monteiro; DE PINHO, Renata Silva Canuto. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. *Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas*, v. 4, n. 2, 2010.

LEE, Jung Yeop; MOON, Surk Sik; HWANG, Byung Kook. Isolation and in vitro and in vivo activity against *Phytophthora capsici* and *Colletotrichum orbiculare* of phenazine-1-carboxylic acid from *Pseudomonas aeruginosa* strain GC-B26. **Pest Management Science: formerly Pesticide Science**, v. 59, n. 8, p. 872-882, 2003.

LIANG, Chengyue et al. Distribution of bacterial polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) ring-hydroxylating dioxygenases genes in oilfield soils and mangrove sediments explored by gene-targeted metagenomics. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 103, n. 5, p. 2427-2440, 2019.

LIMA, N.G.B.; GALVANI, E.G. Mangrove microclimate: a case study from Southeastern Brazil. *Earth Interactions*, Boston, v. 17, p. 2-16, 2013.

LIMA, Daniella Vilela. Análise da diversidade, abundância e estrutura funcional da comunidade microbiana de três manguezais do Estado de São Paulo, Brasil. 2012. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

LUCON, Cleusa Maria Mantovanello et al. Bioprospecção de isolados de *Trichoderma* spp. para o controle de *Rhizoctonia solani* na produção de mudas de pepino. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 44, n. 3, p. 225-232, 2009.

LUCON, C.M.M; CORREIA, C.C. Efeito de rizobactérias no controle de *Rhizoctonia solani* e na promoção do crescimento de plantas de pepino. *Instituto Biológico, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Vegetal: Arquivos do Instituto Biológico*, v. 70, n.3, p.100-103, 2003.

LU, Xiaoxue et al. Isolation and characterization of *Bacillus altitudinis* JSCX-1 as a new potential biocontrol agent against *Phytophthora sojae* in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. **Plant and soil**, v. 416, n. 1, p. 53-66, 2017.

MAGNONI, D. A Importância Socioeconômica da Soja IMeN – Instituto de Metabolismo e Nutrição, 2002.

MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B.; ASSIS, S. M. P.; GOMES, A. M. A.; NASCIMENTO, A. R. P.; DONATO, V. M. T. S. Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica*, Recife, v. 1, p. 89-111, 2004.

MAZZUCHELLI, Rita de Cássia Lima; SOSSAI, Bruno Ferrari; ARAÚJO, Fábio Fernando de. Inoculação de *Bacillus subtilis* e *Azospirillum brasilense* na cultura do milho. In: *Colloquium Agrariae*. 2015. p. 40-47.

MAHDY, M. E.; KHALIFA, E. Z.; Z EL-SHENNAWY, Rania. Biological control of *Meloidogyne javanica* and *Rhizoctonia solani* on soybean by formulation of *Bacillus thuringiensis* and *Trichoderma harzianum*. **Arab Universities Journal of Agricultural Sciences**, v. 14, n. 1, p. 411-423, 2006.

MARQUES, Eder et al. Facultative extremophile bacteria improving the germinability of *Eucalyptus urophylla* ST blake seeds. **Revista Árvore**, v. 38, n. 3, p. 489-494, 2014.

MELO, I. S. de; VALARINI, P. J. Potential of rhizobacteria in the control of *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. in cucumber (*Cucumis sativum* L.). *Scientia Agricola*, v. 52, n. 2, p. 326-330, 1995.

MEYER, M.C., YORINORI, J.T. Incidência de doenças da soja em regiões tropicais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, Londrina, 1999. Anais...Londrina: Embrapa Soja, 1999. p.457. (Documentos, 124)

MORANDI, Marcelo Augusto Boechat et al. Controle biológico de fungos fitopatogênicos. Embrapa Meio Ambiente-Artigo em periódico indexado (ALICE), 2009.

Moënné-Loccoz, Y., Naughton, M., Higgins, P., Powell, J., O'connor, B., & O'gara, F. (1999). Effect of inoculum preparation and formulation on survival and biocontrol efficacy of *Pseudomonas fluorescens* F113. *Journal of applied microbiology*, 86(1), 108-116.

MOHAMED, Sahar S. et al. Characterization and applications of exopolysaccharide produced by marine *Bacillus altitudinis* MSH2014 from Ras Mohamed, Sinai, Egypt. **Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 5, n. 3, p. 204-209, 2018.

NAKASHIMA, T., Iwatsuki, M., Ochiai, J., Kamiya, Y., Nagai, K., Matsumoto, A., et al. (2014) Mangromicins A and B: structure and antitrypanosomal activity of two new cyclopentadecane compounds from *Lechevalieria aerocolonigenes* K10-0216. *J Antibiot* (Tokyo), v. 67(3), p. 253-260. doi: 10.1038/ja.2013.129

OTTONI, Júlia Ronzella et al. Prospecção e análise funcional de enzimas provenientes de microbiota de manguezais do Estado de São Paulo. 2015.

O'CALLAGHAN, Maureen. Microbial inoculation of seed for improved crop performance: issues and opportunities. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 100, n. 13, p. 5729-5746, 2016.

O'SULLIVAN, Louise A.; MAHENTHIRALINGAM, Eshwar. Biotechnological potential within the genus *Burkholderia*. **Letters in applied microbiology**, v. 41, n. 1, p. 8-11, 2005.

PEREIRA, P., Ibáñez, S. G., Agostini, E., & Etcheverry, M. (2011). Effects of maize inoculation with *Fusarium verticillioides* and with two bacterial biocontrol agents on seedlings growth and antioxidative enzymatic activities. *Applied soil ecology*, 51, 52-59.

PEREIRA, Sónia Gonçalves. **Pseudomonas aeruginosa em ambiente termal: prevalência e determinantes de patogenicidade**. 2014. Tese de Doutorado.

PLASENCIA-MÁRQUEZ, O. et al. Primeiro relato de doença da soja (*Glycine max*) causada por *Pseudomonas aeruginosa* em Cuba. **Doença das plantas**, v. 101, n. 11, pág. 1950-1950, 2017.

PHILIPPOT, Laurent et al. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 11, p. 789-799, 2013.

PRAKASH, A., Thavaselvam, D., Kumar, A., Kumar, A., Arora, S., Tiwari, S., ... Sathyaseelan, K. (2014). Isolation, identification and characterization of *Burkholderia pseudomallei* from soil of coastal region of India. *Springerplus*, 3, 438. <http://dx.doi.org/10.1186/2193-1801-3-438>.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S. Regulando o crescimento e o desenvolvimento: os hormônios vegetais. In: RAVEN, P.H. **Biologia vegetal**. Tradução de Jane Elizabeth Kraus. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p.649-675.

REDDY, M. S.; HYNES, R. K.; LAZAROVITS, G. Relationship between in vitro growth inhibition of pathogens and suppression of preemergence damping-off and postemergence root rot of white bean seedlings in the greenhouse by bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 113-119, 1994.

REIS, E.M.; CASA, R.T.; MEDEIROS, C.A. Diagnose, patometria e controle de doenças de cereais de inverno. Londrina: E.S. Comunicação S/C Ltda, 2001, 94p.

RODRIGUES E., SERRA, A. L., PEREIRA FONSECA, M., COSTA, E; RAMOS S. A., DOMINGUES, A., CRUZ, A., BEDOLO, E. C., ROCHA TOMÉ, R., PEREIRA, R. L. Coleção de culturas de microrganismos de interesse biotecnológico e didático. *EccoS Revista Científica*, vol. 1, núm. 1, 1999, p. 109-114.

SANTOS, H. F., Cury, J. C., do Carmo, F. L., Dos Santos, A. L., Tiedje, J., van Elsas, J. D., Rosado, A. S., Peixoto, R. S. (2011) Mangrove Bacterial Diversity and the Impact of Oil Contamination Revealed by Pyrosequencing: Bacteria Proxies for Oil Pollution. *PLoS ONE* 6(3): e16943.

SAMPAIO, Julia et al. Antagonismo de bactérias do gênero *Burkholderia* isoladas da cultura de arroz antagonica contra fungos fitopatogênicos. **Anais da Semana Científica Johanna Döbereiner**, 2017.

SILVA, Caroline Souza Pamplona da. **Caracterização molecular de cianobactérias isoladas de ecossistema manguezal do Estado de São Paulo e identificação de produtos naturais**. 2010. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y. (1995). Manguezal. Ecosistema entre a Terra e o Mar. Caribbean Ecological Research. São Paulo, 64p.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y (2000). Grupo de ecossistemas: manguezal, marismas e apicum. Ecological Research. São Paulo, 64p.

SCHLINDWEIN, G. et al. Influência da inoculação de rizóbios sobre a germinação e o vigor de plântulas de alface. **Ciência Rural**, v.38, n.3, p.658-664, 2008.

SECCON, Denny Marcel. Análise metagenômica do microbioma de mangue do Litoral do Paraná. 2016.

SOUZA, Cynthia S. et al. Isolamento e seleção de microrganismos degradadores de derivados de petróleo. In: Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás. 2005.

SOUZA, Elaine Costa et al. Caracterização citomorfológica, cultural, molecular e patogênica de *Rhizoctonia solani* Kühn associado ao arroz em Tocantins, Brasil. Summa Phytopathologica, p. 129-136, 2007.

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

SALES, Rejane Souza de Aquino et al. Controle biológico de *rhizoctonia solani*, agente causal do tombamento do tomateiro, com *Trichoderma spp.* 2011.

SILVA, Katiane Santiago et al. Atividade antagônica *in vitro* de isolados de *Trichoderma spp.* ao fungo *Phytophthora citrophthora*. Semina: Ciências Agrárias, p. 749-753, 2008.

SNEH, B.; BURPEE, L.; OGOSHI, A. Identification of *Rhizoctonia* species. Minnesota: USA. APS Press, 1991.

SOUZA, Elaine Costa et al. Caracterização citomorfológica, cultural, molecular e patogênica de *Rhizoctonia solani* Kühn associado ao arroz em Tocantins, Brasil. Summa Phytopathologica, p. 129-136, 2007.

SPALDING, M., BLASCO, F., FIELD, C. World Mangrove Atlas. Okinawa: The International Society for Mangrove Ecosystems. 1997, 178p.

SPALDING, M. D.; Kainuma, M.; Collins, L. (2010) World atlas of mangroves. Earthscan, 399 London, UK. 338 pp.

STACKEBRANDT, EaBMG; GOEBEL, Brett M. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. International journal of systematic and evolutionary microbiology, v. 44, n. 4, p. 846-849, 1994.

TAKETANI, R. G., Yoshiura, C. A., Dias, A. C. F., Andreote, F. D., Tsai, S. M. (2010) Diversity and identification of methanogenic archaea and sulfate-reducing bacteria in sediments from a pristine tropical mangrove. Antonie van Leeuwenhoek, 97: 401-411.

TIXEIRA, Marcos Ferreira. Isolamento, caracterização e seleção de bactérias associadas a *Acacia mangium* com potencial para promoção de crescimento em mudas de *Eucalyptus urograndis*. 2021. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

TOLEDO-SOUZA, E. D. et al. Sistemas de cultivos, sucessões de culturas, densidade do solo e sobrevivências de patógenos de solo. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, DF, v. 43, n.8, p. 971-978, 2008.

THATOI, H., Behera, B.C., Mishra, R.R., Dutta, S.K. (2013) Biodiversity and biotechnological potential of microorganisms from mangrove ecosystems: a review. Ann. Microbiol., v. 63, p. 1-19. doi:10.1007/s13213-012-0442-7

VARON-LOPEZ, M., Dias, A. C. F., Fasanella, C. C., Durrer, A., Melo, I. S., Kuramae, E. E., Andreote, F. D. (2014) Sulphur-oxidizing and sulphate-reducing communities in Brazilian mangrove sediments. Environmental Microbiology 16: 845-855

VILLARREAL-DELGADO, María Fernanda et al. El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista mexicana de fitopatología*, v. 36, n. 1, p. 95-130, 2018.

WINTER, João Cadore. *Manejo da Lavoura de Soja para Produção de Sementes*. 2016.

XIMENES, Arimatéa et al. Spatial assessment of the bioclimatic and environmental factors driving mangrove tree species' distribution along the Brazilian coastline. *Remote sensing*, v. 8, n. 6, p. 451, 2016.

YANG, Y.; WANG, H.; TANG, J. & CHEN, X. Effects of weed management practices on orchard soil biological and fertility properties in southeastern China. *Soil Till. Res.*, 93:179-185, 2007.

ZHENG, X. Y.; SINCLAIR, J. B. The effects of traits of *Bacillus megaterium* on seed and root colonization and their correlation with the suppression of *Rhizoctonia* root rot of soybean. *Biocontrol*, v. 45, n. 2, p. 223-243, 2000.