



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA



ROSILENE CRISTINA DE MATOS

**BIOPROSPECÇÃO DO POTENCIAL ANTAGÔNICO DE BACTÉRIAS DO
QUADRILÁTERO FERRÍFERO A *Colletotrichum lindemuthianum***

OURO PRETO
MINAS GERAIS – BRASIL

2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA



ROSILENE CRISTINA DE MATOS

**BIOPROSPECÇÃO DO POTENCIAL ANTAGÔNICO DE BACTÉRIAS DO
QUADRILÁTERO FERRÍFERO A *Colletotrichum lindemuthianum***

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Ouro
Preto, como parte das exigências
do Programa de Pós-Graduação
em Biotecnologia, para obtenção
do título de *Magister Scientiae*
em Biotecnologia.

Área de Concentração: Genômica e
Proteômica.

Orientador: Prof. Dr. Leandro Marcio Moreira

OURO PRETO
MINAS GERAIS – BRASIL

2020

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

M433b Matos, Rosilene Cristina de .
Bioprospecção do potencial antagônico de bactérias do Quadrilátero
Ferrífero a *Colletotrichum lindemuthianum*. [manuscrito] / Rosilene
Cristina de Matos. - 2020.
70 f.: il.: color., gráf., tab..

Orientador: Prof. Dr. Leandro Márcio Moreira.
Dissertação (Mestrado Acadêmico). Universidade Federal de Ouro
Preto. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de
Biotecnologia.

Área de Concentração: Genômica e Proteômica.

1. Estimulantes. 2. Sistemas de controle biológico. 3. Quadrilátero
Ferrífero (MG). I. Moreira, Leandro Márcio. II. Universidade Federal de
Ouro Preto. III. Título.

CDU 616(815.1)

Bibliotecário(a) Responsável: Celina Brasil Luiz - CRB6 - 1589



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA




ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Aos 02 dias do mês de março do ano de 2020, às 09:00 horas, nas dependências do Instituto de Ciências Exatas e Biológicas (Iceb), foi instalada a sessão pública para a defesa de dissertação da mestranda Rosilene Cristina de Matos, sendo a banca examinadora composta pelo Prof. Dr. Leandro Marcio Moreira (Presidente - UFOP), pelo Prof. Dr. Gustavo Henrique Bianco de Souza (Membro - UFOP), pela Profa. Dra. Marisa Vieira de Queiroz (Membro - Externo). Dando início aos trabalhos, o presidente, com base no regulamento do curso e nas normas que regem as sessões de defesa de dissertação, concedeu à mestranda 40 minutos para apresentação do seu trabalho intitulado "Bioprospecção do Potencial Antagônico de Bactérias do Quadrilátero Ferrífero a Colletotrichum Lindemuthianum", na área de concentração: Genômica e Proteômica. Terminada a exposição, o presidente da banca examinadora concedeu, a cada membro, um tempo para perguntas e respostas à candidata sobre o conteúdo da dissertação, na seguinte ordem: Primeiro Profa. Dra. Marisa Vieira de Queiroz; segundo Prof. Dr. Gustavo Henrique Bianco de Souza; terceiro Prof. Dr. Leandro Marcio Moreira. Dando continuidade, ainda de acordo com as normas que regem a sessão, o presidente solicitou aos presentes que se retirassem do recinto para que a banca examinadora procedesse à análise e decisão, anunciando, a seguir, publicamente, que a mestranda foi aprovada, sob a condição de que a versão definitiva da dissertação deva incorporar todas as exigências da banca, devendo o exemplar final ser entregue no prazo máximo de 60 (sessenta) dias à Coordenação do Programa. Para constar, foi lavrada a presente ata que, após aprovada, vai assinada pelos membros da banca examinadora e pela mestranda. Ouro Preto, 02 de março de 2020.



Prof. Dr. Leandro Marcio Moreira

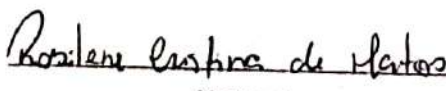
Presidente



Prof. Dr. Gustavo Henrique Bianco de Souza

XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

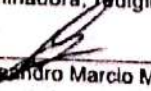
Profa. Dra. Marisa Vieira de Queiroz
(Participação por Videoconferência)



Rosilene Cristina de Matos

Mestranda

Certifico que a defesa realizou-se com a participação a distância do(s) membro(s) Profa. Dra. Marisa Vieira de Queiroz e que, depois das arguições e deliberações realizadas, cada participante a distância afirmou estar de acordo com o conteúdo do parecer da banca examinadora, redigido nesta ata.



Prof. Dr. Leandro Marcio Moreira

Presidente

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela minha vida, por iluminar meus caminhos e que me permitiu mais está conquista em minha vida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Leandro Moreira, pela oportunidade e confiança, por me acolher no LabGiba, pela paciência, dedicação, compreensão e incentivo, mesmo com todas dificuldades encontradas ao longo destes anos.

Aos meus pais, Ivete Cleuzeli das Graças Matos e José de Fátima Matos, e a toda minha família por apoiarem e me incentivarem a persistir nos meus sonhos, e fazer o possível para que eles se tornem realidade.

A toda equipe do LabGiba; aos Ma. Camila Lemes, Ma. Isabella Cordeiro, Camila Henriques, Ana Karla, Dra. Angélica Sanchez e Dr. Washington Caneschi.

As amigas do Lab DNA Repair, em especial, Sibebe Silva que me auxiliou em grande parte dos ensaios desde as etapas mais modestas graças a sua experiência e dedicação excepcional, gratidão a você minha amiga, Ma. Maria Rosilene, Lorrana Cachuíte e, por sempre se disponibilizarem auxiliar e oferecerem palavras de incentivo e carinho em momentos que se faziam necessários. A Prof. Dra Camila Carrião pelos ensinamentos e aprendizado.

Aos integrantes do LGMF/BIOAGRO - UFV – Campus Viçosa, em especial, Mísia e Me. Leandro, bem como a Profa. Dr. Marisa Vieira de Queiroz, por me receber e prestar diversos esclarecimentos.

A banca examinadora pelo aceite de convite e pelas preciosas contribuições que certamente serão esclarecedoras.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, bem como todos os docentes que acrescentam na minha formação e ao secretário Me. Josino Barbosa que desenvolve seu trabalho com maestria se tornando essencial neste processo.

As amigas de Viçosa, em especial, Lineane e Álvaro que apesar de não estarem presente, foram essenciais me incentivando, apoiando e compreendendo a minha ausência sempre.

Aos meus amigos de pós-graduação pelos momentos alegres que vivenciamos.

À todos que não foram mencionados, mas que contribuíram de maneira direta ou indiretamente para que esse sonho se tornasse realidade.

A UFOP pelo ensino de qualidade, a CAPES e a FAPEMIG pelo financiamento que tornou este projeto executável.

A todos minha sincera gratidão.

*“Não queiras conhecer tudo,
deixa um espaço livre para te conhecer”*

Vergílio Ferreira

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	VI
LISTA DE TABELAS.....	VIII
LISTA DE QUADROS	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS	IX
RESUMO	X
ABSTRACT	XI
1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1 O quadrilátero ferrífero	12
1.1.1 Biodiversidade do quadrilátero ferrífero.....	12
1.2 A rizosfera.....	12
1.3 Rizobactérias e promoção de crescimento vegetal	13
1.3.1 Solubilização de Fosfato	14
1.3.2 Produção de Sideróforos	15
1.4 Bactérias inoculantes	16
1.5 Rizobactérias e controle biológico	16
1.6 Regulamentação do uso das BCPC's na agricultura	17
1.7 Feijão.....	18
1.7.1 Importância da cultura.....	19
1.8 <i>Fusarium oxysporum</i>	20
1.9 Antracnose	21
1.9.1 A antracnose do feijoeiro.....	21
1.9.2 Características gerais do patógeno <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	21
1.9.3 Importância econômica	23
1.9.4 Controle	23
1.9.5 Desafio.....	23
2. HIPÓTESES.....	25
2.1 JUSTIFICATIVAS	25
3. OBJETIVOS.....	26
3.1 Objetivo geral.....	26
3.2 Objetivos específicos	26
4. MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1 Microrganismos utilizados	27
4.2 Ativação e ensaios de pureza das culturas de microrganismos	31

4.3	Prospecção da antibiose dos isolados bacterianos contra <i>Fusarium oxysporum</i>	31
4.4	Ensaio de atividade antagonista a <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	32
4.4.1	Ensaio de antagonismo por inibição direta.....	32
4.4.2	Ensaio de antagonismo por inibição indireta por meio de compostos voláteis.....	32
4.4.3	Ensaio de antagonismo por inibição indireta por meio de compostos difusíveis	32
4.4.4	Ensaio de antagonismo por inibição indireta após análise de termoestabilidade dos isolados	33
4.5	Ensaio para promoção de crescimento de plantas <i>in vitro</i>	33
4.5.1	Ensaio de solubilização de fosfato.....	33
4.5.2	Ensaio de produção de sideróforos.....	34
4.6	Ensaio em casa de vegetação para promoção de crescimento de plantas.....	34
4.6.1	Descontaminação das sementes	34
4.6.2	Inoculação via microbiolização de sementes	35
4.6.3	Inoculação em substrato.....	36
4.7	Identificação das bactérias	38
4.7.1	Extração do DNA dos isolados bacterianos	39
4.7.2	Sequenciamento – região: v4/v5 - 16 s.....	39
5.	RESULTADOS	40
5.1	Prospecção da antibiose dos isolados bacterianos contra <i>Fusarium oxysporum</i>	40
5.2	Ensaio de atividade antagonista a <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	41
5.3	Ensaio para promoção de crescimento de plantas <i>in vitro</i>	47
5.4	Ensaio para promoção de crescimento de plantas em casa de vegetação <i>in vivo</i>	49
5.5	Identificação das bactérias	51
5.6	Potencial de aplicação dos isolados.....	51
6.	DISCUSSÃO	52
6.1	Avaliação do potencial antagonico a plantas e de promoção de crescimento vegetal.....	52
6.2	Identificação das bactérias	55
	CONCLUSÕES	57
	PERSPECTIVAS	58
	ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O MESTRADO	59
	REFERÊNCIAS	61

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Demonstração das principais interações bacterianas que ocorrem na região da rizosfera. (Felestrino *et al.*, 2017). 13
- Figura 2.** Demonstração da interação da rizosfera com a raiz das plantas. Imagem da internet (https://player.slideplayer.com.br/72/12235894/slides/slide_16.jpg) 14
- Figura 3.** Desenvolvimento da planta do feijoeiro e suas principais estruturas. Imagem da internet (<https://alicebrancoweffort.blogspot.com/2017/02/como-plantar-feijao.html>). 19
- Figura 4.** Lesões de antracnose em folhas, sementes e vagens de feijão. Imagem da internet (<https://www.adama.com/brasil/pt/espaco-do-agricultor/feijao>). 23
- Figura 5.** Sementes em placas de Petri, por 48h, para verificação da completa descontaminação. 35
- Figura 6.** Inoculação de isolados bacterianos em sementes previamente esterilizadas em Erlenmeyers. 36
- Figura 7.** Inoculação de isolados bacterianos em recipientes contendo substrato comercial previamente esterilizado. 36
- Figura 8.** Sementes de *Phaseolus vulgaris* inoculadas, acondicionadas em casa de vegetação. 38
- Figura 9.** Plantas de *Phaseolus vulgaris* em desenvolvimento em casa de vegetação, sob as mesmas condições climáticas. 38
- Figura 10.** Avaliação da antibiose dos isolados contra a inibição do crescimento de *F. oxysporum*. As barras vermelhas destacam os isolados que inibiriam acima de 50% do crescimento micelial do patógeno. As barras em azul destacam os isolados descartadas das análises posteriores, devido à baixa taxa inibitória. 40
- Figura 11.** Ensaio de prospecção de antibiose dos isolados contra o fungo *F. oxysporum* para o isolado RPT1. Nota-se intensa diferenciação macromorfológica do fungo na presença do isolado bacteriano. 41
- Figura 12.** Avaliação da atividade antagonica dos isolados por meio do ensaio de inibição direta por contra o crescimento micelial de *C.lindemuthianum*. As barras vermelhas destacam os 6 isolados que inibiriam acima de 60% do crescimento micelial do patógeno. As barras em amarelo destacam 4 isolados que inibiram 50 e 53% do crescimento micelial do patógeno. As barras em azul destacam os isolados que atingiram inibições abaixo das faixas classificatórias observadas (< 60%). 42
- Figura 13.** Avaliação da atividade antagonica dos isolados por meio do ensaio de inibição indireta por compostos não voláteis difusíveis contra o crescimento micelial de *C.lindemuthianum*. As barras vermelhas destacam os 10 isolados que obtiveram os melhores resultados nos ensaios de inibição direta e indireta contra o crescimento micelial do patógeno. As barras em azul destacam os isolados desconsiderados das análises posteriores. 43
- Figura 14.** Avaliação da atividade antagonica dos isolados por meio do ensaio de inibição indireta por compostos voláteis contra o crescimento micelial de *C.lindemuthianum*. As barras vermelhas destacam os 4 isolados que obtiveram os melhores resultados no ensaio. As barras em azul destacam os isolados que tiveram desempenho inferior a 20% 44

Figura 15. Avaliação da atividade antagônica dos isolados por meio do ensaio de inibição indireta por meio do ensaio de termoestabilidade dos isolados contra o crescimento micelial de *C.lindemuthianum*. As barras vermelhas destacam o único isolado (RPT1) a resistir ao tratamento térmico e inibir cerca de 90% do desenvolvimento micelial do patógeno..... 45

Figura 16. Avaliação dos ensaios de inibição direta e indireta dos isolados contra o crescimento micelial de *C. lindemuthianum*. Em (A) Inibição direta, no qual os isolados interagem diretamente com o patógeno. Em (B) Inibição indireta por compostos voláteis, no qual os compostos voláteis produzidos pelos isolados interagem com o patógeno. Em (C) Inibição indireta por compostos não-voláteis difusíveis, no qual os compostos produzidos em meio sólido interagem com o patógeno. Em (D) Inibição indireta após verificada termoestabilidade dos isolados, no qual os compostos produzidos pelos isolados após serem submetidos ao tratamento térmico (80°C – 5min), interagem com o patógeno. A= isolado bacteriano; T= disco micelial do patógeno; NC= ausência de isolado bacteriano e patógeno; ADM= meio sólido contendo compostos produzidos pelos isolados bacterianos... 46

Figura 17. Análise das inibições nos diferentes ensaios realizados com os 5 isolados com maior potencial de antagonismo ao patógeno *C. lindemuthianum*. 47

Figura 18. Ensaio de solubilização de fosfato em meio sólido fosfato. Em (A, B, C) os isolados LR1, C23 e C74 nos quais o resultado foi positivo para solubilização de fosfato. Em (D, E) os isolados RA4 e RPT1 nos quais o resultado foi negativo, não sendo possível visualizar a formação do halo transparente pelo método utilizado. 48

Figura 19. Ensaio de produção de sideróforos em meio sólido. Em (A) o isolado LR1, que apresentou halo branco e por tanto, considerado negativo para produção de sideróforos. Em (B, C) os isolados C23 e C74 nos quais o resultado foi positivo para produção de sideróforos. Em (D, E) os isolados RA4 e RPT1 nos quais o resultado foi negativo, não sendo possível visualizar a formação do halo pelo método utilizado..... 49

Figura 20. Ensaio de promoção de crescimento vegetal, em plantas de *Phaseolus vulgaris* apresentando estiolamento durante desenvolvimento em casa de vegetação (1º ensaio)..... 50

Figura 21. Ensaio de promoção de crescimento vegetal, em plantas de *Phaseolus vulgaris* apresentando clorose, ausência de germinação e encharcamento (lodo) durante desenvolvimento em casa de vegetação (2º ensaio). 50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Perfil dos isolados frente aos ensaios <i>in vitro</i> da atividade fisiológica e antifúngica contra <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> e <i>Fusarium oxysporum</i>	51
--	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Amostras de plantas da região do Quadrilátero Ferrífero e de canga da região do Jardim Canadá – Nova Lima. Fonte: Adaptado de (Caneschi et al., 2018)	27
Quadro 2. Identificação dos isolados após o sequenciamento 16S.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS

μL – Microlitro

BPCP – Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas

DNA - Ácido desoxirribonucleico

dNTP - Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

Ca³PO⁴ – Fosfato de Cálcio

MgCl².6H₂O – Cloreto de magnésio

MgSO⁴.7H₂O – Sulfato de magnésio

KCl – Cloreto de Potássio

(NH₄)₂SO⁴ – Sulfato de amônia

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio

Km – Quilômetro

mL – Mililitro

mm – Milímetro

mM - MiliMol

nm – Nanômetro

QF – Quadrilátero Ferrífero

UV – Ultravioleta

Cv – Cultivar

CIC89 – Cepa raça 89 de *Colletotrichum lindemuthianum*

RESUMO

O Quadrilátero Ferrífero (QF) por compreender ambientes únicos é considerado uma área de particular importância biológica, as bactérias associadas as raízes de plantas podem beneficia-las por meio de estímulo ao seu desenvolvimento, assim como na proteção à patógenos. Os fungos fitopatogênicos são responsáveis por grande parte das perdas na agricultura, destes, a fusariose ocasionada pelo fungo *Fusarium oxysporum* e antracnose causada pelo fungo fitopatogênico *Colletotrichum lindemuthianum*, são doenças de relativa importância visto a severidade e o difícil controle que normalmente é realizado por meio de produtos químicos. Neste contexto, este estudo objetivou investigar o potencial antagonico e a de promoção de crescimento vegetal em plantas de *Phaseolus vulgaris* de bactérias extraídas de solos e plantas da região do Quadrilátero Ferrífero contra o fungo causador da antracnose no feijoeiro *Colletotrichum lindemuthianum*. Para isso, 62 isolados bacterianos obtidos a partir de uma coleção existente no Laboratório de Interação Bactéria Ambiente – LabGiba da Universidade Federal de Ouro Preto, tiveram sua atividade antagonica avaliada inicialmente contra o fungo *Fusarium oxysporum*, e em seguida confrontados contra o fungo alvo desse estudo, *Colletotrichum lindemuthianum* cepa C89 (CICL89). Os 18 isolados que apresentaram potencial de inibição entre 20, 25% e acima de 50% para *Fusarium* foram avaliados quanto á sua atividade antagonica contra CICL89 por meio dos ensaios de inibição direta, indireta por compostos voláteis, indireta por compostos não voláteis difusíveis e ensaio de termoestabilidade dos isolados. Os cinco isolados que obtiveram taxa de inibição acima de 67% foram selecionados para os ensaios de promoção de crescimento vegetal, essencialmente, capacidade de solubilizar fosfato, positiva para 3 isolados, e produzir sideróforos, positivo para 2 isolados. Em seguida procedeu o ensaio em casa de vegetação para verificar o potencial *in vivo*, porém, devido a condições de padronização desfavoráveis os resultados obtidos não puderam ser conclusivos. Dos cinco isolados de interesse, quatro foram identificados como sendo dos gêneros: *Pantoea* e *Acinetobacter*, o isolado LR1 será sequenciado posteriormente para correta identificação. Constatou-se assim que isolados ambientais de um geossistema pouco estudado podem ser eficientes controladores do crescimento de *C. lindemuthianum in vitro*, permitindo estabelecer uma prova de conceito para ensaios de controle biológico deste fitopatógeno em campo.

Palavras-chave: *Colletotrichum lindemuthianum*, antagonismo, Quadrilátero Ferrífero, biocontrole, bioestimulante.

ABSTRACT

The Iron Quadrangle (IQ), as it comprises unique environments, is considered an area of particular biological importance, the bacteria associated with the roots of plants can benefit them by stimulating their development, as well as protecting pathogens. Phytopathogenic fungi are responsible for a large part of the losses in agriculture, of which, the fusariosis caused by the fungus *Fusarium oxysporum* and anthracnose caused by the phytopathogenic fungus *Colletotrichum lindemuthianum*, are diseases of relative importance given the severity and the difficult control that is usually performed through Chemicals. In this context, this study aimed to investigate the antagonistic potential and the promotion of plant growth in *Phaseolus vulgaris* plants from bacteria extracted from soils and plants in the region of the Quadrilátero Ferrífero against the fungus that causes anthracnose in common bean *Colletotrichum lindemuthianum*. For this purpose, 62 bacterial isolates obtained from an existing collection at the Laboratory of Interaction Bacteria Environment - LabGiba of the Federal University of Ouro Preto, had their antagonistic activity evaluated initially against the fungus *Fusarium oxysporum*, and then confronted against the target fungus of this study, *Colletotrichum lindemuthianum* strain C89 (CICL89). The 18 isolates that showed inhibition potential between 20, 25% and above 50% for *Fusarium* were evaluated for their antagonistic activity against CICL89 by means of direct, indirect inhibition by volatile compounds, indirect inhibition by diffusible compounds and assay of thermostability of the isolates. The five isolates that obtained an inhibition rate above 67% were selected for the tests to promote plant growth, essentially, the ability to solubilize phosphate, positive for 3 isolates, and produce siderophores, positive for 2 isolates. Then, the test was carried out in a greenhouse to check the potential in vivo, however, due to unfavorable standardization conditions, the results obtained could not be conclusive. Of the five interests in question, four were identified as being the genera: *Pantoea* and *Acinetobacter*, the LR1 isolate will be sequenced later for correct identification. It was thus found that environmental isolates from a little studied geosystem can be efficient controllers of the growth of *C. lindemuthianum* in vitro, allowing to establish a proof of concept for biological control tests of this phytopathogen in the field.

Keywords: *Colletotrichum lindemuthianum*, antagonism, Iron Quadrangle, biocontrol, biostimulant.

1. INTRODUÇÃO

1.1 O quadrilátero ferrífero

O Quadrilátero Ferrífero, também conhecido como a região mineradora de Minas Gerais, está localizado no Centro-Sul de Minas Gerais e seu embasamento cristalino está situado em áreas circunvizinhas compostas de gnaisses tonalítico-graníticos de idade arqueana com mais de 2,7 bilhões de anos (Dorr, 1969). Compreendendo um espaço físico entre as coordenadas de 19 ° 45 'S. e 20 ° 30' S. e 43 ° 22'30 "W. e 44 ° 7'30" W, situando ao sul de Belo Horizonte, a área abrange cidades como Ouro Preto, Sabará e Santa Barbara (Barbosa, 1980), possuindo uma área total estimada em cerca de 7.000 quilômetros quadrados.

A origem do nome advém da ocorrência de formação de ferro e minério de ferro (Dorr, 1969), e possui clima do tipo tropical chuvoso com invernos secos, tais condições não são refletidas no solo ou na cobertura vegetal, em virtude de alterações particulares de conjuntos litológicos de metassedimentos, constituído de solos em maioria rasos, ferruginosos e pedregosos, que pode ter como vegetação florestas densas, matas secas, cerrados e campos limpos (Barbosa, 1980).

1.1.1 Biodiversidade do quadrilátero ferrífero

O Quadrilátero Ferrífero é definido como uma área de particular importância biológica, pois compreende ambientes únicos, como campos rupestres ferruginosos, que são considerados *hotspots* potenciais da biodiversidade, devido ao alto endemismo de plantas e animais (Carmo; Kamino, 2015). A extração mineral promovida na região coloca em risco a perda da flora e conseqüentemente, a perda de microbiota especializada, o que evidencia a importância em utilizar áreas do Quadrilátero Ferrífero para estudo na prospecção de microrganismos (Jacobi *et al.*, 2011).

1.2 A rizosfera

A rizosfera pode ser definida como a região do solo onde processos mediados por microrganismos são especificamente influenciados pelo sistema radicular. Esta área inclui o solo conectado às raízes das plantas e frequentemente estende alguns milímetros da superfície radicular, sendo um importante ambiente para as interações entre plantas e microrganismos (Hallmann; Rodríguez-Kábana; Kloepper, 1999). Isso porque as raízes das plantas liberam

uma ampla gama de compostos envolvidos para atrair organismos que possam ser benéficos, neutros ou prejudicial para as plantas (Oteino *et al.*, 2015).

O solo é constituído de diversas espécies de microrganismos, dentre eles, fungos, actinomicetos, protozoários, vírus e algas. Diversas bactérias podem ser encontradas no solo associadas à raiz das plantas, observadas em maior número, geralmente são responsáveis por relações ecológicas que podem ser benéficas ou prejudiciais para as plantas (Glick, 2012). De modo que, as bactérias associadas à rizosfera constituem um subconjunto de bactérias do solo denominado rizobactérias (Kloepper *et al.*, 1999).

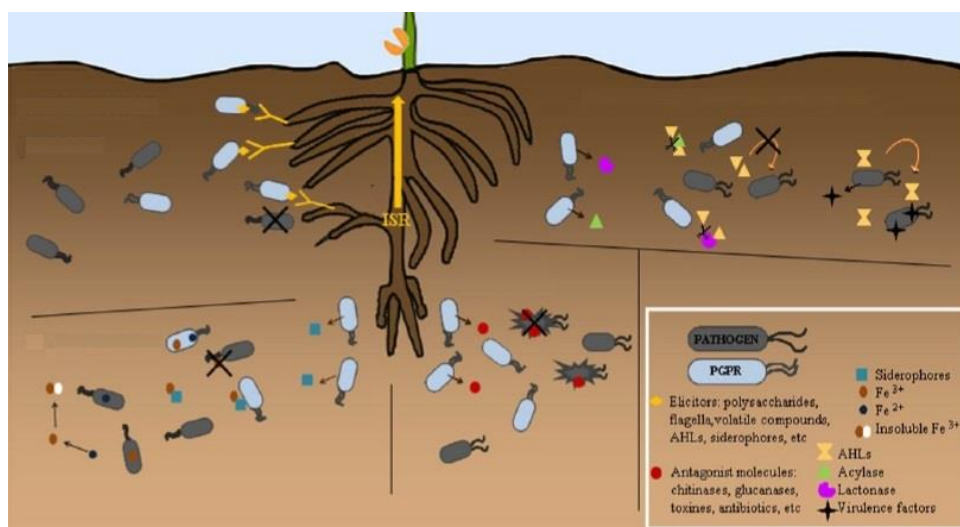


Figura 1. Demonstração das principais interações bacterianas que ocorrem na região da rizosfera. (Felestrino *et al.*, 2017).

1.3 Rizobactérias e promoção de crescimento vegetal

Muitas das rizobactérias compreendem as denominadas bactérias promotoras de crescimento das plantas (BPCP), por pertencerem a um grupo benéfico e heterogêneo de microorganismos que podem ser encontrados na rizosfera, tanto na superfície da raiz ou associada a ela, e são capazes de melhorar o crescimento das plantas, assim como protegê-las de doenças e tensões abióticas (Duan *et al.*, 2013).

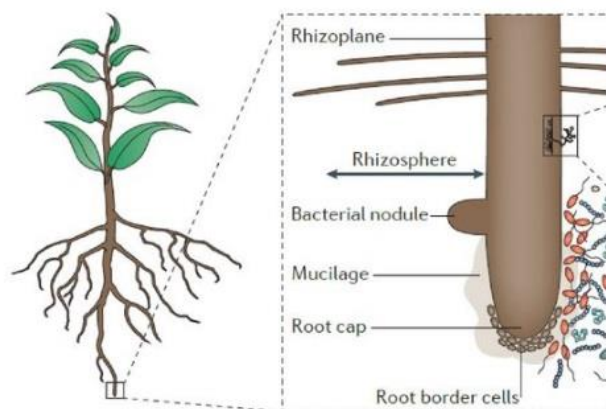


Figura 2. Demonstração da interação da rizosfera com a raiz das plantas. Imagem da internet (https://player.slideplayer.com.br/72/12235894/slides/slide_16.jpg)

A colonização do sistema radicular de plantas pelas BPCP pode ocorrer por meio da reintrodução em sementes ou partes de plantas vegetativas, por meio de processos simbióticos, endofíticos ou associativos com distintos graus de proximidade entre as raízes e as adjacências no solo (Kloepper *et al.*, 1999). Dentre os benefícios que estas associações entre bactérias e raízes podem proporcionar, tem-se a aquisição de recursos minerais como ferro ou pela produção de fitohormônios (Glick, 2012).

As BPCP podem diminuir o período de emergência da plântula, considerado de alta vulnerabilidade, pois é quando as plântulas se encontram suscetíveis ao ataque de patógenos (Kloepper *et al.*, 1999), e podem inclusive auxiliar na remoção de compostos prejudiciais ao crescimento das plantas (Glick, 2012).

1.3.1 Solubilização de Fósforo

O fósforo (P) é o segundo elemento nutricional mais importante para a nutrição das plantas, participando de funções metabólicas estruturais, funcionais e de transferência de energia (Khan *et al.*, 2009; Nahas, 2002). Sua disponibilidade no solo é limitada, pois naturalmente ele se encontra indisponível para a absorção das plantas (Sharma *et al.*, 2013), tornando necessária a necessidade de suplementação nutricional com o uso de fertilizantes solúveis visando o desenvolvimento adequado das plantas (Vassileva *et al.*, 1999).

Os fertilizantes comerciais, geralmente reagem com demais componentes do solo, formando outros compostos pouco disponíveis, causando a necessidade de um número maior de aplicações do produto e com isso elevam os custos para o produtor (Vassilev *et al.*, 1996).

Nesse contexto, o emprego de BPCP's é visto como uma alternativa aos produtos comerciais normalmente utilizados, visto que estes microrganismos por meio de mecanismos de quelação e reações de troca, conseguem elevar a concentração de P disponível para as plantas, por meio da excreção de ácidos orgânicos (Gerke, 1992), promovendo a acidificação do ambiente (Massenssine *et al.*, 2015).

Tal estratégia utilizada pelas BPCP's, são altamente desejáveis, fato que melhorem a disponibilidade e absorção de fósforo no solo favorecendo o crescimento das plantas, visto que menos que 5% do teor de fósforo de solos é biodisponível para as plantas (Bulgarelli *et al.*, 2013).

1.3.2 Produção de Sideróforos

O Ferro (Fe^{3+}) é um micronutriente essencial para o desenvolvimento vegetal (Kobayashi; Nishizawa, 2012), devido a capacidade para coordenar e ativar oxigênio (Storey *et al.*, 2007). Ele participa de diversos processos metabólicos como a fotossíntese, além disso, é capaz de regular a biossíntese de vitaminas, toxinas, citocromos, sideróforos dentre outros (Messenger; Barclay, 1983).

Embora geralmente o Fe^{3+} esteja em boa disponibilidade no solo, semelhante ao fósforo, ele não se encontra disponível para as plantas, devido à baixa solubilidade de óxidos de Fe^{3+} (Storey *et al.*, 2007). Na busca de aumentar a disponibilidade do micronutriente, tanto os microrganismos quanto as plantas desenvolveram estratégias, destas, a que mais se destaca é a de quelação, na qual ocorre a internalização deste íon do meio por meio da liberação de moléculas quelantes de ferro de baixo peso molecular, denominadas: sideróforos (Ahmed; Shahab, 2009).

Um sideróforo é um composto orgânico, produzido por bactérias, fungos e plantas gramíneas que tem a capacidade de formar complexos muito estáveis com o ferro (Reichard, 2005), nesse aspecto, as bactérias obtém vantagem, por terem maior afinidade pelo ferro do que os sideróforos de plantas (Ahmed; Shahab, 2009). Os sideróforos bacterianos, contribuem indiretamente para a promoção de crescimento das plantas (Saha *et al.*, 2016), agindo antagonicamente ao remover o elemento químico disponível do ambiente, prejudicando microrganismos como o fungo *Fusarium oxysporum*, que tem seu crescimento afetado pela indisponibilidade deste elemento (Duijff *et al.*, 1999).

1.4 Bactérias inoculantes

As BPCP são consideradas como bons candidatos inoculantes, devido a capacidade de colonizarem raízes e transformarem o ambiente com associações e relações no ecossistema, que propícia o desenvolvimento vegetal (Oteino *et al.*, 2015). A eficiência da colonização de uma BPCP está intimamente associada à competição microbiana pré-existente e sua sobrevivência no solo, bem como a modulação da expressão de genes e comunicação entre células através da detecção de *quorum sensing* (Kloepper *et al.*, 1999). Além disso, as raízes das plantas podem reagir a diferentes condições através da secreção de uma vasta gama de compostos, como açúcares e ácidos orgânicos, que interferem na interação planta-bactéria, sendo considerado um fator importante na eficiência destes inoculantes (Oteino *et al.*, 2015).

A saúde do solo é um fator importante, que pode influenciar a eficiência das inoculações com microrganismos, fator evidenciado pelas diversas características em sua composição, como exemplo os nutrientes biodisponíveis, concentrações de metais tóxicos, umidade do solo, diversidade microbiana, e distúrbios do solo causados por práticas inadequadas de manejo. Essas características, são essenciais para que ocorra a devida eficiência das BPCP's como inoculantes em culturas agrícolas, fato que releva a dificuldade em encontrar este tipo de produto no mercado (Oteino *et al.*, 2015).

1.5 Rizobactérias e controle biológico

Na busca por tecnologias menos agressivas, o uso de microrganismos (Winding; Binnerup; Pritchard, 2004), como rizobactérias e endófitos, podem ser considerados como importantes colaboradores (Kloepper *et al.*, 1999). Neste contexto, as rizobactérias por serem capazes de colonizar o sistema radicular das plantas, auxilia na prevenção contra a invasão de patógenos, por meio da produção de diversos metabólitos, uma consequência está na defesa vegetal por meio da inibição de outros microrganismos deletérios (Kloepper ; Ryu; Zhang, 2004).

Os efeitos causados pelos patógenos na agricultura é preocupante, uma vez que estima-se cerca de 10 a 20% de perdas ocasionadas por doenças nas cultivos brasileiros (CONAB, 2017). De todas as doenças, as fúngicas e bacterianas se destacam por afetar uma vasta gama de espécies cultiváveis (Goulart, 2005). Entre os fungos, os do gênero *Colletotrichum* estão entre os patógenos mais conhecidos por causar grandes prejuízos econômicos (ESPAÑA *et al.*, 2017) .

De modo que, as rizobactérias podem ser utilizadas como agentes de controle biológico ou associadas a outros fatores culturais e práticas agronômicas, induzindo a supressão por meio de alterações na comunidade de microrganismos já existentes na rizosfera (Kloepper et al., 1999).

1.6 Regulamentação do uso das BCPC's na agricultura

O uso constante de agrotóxicos para o controle de doenças, pragas causa diversos efeitos nocivos para o meio ambiente e para as pessoas em diversas etapas da cadeia produtiva (Rigotto; Vasconcelos; Rocha, 2014), um exemplo é a contaminação dos alimentos, do solo, da água e dos animais; a intoxicação de agricultores; a resistência de patógenos, assim como o aparecimento de doenças iatrogênicas (doenças provocadas devido ao uso de agrotóxicos) (Morandi; Bettioli, 2008).

Denominado como controle alternativo de pragas e doenças, o controle biológico passou a ser utilizado para controlar patógenos e pragas que representam danos aos sistemas agrícolas (Sambuichi *et al.*, 2017). O uso de microrganismos para o controle de organismos indesejáveis na agricultura tem se tornado cada vez mais comum em diversos países (Halfeld-Vieira *et al.*, 2016), entretanto, por possuírem a capacidade de sobreviver e se reproduzir no ambiente, devem ser criteriosamente caracterizados por meio de testes, visando garantir a segurança relacionada à saúde e ao ambiente (Oliveira-Filho; Faria; Castro, 2004).

Apesar do controle biológico se basear no uso de processos e recursos de ocorrências naturais, a apropriação destas tecnologias e sua utilização como produtos comercializados para controle de pragas e doenças agrícolas acabaram por inseri-las no universo dos produtos regulados pela lei de agrotóxicos (Sambuichi *et al.*, 2017). No Brasil, a concessão de registro dos produtos microbiológicos pelos órgãos federais, está atrelado a evidências laboratoriais de que indiquem que o produto, quando usado da maneira indicada, não causará efeitos adversos aos seres humanos ou ao ambiente, de modo que, para o registro são necessários ensaios sobre a caracterização físico química, toxicológica e de resíduos (Halfeld-Vieira *et al.*, 2016).

1.7 Feijão

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é pertencente do gênero *Phaseolus*, subtribo Phaseolinae, tribo Phaseoleae (Padder *et al.*, 2017). Cronquist (1988) descreve como pertencente à subclasse Rosidae, ordem Fabales e família Fabaceae.

Dentro do gênero estão inclusos diversos tipos de feijão. Embora o feijão tenha sido classificado em mais de 50 espécies diferentes (Delgado-Salinas *et al.*, 1999), apenas cinco são cultivadas e amplamente utilizadas para consumo humano em todo o mundo, dentre elas o feijão comum (*P. vulgaris*), o feijão de corredor (*P. coccineus*), o feijão do ano (*P. dumosus*), o feijão tepário (*P. acutifolius*) e o feijão lima propriamente dito (*P. lunatus*) (Gepts *et al.*, 2008). As plantas do gênero *Phaseolus* são diplóides com $2n = 22$ (Mercado-Ruaro; Delgado-Salinas, 1998),

Silva (1999), descreve as características morfológicas desta espécie como: sistema radicular formado por uma raiz principal, da qual se origina raízes secundárias. O caule é do tipo herbáceo, formado por diversos nós e entrenós, onde se encontra os cotilédones.

O hábito de crescimento varia entre determinado e indeterminado, a depender da cultivar. As folhas são simples e opostas, constituídas de três folíolos e alternas, pecíolo alongado, cor e pilosidade variam de acordo com vários fatores (Figura 1).

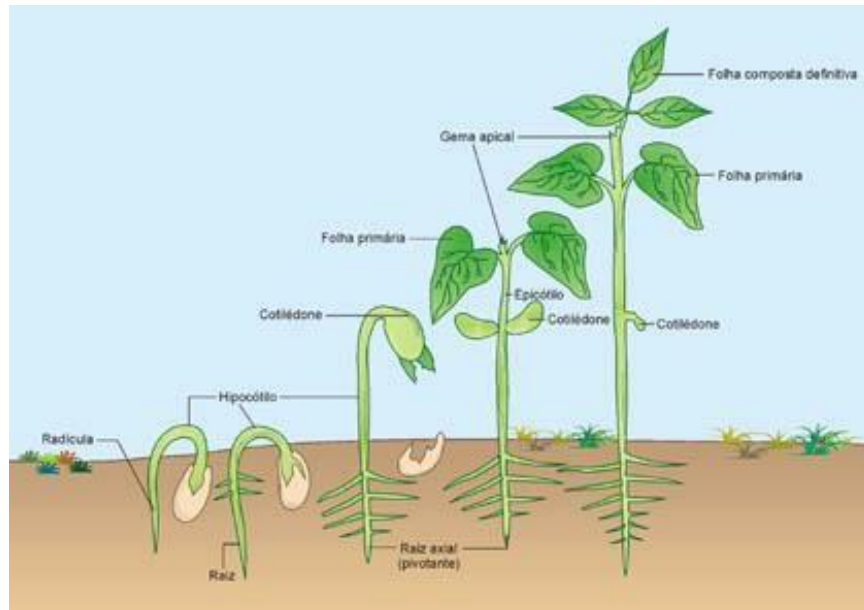


Figura 3. Desenvolvimento da planta do feijoeiro e suas principais estruturas. Imagem da internet (<https://alicebrancoweffort.blogspot.com/2017/02/como-plantar-feijao.html>).

O feijão comum se desenvolve em altitudes que variam entre 50 a 3000 metros e também pode suportar ambientes extremos. A temperatura ideal para o desenvolvimento varia entre 14 e 26°C, e precipitações anuais entre 400 e 1600 mm, no geral o pH do solo deve estar entre 5 e 6, levemente ácido, atingindo a maturidade fisiológica entre 70 e 200 dias, sendo que algumas cultivares chegam a obter potencial de rendimento entre 400-5000 kg/ha) (Wortmann et al., 1998; Debouck, 1999).

1.7.1 Importância da cultura

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma das principais plantas cultivadas, sendo o responsável pela metade das leguminosas consumidas no mundo (Schoonhoven; Voyses, 1991), constitui um dos principais ingredientes da dieta da população brasileira (Padder *et al.*, 2017b), além de excelente fonte de proteína, seus grãos ainda possuem boas fontes de calorias e minerais, estima-se que as sementes possuam cerca de 18-40% do seu peso em proteínas das quais o corpo humano necessita (Padder *et al.*, 2017).

A produção do feijão é bastante difundida em todo o território nacional e distribuída em três safras ao longo do ano, sendo o Brasil o terceiro maior produtor mundial (CONAB, 2017). Segundo dados do IBGE (2017), a produção do feijão que é dividida em primeira safra (das águas), segunda safra (da seca) e terceira safra (irrigada), ainda é predominantemente

realizada por pequenos produtores, com nível baixo de tecnificação e portanto, baixa produtividade.

A cultura é acometida por diversos fatores que prejudicam a produção (Padder *et al.*, 2017), destes, têm-se os fatores abióticos no qual o clima, temperatura e água são os grandes agentes contra a produção, e como fatores bióticos destaca-se a ocorrência de diversas doenças que podem causar danos significativos à lavoura, com redução no rendimento e qualidade dos grãos (Falleiros *et al.*, 2018).

Neste contexto a antracnose se evidencia como uma das principais doenças da cultura, embora a mancha angular da folha, o vírus do mosaico comum do feijão e a ferrugem bacteriana comum também contribuam para perdas significativas de sua produção (Padder *et al.*, 2017b).

De modo que, as leguminosas são vistas como importante e estratégico alimento visando a segurança alimentar, sendo que o feijão constitui a maior fonte de proteína e nutrientes, ficando atrás apenas das proteínas de origem animal, adquirindo um papel fundamental num planeta cada vez mais populoso [Cotet; Balgiu; Zaleschi (Negrea), 2017].

1.8 *Fusarium oxysporum*

O fungo *Fusarium oxysporum* taxonomicamente pertence ao reino Fungi, filo Ascomycota, subfilo Pezizomycotina, classe Sordariomycetes, subclasse Hypocreomycetidae, ordem Hypocreales, Família Nectriaceae, gênero *Fusarium* como descrito no Mycobank, (2020).

Este gênero é constituído por muitas espécies fitopatogênicas descritas (Sidrim *et al.*, 2010), que varia conforme o sistema taxonômico utilizado, no geral se baseia nas características culturais das colônias e dos esporos do fungo (Torres, 2000). Os fungos deste gênero são microrganismos com extensa representatividade nos mais diversos ambientes, podendo viver como saprofíticos no solo, água e plantas (Sidrim *et al.*, 2010).

Os fungos da espécie *Fusarium Oxysporum* produzem três tipos de esporos, chamados microconídios, macroconídios e clamidósporos. O tipo mais abundante verificado, os microconídios possuem uma ou duas células e são produzidos pelo fungo sob diversas condições. Os macroconídios possuem entre três a cinco células, são produzidos nos esporodóquios e geralmente são encontrados na superfície do tecido necrosado pelo patógeno. Os clamidósporos possuem entre uma ou duas células e suas paredes celulares são espessas realizando a função de carrear o fungo entre áreas ou ainda, viabilizar a sobrevivência do

patógeno por longos períodos (Leslie; Summerell, 2007; Nelson, P. E.; Dignani; A. 1994; Ohara, T. 2004)

O micélio do *Fusarium* se desenvolve rapidamente, o micélio pode ser de aveludado a levemente cotonoso, opaco ou levemente brilhante, no lado de baixo, pode ser incolor, marrom, vermelho, roxo escuro ou marrom (Hoog *et al.*, 2014). Desenvolve-se em temperaturas que variam entre temperatura ambiente 25-30°C, sendo que alguns isolados não são termotolerantes (O'Donnell *et al.*, 2010). O meio de cultivo mais utilizado para a determinação das espécies é o Batata Dextrose Ágar (BDA) (Fisher *et al.*, 1982) (Lacaz *et al.*, 1998).

Em relação ao seu mecanismo de infecção, o patógeno produz hifas que penetram através da parede epidérmica da raiz (Mendgen; Hahn; Deising, 1996). De modo que o micélio se desenvolva por dentro das células através do córtex radicular atingindo os vasos do xilema, utilizando-o como caminho para colonização do patógeno, por meio de microconídios (Bishop; Cooper, 1983). Os sintomas na planta geralmente são visualizados com a presença de murcha provocada pelo estresse hídrico, ocasionado devido ao bloqueio dos vasos (Beckman, 1987), outros sintomas incluem, manchas e queima das folhas, podridão das raízes e caules, podridão de frutas, grãos e sementes (Nelson, 1990).

Como a grande maioria dos fungos fitopatogênicos, a dispersão do patógeno ocorre principalmente pela ação da chuva, ventos e animais (Fisher *et al.*, 1982).

1.9 Antracnose

1.9.1 A antracnose do feijoeiro

A antracnose é causada pelo fungo fitopatogênico *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magnus) (Balardin, R. S; Jarosz, A.M; Kelly, J.D, 1997). Normalmente esta doença é considerada problemática em regiões tropicais e subtropicais, onde habitualmente o feijão é usado como principal proteína fonte de alimentação humana, sendo considerada endêmica em locais como África, Ásia, Austrália e em alguns países da América Latina, como o Brasil (Darben *et al.*, 2017).

1.9.2 Características gerais do patógeno *Colletotrichum lindemuthianum*

Os fungos do gênero *Colletotrichum*, podem ser saprofíticos e patogênicos, sendo que, estes últimos são os principais causadores de doenças economicamente importantes,

denominadas de antracnoses, e podem ocorrer em diversas espécies de hospedeiros. O sucesso na invasão em tecidos, geralmente depende de estratégias que os fungos destes gênero usam, como por exemplo atuarem como hemibiotróficos intracelular, isto é, penetram no tecido para que possam se nutrir, porém sem causar morte do hospedeiro, ou, necrotróficos subcuticulares, ao promoverem morte dos tecidos do hospedeiro, por meio da liberação de toxinas, pois se alimentam de tecidos mortos ou que estão morrendo, através do desenvolvimento de estruturas específicas para penetrar no hospedeiro, como por exemplo, os apressórios, estes por resistirem as condições adversas do ambiente, atuam como órgão de sobrevivência (Menezes, 2006).

O fungo *Colletotrichum lindemuthiamum* taxonomicamente pertence ao reino Fungi, filo Ascomycota, subfilo Pezizomycotina, classe Sordariomycetes, subclasse Hypocreomycetidae, ordem Glomerellales, família Glomerellaceae, gênero *Colletotrichum* como descrito no Mycobank, (2020).

Colletotrichum lindemuthiamum é um fungo filamentosos que possui dois tipos de formas reprodutivas (Sutton, 1992). A fase sexual teleomorfa (forma perfeita) do patógeno é descrita como *Glomerella lindemuthiana* (Baker, Wardlaw, 1937), geralmente ocorre a produção de peritécios, corpos de frutificação fúngica e ascos, célula sexual produtora de esporos, ambas características são geralmente encontradas em fungos pertencentes ao filo Ascomycota (Padder *et al.*, 2017a).

A forma assexual anamórfica (forma imperfeita) produz acérvulos que eclodem através da epiderme. Possui conidióforos curtos e aglomerados contendo conídios, por onde os esporos evadem através da abertura ao topo (Padder *et al.*, 2017a). Kimati e Galli (1970) após acasalarem dois isolados diferentes do patógeno, descobriram que os ascósporos eram patogênicos apenas para o feijão, renomeando o patógeno para *Glomerella. cingulata f. sp. phaseoli*. Recentemente, a forma teleomórfica, até então não vista em campo, foi detectada em lesões de feijão exibindo sintomas típicos de antracnose em vagens, folhas ou caules (Camargo *et al.*, 2007).

As plantas podem ser acometidas pela doença em qualquer fase de seu desenvolvimento, e o patógeno pode ser disseminado de uma planta para outra por meio de vários agentes do ambiente aéreo (Menezes, 2006). Os esporos são facilmente dispersados através dos salpicos de água e resultando na dispersão da doença (Padder *et al.*, 2017a), outro método eficiente de dispersão da doença ocorre com o uso de sementes infectadas (Menezes, 2006).

Dentre os sintomas típicos, estão as lesões profundas e concêntricas contendo esporos cor de carne. As lesões também podem ocorrer nas hastes, hipocótilos e com o avanço da doença, pode vir ocorrer murcha e sinalização de folhas semelhantes às de outros patógenos foliares, sendo que sua progressão leva a planta a eventual morte (Padder *et al.*, 2017a).



Figura 4. Lesões de antracnose em folhas, sementes e vagens de feijão. Imagem da internet (<https://www.adama.com/brasil/pt/espaco-do-agricultor/feijao>).

1.9.3 Importância econômica

A antracnose é uma das doenças mais importantes que acometem a cultura do feijão comuns em todo o mundo, podendo ocasionar perdas de rendimento de até 90% em regiões com alta prevalência umidade e temperaturas moderadas entre 13 a 27 °C (Balardin; Jarosz; Kelly, 1997; Darben *et al.*, 2017).

1.9.4 Controle

O controle da doença é realizado rotineiramente por meio de produtos químicos, que no geral se demonstram onerosos (Balardin; Jarosz; Kelly, 1997). Uma alternativa ao controle químico está no uso de cultivares resistentes (Padder *et al.*, 2017a). Entretanto, em detrimento da pressão seletiva promovida pelo uso descontrolado destes agentes químicos, esta medida se torna limitada para o controle e desenvolvimento da doença (Falleiros *et al.*, 2018).

Atualmente parte da cultivares suscetíveis são devido à alta variabilidade patogênica (Padder *et al.*, 2017a), uma causa possível está no fato das raças do patógeno que serem extremamente difundidas, tornando o padrão de virulência de *C. lindemuthianum* ainda desconhecido. Uma hipótese levantada é da evolução da raça ou a ainda, devido a eficiente dispersão transmitida entre áreas por meio de sementes (Balardin; Jarosz; Kelly, 1997).

1.9.5 Desafio

No mundo mais de 100 raças de *C. lindemuthianum* foram encontradas, e as raças 65, 73, 81 e 89 são as mais frequentes no Brasil (Falleiros *et al.*, 2018). No Brasil foram identificadas

mais de 50 raças de *C. lindemuthianum*. Destas, as raças 64, 65, 73, 81, 87 e 89 são os patótipos mais frequentemente encontrados nos estados do Paraná, Santa Catarina, Goiás e Distrito Federal, os principais produtores desta cultura (Darben *et al.*, 2017). Exatamente por apresentar esta diversidade de patótipos frequentemente encontrados, mesmo em cultivares resistentes pode haver elevada incidência de focos de antracnose (Padder *et al.*, 2017b) . O mesmo vale para a ineficiência dos controladores químicos, uma vez que em tal variabilidade pode haver patótipos mais ou menos resistentes a estes compostos. Daí surge o desafio de se buscar novas formas de controle da doença, e o controle biológico se mostra bastante interessante, por ser economicamente viável e ambientalmente mais seguro.

2. HIPÓTESES

- As bactérias do Quadrilátero ferrífero, podem apresentar atividade antagônica contra os fungos fitopatogênicos *Fusarium Oxysporum* e *Colletotrichum lindemuthianum in vitro*.
- As bactérias do Quadrilátero ferrífero, apresentam características desejáveis a promoção de crescimento vegetal *in vitro*.
- A inoculação de bactérias em sementes de feijão pode estimular o desenvolvimento da planta.

2.1 JUSTIFICATIVAS

- Potencialidades biotecnológicas verificadas pelos colaboradores do LabGiba;
- Boa adaptabilidade destes microrganismos, devido as condições extremas as quais estavam submetidos no meio ambiente;
- Necessidade de tecnologias menos agressivas ao meio ambiente e a saúde para controle dessa importante doença;
- Alta demanda por agricultura sustentável no mercado global;
- A busca e o desenvolvimento de produtos biotecnológicos é base para o fortalecimento do PPG Biotec e do NUPEB como instituição de geração de conhecimento e divisas.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar o potencial antagônico e de promoção de crescimento vegetal de bactérias extraídas de solos e plantas da região do Quadrilátero Ferrífero contra o fungo causador da antracnose no feijoeiro *Colletotrichum lindemuthianum*.

3.2 Objetivos específicos

- I. Avaliação do antagonismo de isolados previamente isolados contra o *Colletotrichum lindemuthianum in vitro*;
- II. Selecionar os isolados que apresentarem as maiores taxas de inibição contra *Colletotrichum lindemuthianum*;
- III. Avaliar os isolados quanto à capacidade de solubilizar fósforo e produzir sideróforos;
- IV. Avaliar o efeito da inoculação dos isolados bacterianos sobre sementes de feijão, em casa de vegetação;
- V. Identificar isolados com potencial para futuros estudos de prospecção de biomoléculas de interesse biotecnológico.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Microrganismos utilizados

As 62 bactérias utilizadas neste estudo foram obtidas a partir de uma coleção existente no Laboratório de Interação Bactéria Ambiente – LabGiba da Universidade Federal de Ouro Preto, e foram previamente isolados por Caneschi e colaboradores (2018). As bactérias armazenadas no LabGiba foram estocadas em microtubos devidamente identificados, e armazenada em Meio LB líquido - Luria Bertani (LB) - (peptona de soja, 10g L⁻¹; extrato de levedura, 5g L⁻¹; cloreto de sódio, 10g L⁻¹), suplementado com glicerol 50% e mantida à temperatura de -20°C.

Os fungos utilizados neste estudo foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Genética Molecular de Fungos (LGMF) da Universidade Federal de Viçosa, a cepa C89 do fungo *C. lindemuthianum* (CICL89), e a cepa de *F. oxysporum*, pelo Laboratório de Biologia Celular e Molecular da UFOP (LBCM) da Universidade Federal de Ouro Preto.

As cepas foram cultivadas em Meio BDA – Ágar Batata Dextrose – (batata 200 g L⁻¹; Dextrose, 20 g L⁻¹ e ágar, 15 g L⁻¹), retirou-se um disco micelial de cada uma em seguida foram acondicionados em microtubos contendo água destilada e armazenados a 4°C até a utilização. Todos estes isolados bem como a cepa de *C. lindemuthianum* e de *F. oxysporum* foram previamente cadastrados no Sisgen. No quadro 1, estão listados os isolados bacterianos, assim como as respectivas localizações.

Quadro 1. Amostras de plantas da região do Quadrilátero Ferrífero e de canga da região do Jardim Canadá – Nova Lima. Fonte: Adaptado de (Caneschi et al., 2018).

Nome Científico das Plantas	Nome Popular	Localização (Canga)	Fonte	Identificação do Isolado
<i>Lychnophora pinaster</i> Mart. (Asteraceae)	Arnica Mineira	Mãe d'agua Latitude: 7° 15' 10" Longitude: 37° 25' 58"	Flores	FA1
			Raiz	RA2
			Raiz	RA3
			Raiz	RA4
			Raiz	RA5
	Gervão		Rizosfera	RIZA1

<i>Stachytarpheta glabra</i> Cham. (Verbenaceae)		Mãe d'agua (Serra da Moeda)	Rizosfera	RIZA2
			Flores	FG1
<i>Baccharis reticularia</i> DC (Asteraceae)	Alecrim- do- campo	Mãe d'agua (Serra da Moeda)	Flores	FG2
			Flores	FG3
			Flores	FB1
			Flores	FB2
			Flores	FB3
			Folha	FoB1
			Folha	FoB2
<i>Gomphrena arborescens</i> L.f. (Amaranthaceae)	Paratudo ou perpétua	Mãe d'agua (Serra da Moeda)	Flores	IPT1
			Flores	IPT2
			Flores	IPT3
			Raiz	RPT1
			Raiz	RPT3
			Rizosfera	RizPT1
			Rizosfera	RizPT3
			Tubérculo	TPT1
			Tubérculo	TPT2
			tubérculo	TPT3
Tubérculo	TPT5			
<i>Symphopappus compressus</i> (Gardner) B. L. Rob.	-	Jardim Canadá (Nova Lima)	Raiz	RS1
			Raiz	RS2

(Asteraceae)		Latitude: 19° 59' 09" Longitude: 43° 50' 49"		
<i>Lagenocarpus rigidus</i> Nees (Cyperaceae)	-	Jardim Canadá (Nova Lima)	Folha	LR1
<i>Pleroma heteromallum</i> D. Don (D. Don) (Melastomataceae)	-	Jardim Canadá (Nova Lima)	Folha	TH1
<i>Peixotoa tomentosa</i> A. Juss. (Malpighiaceae)	-	Jardim Canadá (Nova Lima)	Flores	P1
			Flores	P2
<i>Vellozia compacta</i> Mart. ex Schult. & Schult.f. (Velloziaceae)	-	Jardim Canadá (Nova Lima)	Folha	FCE
			Raiz	RCE1
			Raiz	RCE2
			Raiz	RCE3
			Raiz	RCE4
-		Canga 1	Solo	C11
				C12
				C13
				C14
-		Canga 2	Solo	C21
				C22

			C23
			C24
			C25
-	Canga 3	Solo	C31
			C32
			C33
			C34
-	Canga 4	Solo	C41
			C42
			C43
			C44
-	Canga 5	Solo	C51
			C52
			C53
			C54
			C55
			C56
-	Canga 6	Solo	C61
-	Canga 7	Solo	C71
			C72
			C73
			C74

4.2 Ativação e ensaios de pureza das culturas de microrganismos

As culturas das estirpes de bactérias foram conservadas em meio Luria Bertani líquido – LB sob glicerol 50% previamente esterilizado, e mantido a -20°C, sendo reativadas em placas de Petri contendo meio de cultura LB sólido. Utilizou-se o método de estrias para a obtenção de colônias puras dos isolados, em seguida foi feita a ativação destas colônias em meio LB líquido em microtubos de centrífuga em shaker a 180 rpm durante 48h, tiveram as respectivas Densidades Ópticas (D.O) ajustadas para 0,5.

As estirpes dos fungos utilizados foram conservadas em microtubos de centrífuga contendo água destilada estéril a 4° C. Para reativação de *F. oxysporum* foram utilizadas placas de Petri contendo meio Ágar Batata Dextrose sintético– BDA durante sete dias no escuro a 28° C. Para reativação de *C. lindemuthianum* foram utilizadas placas de Petri contendo Ágar Batata Dextrose natural – BDA durante dez dias no escuro a 26° C.

4.3 Prospecção da antibiose dos isolados bacterianos contra *Fusarium oxysporum*

O fitopatógeno utilizado inicialmente foi o fungo *F. oxysporum* proveniente da coleção do Laboratório de Biologia Celular e Molecular da UFOP. Os 62 isolados bacterianos foram testados quanto ao potencial de antagonismo contra *F. oxysporum* por meio do ensaio de inibição direta. Um disco de ágar com 0,6 cm de diâmetro contendo micélio do fungo patogênico foi inoculado em um lado de uma placa de Petri contendo meio de cultivo BDA, em seguida, ajustou-se a Densidade Óptica (D.O) da suspensão bacteriana para 0,5, para controle do número de células. Após foi estriado cerca de 10 µl de uma suspensão de cada isolado em formato quadrangular de 3cm de aresta na parte central da placa e incubada a 28 °C por sete dias. Para controle negativo do teste, foi inoculado somente o fungo no centro de uma placa de Petri.

O halo de crescimento do patógeno foi medido no 6° e no 7° dia. Até atingirem cerca de 3cm. As bactérias foram consideradas como potenciais inibidores do patógeno, ao terem seus percentuais inibitórios obtidos por meio da fórmula descrita abaixo, comparados a placa controle. Sendo selecionados 13 isolados dentre os melhores inibidores que atingiram inibição entre 50 e 60%, e 5 isolados que dentre os piores inibidores atingiram inibição entre 20 e 25% do patógeno. Todos os ensaios foram feitos em triplicata e o percentual de inibição foi calculado segundo a fórmula: $((DM-dm)/DM) \times 100$, onde DM é o valor da média do diâmetro

do patógeno entre as repetições das placas controles, dm é o diâmetro médio do patógeno na placa de inibição direta.

4.4 Ensaios de atividade antagonista a *Colletotrichum lindemuthianum*

Após realizada a prospecção inicial para a avaliação da atividade antagonista dos isolados ao fungo fitopatogênico *F. oxysporum*, 18 isolados que inibiram entre 25% e 60% pelo método de inibição direta foram considerados para os estudos de inibição a *C. lindemuthianum*.

4.4.1 Ensaio de antagonismo por inibição direta

Para isso um disco de micélio de CICL89 foi inserido no centro da placa de Petri, contendo meio BDA. Em quatro pontos equidistantes, cerca de 3 cm de aresta do disco do micélio, foram inoculados 10 µL de suspensão do isolado de bactéria testada como provável antagonista. O controle negativo foi realizado somente com a inoculação do patógeno, sem a presença do potencial antagonista. Após inoculação, as placas foram vedadas e acondicionadas em câmara do tipo BOD por 10 dias, no escuro a 26°C. Ao final deste período o diâmetro do micélio de CICL89 foi quantificado na presença e ausência dos antagonistas com o uso de um paquímetro digital. O ensaio foi feito em triplicatas independentes.

4.4.2 Ensaio de antagonismo por inibição indireta por meio de compostos voláteis

O método consiste na inibição do crescimento do alvo por meio de compostos voláteis liberados pelos microrganismos inoculados em meio de cultura. Para isso foram utilizadas placas de Petri septadas contendo 3 câmaras, de modo que um disco de micélio CICL89 foi inserido em uma das câmaras, 10 µL do isolado com a D.O previamente ajustada em outra câmara, ficando a terceira câmara vazia. O controle negativo foi realizado somente com a inoculação do patógeno, sem a presença do potencial antagonista. Após inoculação, as placas foram vedadas e acondicionadas com a tampa voltada para cima e após dez dias de incubação no escuro à 26° C, o diâmetro do micélio CICL89, na presença e ausência dos antagonistas foi quantificado com o uso de um paquímetro digital. O ensaio foi feito em triplicatas independentes.

4.4.3 Ensaio de antagonismo por inibição indireta por meio de compostos difusíveis

O método consiste na confrontação indireta dos microrganismos em meio de cultura mediado pela ação de compostos difusíveis com potencial ação controladora do fungo. Para isso, um disco de 11 cm de diâmetro de papel celofane P45 permeável estéril é colocado sobre

a superfície do meio BDA, previamente vertido em placas de Petri de 90 x15 mm. Em seguida, 200 µL da cultura de isolados bacterianos com a D.O previamente ajustada para 0,5 são inoculados sobre o papel celofane, e homogeneizado com alça de Drigalsky por toda a superfície do celofane, evitando que haja contato direto da solução de bactérias com o meio. As placas foram incubadas por 48h, e em seguida tiveram o conjunto celofane acrescido de colônias bacterianas removidos, para então ser inoculado um disco de 0,6 cm de micélio do fitopatógeno no centro da placa de Petri sobre o meio BDA. Em seguida, as placas foram vedadas e acondicionadas em câmara do tipo BOD, por 10 dias no escuro a 26° C. Após este período, o diâmetro do micélio de CICAL89 foi quantificado na presença e ausência dos antagonistas com o uso de um paquímetro digital. O ensaio foi feito em triplicatas independentes. O controle negativo foi realizado somente com o celofane sem a presença do patógeno, seguida pela posterior inoculação do patógeno.

4.4.4 Ensaio de antagonismo por inibição indireta após análise de termoestabilidade dos isolados

O método consiste na confrontação indireta dos microrganismos em meio de cultura, após receberem tratamento térmico. No qual, 200 µL de isolados bacterianos, com a D.O previamente ajustada são levados em termobloco, durante 5 min á 80° C. Em seguida, cada microtubo contendo os isolados bacterianos foram inoculados sobre o papel celofane, e homogeneizado com alça de Drigalsky. O restante do ensaio foi conduzido como descrito no item 4.4.3 Após inoculação, as placas foram vedadas e acondicionadas em câmara do tipo BOD, por dez dias no escuro a 26°C, o diâmetro do micélio CICAL89, foi quantificado na presença e ausência dos antagonistas com o uso de um paquímetro digital. O ensaio foi feito em triplicatas independentes.

4.5 Ensaios para promoção de crescimento de plantas *in vitro*

A partir dos resultados obtidos nos ensaios de caracterização antagonista *in vitro*, foram selecionados cinco microrganismos para realizar os ensaios visando a promoção de crescimento de plantas.

4.5.1 Ensaio de solubilização de fosfato

O método consiste na utilização de meio sólido fosfato (glicose 10 gL⁻¹; Ca³PO⁴ 5 gL⁻¹; MgCl².6H₂O 5 gL⁻¹; MgSO⁴.7H₂O 0,25 g L⁻¹; KCl 0,2 gL⁻¹; (NH₄)₂SO⁴ 0,1 gL⁻¹; ágar 15 g

L-1), o qual foi vertido em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, em seguida inoculou ao centro das placas cerca de 2 µL. As placas foram vedadas e acondicionadas em BOD a 28°C ±2 durante 10 dias para verificar a formação do halo translúcido em torno das colônias. A avaliação constou da medição do halo formado com paquímetro digital.

4.5.2 Ensaio de produção de sideróforos

A produção de sideróforos foi avaliada utilizando meio adaptado de (Schwyn; Neilands, 1987) na qual a solução do corante é formada por três soluções: primeira consiste em 0,06g de cromo azurol S (CAS) solubilizado em água MilliQ® (QSP 50 ml); segunda na solubilização de 0,0027g de FeCl³.H₂O em HCl 10mM (QSP 10 ml); e a terceira na solubilização de 0,073g de HDTMA em água destilada (QSP 50 ml). As três soluções foram misturadas em um frasco e submetidas a esterilização em autoclave 120°C por 15 minutos. O meio foi preparado separadamente. 100mL de meio M9 2X foi adicionado em 60mL de água MilliQ® a 3,01 g de PIPES foram adicionadas a essa solução e o pH ajustado a 6,8. Autoclavou-se a 120°C por 15 minutos. Após atingir a temperatura inferior à 50 °C, adicionaram-se 10mL de solução de glicose 20%, 50 ml de solução de CAS (60,5mg de Cromoazurol S em 50mL de água MilliQ® e 100ml da solução corante inicialmente preparada). Verteu-se o meio azul em placa e a produção de sideróforos foi detectada pela formação de um halo alaranjado.

4.6 Ensaio em casa de vegetação para promoção de crescimento de plantas

A partir dos resultados obtidos nos ensaios de caracterização fisiológica *in vitro*, foram selecionados cinco microrganismos para realizar o ensaio em casa de vegetação.

4.6.1 Descontaminação das sementes

As sementes passaram pro procedimento de esterilização no qual consistiu em lavagem com detergente neutro, seguida pela imersão em hipoclorito de sódio comercial 2% durante 25min, sendo em seguida imersas em álcool 70% durante 30 segundos e logo após foram enxaguadas por 4 vezes em dH₂O por 5min. Após, procedeu a verificação da esterilidade da semente, na qual as sementes foram acondicionadas em placas de Petri contendo meio LB e deixadas em temperatura ambiente durante 48h para garantir a descontaminação por microrganismos (Figura 5).

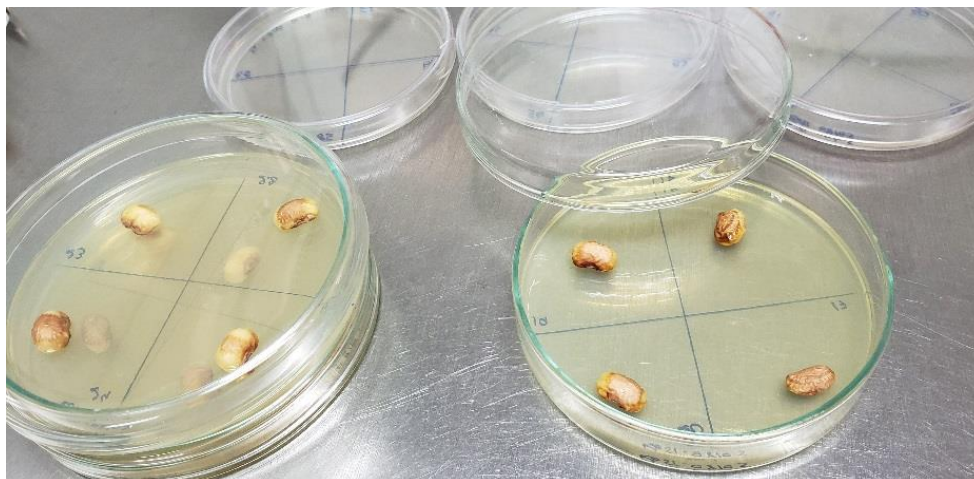


Figura 5. Sementes em placas de Petri, por 48h, para verificação da completa descontaminação.

4.6.2 Inoculação via microbiolização de sementes

Neste ensaio utilizou-se sementes previamente descontaminadas, as quais foram acondicionadas em beckeres de 50ml, juntamente com suspensão bacteriana, cerca de 200 μ L/semente preparada previamente e teve a OD ajustada pra 0,5 (Figura 6). Em seguida os frascos foram armazenados no shaker, 180 rpm à 26° durante 72h. Após este período as sementes absorveram a suspensão bacteriana e procedeu o plantio em frascos contendo 100 ml de substrato comercial.



Figura 6. Inoculação de isolados bacterianos em sementes previamente esterilizadas em Erlenmeyers.

4.6.3 Inoculação em substrato

Para este ensaio as sementes previamente esterilizadas foram colocadas em frascos contendo 100 ml de substrato comercial, em seguida, procedeu-se a inoculação de 200 μ L sobre cada semente (Figura 7), após cobriu a semente com substrato, em seguida os frascos foram acondicionados em casa de vegetação. Até o fim do período de avaliação 40 dias após a germinação).



Figura 7. Inoculação de isolados bacterianos em recipientes contendo substrato comercial previamente esterilizado.

As avaliações constaram das medições de altura das plantas crescidas após o período predeterminado, em seguida as plantas foram secas em estufas 60°C durante 5 dias, em seguida realizou o peso da massa seca da parte aérea e o peso da massa seca da raiz de cada tratamento.

O experimento foi conduzido com sementes da cultivar Pérola padronizada por (tamanho) e previamente esterilizada segundo descrito no item 4.6.1. As sementes foram plantadas em recipientes de 200ml, contendo substrato comercial autoclavado a 120kgf, por 20 minutos, em 3 dias seguidos, em seguida procedeu o ensaio sendo realizado por 2 tratamentos visando avaliar a promoção e crescimento: inoculação via microbiolização de sementes e pelo método de inoculação em substrato.

Dos 18 isolados avaliados inicialmente quanto a atividade antagônica contra *Colletotrichum lindemuthianum*, os cinco que atingiram as melhores inibições (70 e 90%) foram avaliados quanto à produção de sideróforos e solubilização de fosfato. Estes isolados bacterianos foram selecionados tendo como principal critério a alta taxa de antagonismo contra o patógeno.

As bactérias selecionadas foram cultivadas separadamente em microtubos contendo meio LB líquido, a temperatura de 28°C, por um período de 48 horas, sob agitação constante de 180 rpm. Decorrido o tempo de incubação, 200 µL/semente, em seguida teve a OD ajustada para 0,5. Sendo logo após utilizadas nos tratamentos.

O delineamento experimental foi constituído de 2 tratamentos e um grupo controle: T1 controle; T2 Bactéria: LR1; T3 Bactéria: C23; T4 Bactéria: C74; T5 Bactéria: RA4; T6 Bactéria: RPT1, com 5 repetições (Figura 8). Para cada tratamento foram empregados 30 recipientes com uma semente cada. Os recipientes foram distribuídos e organizados ao acaso, com 2 tratamentos por blocos totalizando 30 plantas por bloco. O controle constituiu de plantas sem a adição da suspensão bacteriana, somente 200 µL de meio de cultura.

As plantas foram mantidas em estufa a temperatura de 27°C, com um fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro, umidade relativa de 75% não sendo adicionado, qualquer solução nutriente nos recipientes (Figura 9).

A avaliação da promoção de crescimento em *Phaseolus vulgaris* cv. perola foi realizada por meio dos parâmetros: comprimento do caule, número de folhas, biomassa seca da parte aérea e da raiz.



Figura 8. Sementes de *Phaseolus vulgaris* inoculadas, acondicionadas em casa de vegetação.



Figura 9. Plantas de *Phaseolus vulgaris* em desenvolvimento em casa de vegetação, sob as mesmas condições climáticas.

Decorridos os 45 dias previstos as plantas seriam coletadas e teriam a raiz, o caule e as folhas devidamente separados e acondicionados em sacos de papel previamente secos e pesados. Para avaliar a massa (mg) da matéria seca, as plantas deveriam ser mantidas a 60°C durante ± 4 dias em estufa até estabilização da massa e pesadas novamente. A massa da matéria seca e fresca seria determinada em balança analítica.

4.7 Identificação das bactérias

A identificação molecular foi realizada para cinco bactérias, o isolado LR1 e RPT1 que apresentou resultados positivos para o ensaio de solubilização de fosfato, o isolado C23 por ter apresentado resultado positivo para o ensaio de produção de sideróforos, o isolado C74 por ter apresentado resultado positivo em todos os ensaios *in vitro*, no geral todos estes isolados

se apresentaram como ótimos antagonistas ao fungo patogênico *Colletotrichum lindemuthianum*.

4.7.1 Extração do DNA dos isolados bacterianos

A técnica utilizada para a extração do DNA dos isolados bacterianos foi descrita por Queipo-ortuno *et al.*, (2008) e Diana; Pui; Son, (2012). Nesta, o volume de 1,5 mL de meio líquido contendo células bacterianas, foram ativadas durante a noite, em seguida centrifugadas a 15000 x g por 15 min, em seguida, o sobrenadante foi retirado e o pellet foi ressuspensionado em 1 mL de água MilliQ®, e centrifugado em 15000 x g por 10 min. O sobrenadante foi retirado e o pellet ressuspensionado em 40 µL de água MilliQ®, logo após as amostras foram colocadas em banho-maria a 100°C por 10 min e logo depois foram colocadas no freezer a -20°C por 10 min. Em seguida, centrifugou-se a 15000 x g por 20s e o coletou o sobrenadante contendo o DNA genômico. A concentração de DNA foi padronizada e os isolados foram submetidos a reações de PCR, em que para cada amostra foi usado 3 µL do Buffer +MgCl₂, 1,13 µL de dNTP, 4,5 µL dos primers forward e reverse, 0,48 µL de Taq, 1 µL do DNA genômico em uma concentração de 20 ng/µL e 15,36 µL de água ultrapura. A amplificação foi submetida à um ciclo inicial de 5 minutos por 94 °C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 1 minuto a 57 °C, 1 minuto a 72°C, e um ciclo final de 5 minutos a 72°C. Foi utilizado o termociclador Biocycler®, as regiões de DNA amplificadas foram verificadas em gel de agarose 0,8%, utilizando 5 µl do produto de PCR para avaliação da qualidade. A concentração de DNA foi verificada através do Nanodrop e as amostras foram diluídas para a concentração de 20 ng/ul. Ao final, realizou-se o procedimento de eletroforese para a verificação da integridade do DNA.

4.7.2 Sequenciamento – região: v4/v5 - 16 s

Dos isolados bacterianos utilizados, cinco deles foram selecionados devido ao desempenho frente aos ensaios realizados, sendo eles identificadas como: C23, C74, LR1, RA4, RPT1. As amostras foram enviadas para o laboratório CREBIO (Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica) para identificações dos isolados, através do sequenciamento por 16S, na região V4 -V5. Os isolados foram submetidos a reações de PCR, foram utilizados oligonucleotídeos complexos compostos por: sequência forward 5' GTGCCAGCMGCCGCGGTAA 3' e reverse 5' CCGTCAATTTYTTTTRAGTTT 3' para amplificar a região V4 – V5 (FOUHY *et al.*, 2016).

5. RESULTADOS

5.1 Prospecção da antibiose dos isolados bacterianos contra *Fusarium oxysporum*

A partir dos 62 isolados bacterianos previamente obtidos a partir de plantas e solos da região do QF, foi realizado uma análise inicial para verificar o potencial antifúngico contra *F. oxysporum*, agente causal da fusariose em diversos hospedeiros. Isto porque iniciamos o trabalho buscando averiguar apenas o potencial antagônico destes isolados contra fungos de interesse agrícola, e *F. oxysporum* foi escolhido para que o aprimoramento da metodologia fosse atingido enquanto as tramitações burocráticas de cessão da cepa CIC89 de *C. lindemuthianum* estivessem em andamento.

No ensaio de antibiose direta contra *F. oxysporum*, 13 isolados apresentaram taxas de inibição acima de 50%, outros 13 isolados inibiram entre 20 e 49%, e o restante (36 isolados) apresentou atividade antifúngica inferior de 20% (Figura 10).

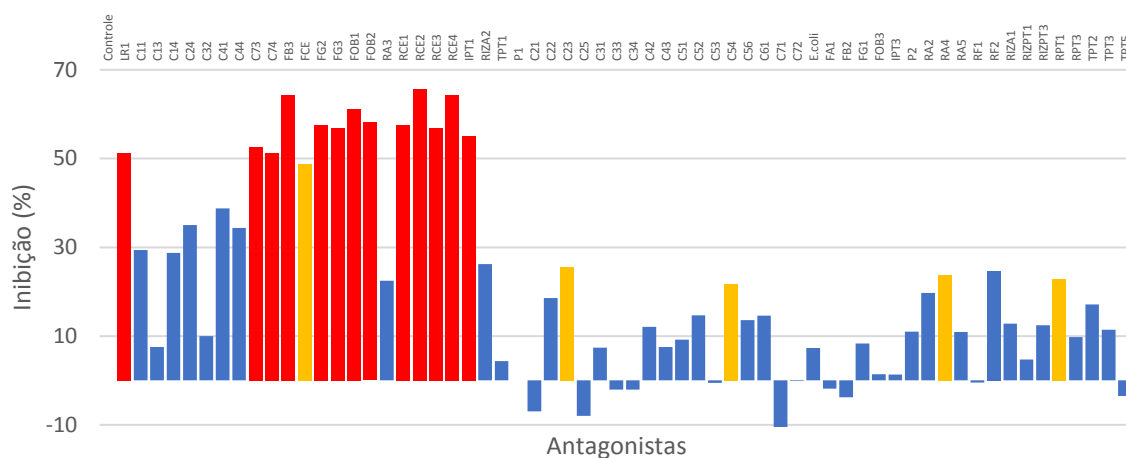


Figura 10. Avaliação da antibiose dos isolados contra a inibição do crescimento de *F. oxysporum*. As barras vermelhas destacam os isolados que inibiriam acima de 50% do crescimento micelial do patógeno. As barras em azul destacam os isolados descartadas das análises posteriores, devido à baixa taxa inibitória.

Após esta análise inicial com *F. oxysporum*, 18 isolados bacterianos foram selecionados para o ensaio contra *C. lindemuthianum* (vide barras em vermelho e amarelo na figura 10). Neste conjunto foi incluso todos os isolados antagonistas á *F. oxysporum* inibindo o

desenvolvimento entre 20, 25% e acima de 50% do patógeno. A seleção dos isolados com taxas inibitórias inferiores a 50% foram baseadas em outras características, como o perfil morfológico do micélio, como é o caso do isolado RPT1 (última colina amarela do gráfico). Embora tenha inibido apenas 22% do crescimento de *F. oxysporum*, apresentou um micélio denso e cotonoso em comparação a outros isolados (Figura 11).

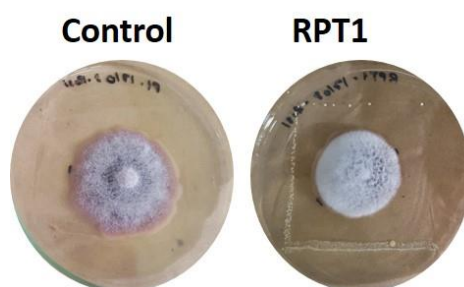


Figura 11. Ensaio de prospecção de antibiose dos isolados contra o fungo *F. oxysporum* para o isolado RPT1. Nota-se intensa diferenciação macromorfológica do fungo na presença do isolado bacteriano.

5.2 Ensaios de atividade antagonista a *Colletotrichum lindemuthianum*

Dos isolados (18) selecionados na prospecção quanto a atividade de antibiose a *F. oxysporum*, deu-se prosseguimento na pesquisa sobre antagonismo por meio dos ensaios de inibição direta, indireta por compostos voláteis, indireta por compostos difusíveis e ensaio inibição indireta do patógeno após verificação da termoestabilidade dos isolados contra *C. lindemuthianum* cepa C89 (CIC89).

No ensaio de antagonismo direto contra *C. lindemuthianum*, 6 isolados apresentaram taxas de inibição acima de 60%, outros 9 isolados inibiram entre 20 e 59%, e os outros 3 isolados apresentaram atividade antifúngica inferior a 19% (Figura 12).

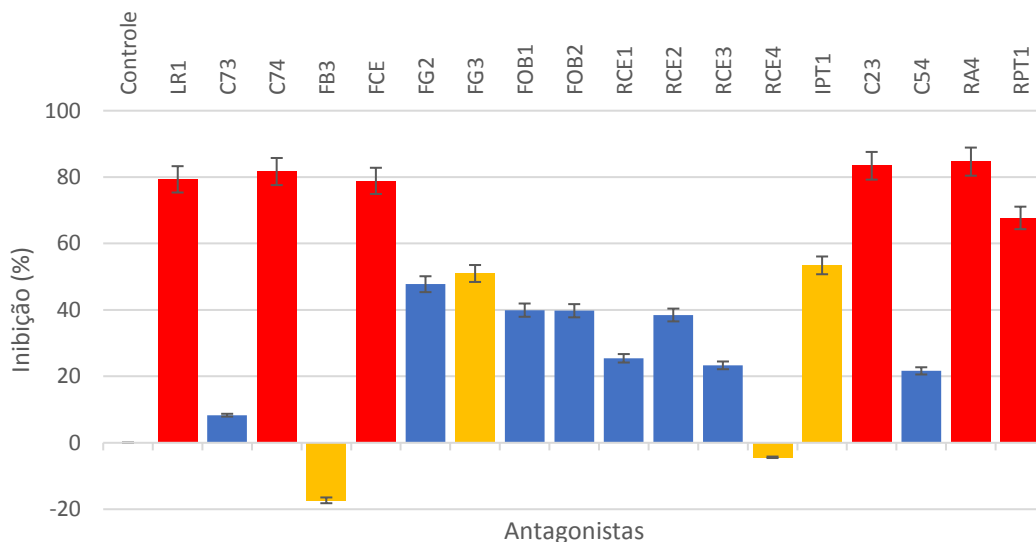


Figura 12. Avaliação da atividade antagonônica dos isolados por meio do ensaio de inibição direta por contra o crescimento micelial de *C. lindemuthianum*. As barras vermelhas destacam os 6 isolados que inibiriam acima de 60% do crescimento micelial do patógeno. As barras em amarelo destacam 4 isolados que inibiram 50 e 53% do crescimento micelial do patógeno. As barras em azul destacam os isolados que atingiram inibições abaixo das faixas classificatórias observadas (< 60%).

Para o ensaio de antagonismo indireto mediado por compostos difusíveis, os mesmos 18 isolados foram averiguados. Ficou constatado que as taxas de inibições variaram entre 45 e 97% (Figura 13), com destaque para alguns dos isolados que também tiveram elevadas taxas de inibição por contato direto. A partir destes resultados, 10 isolados foram selecionados para os ensaios de antagonismo indireto por compostos voláteis e pelo de termoestabilidade dos isolados.

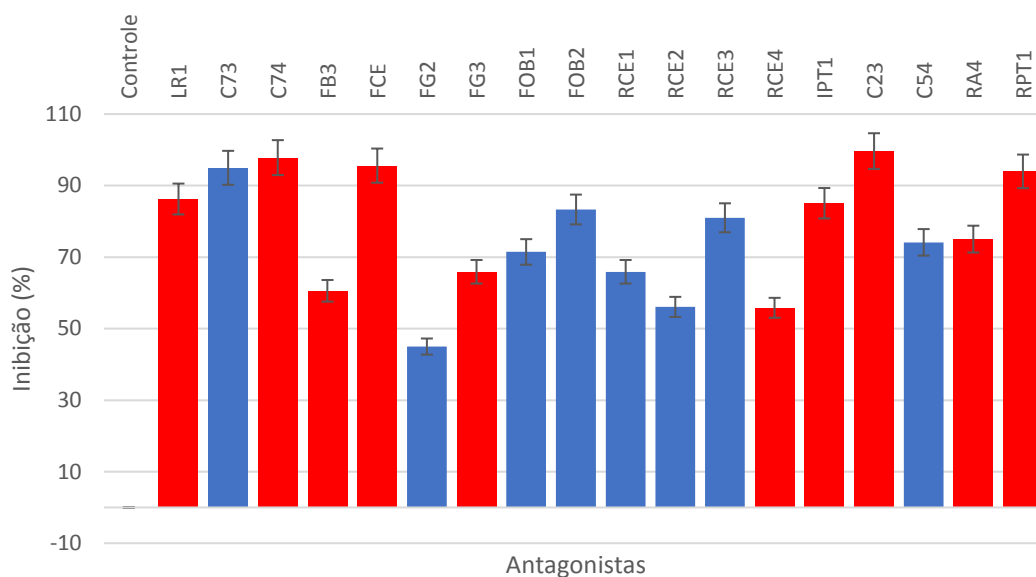


Figura 13. Avaliação da atividade antagonista dos isolados por meio do ensaio de inibição indireta por compostos difusíveis contra o crescimento micelial de *C. lindemuthianum*. As barras vermelhas destacam os 10 isolados que obtiveram os melhores resultados nos ensaios de inibição direta e indireta contra o crescimento micelial do patógeno. As barras em azul destacam os isolados desconsiderados das análises posteriores.

Os 10 melhores isolados selecionados até aqui foram então avaliados quanto sua capacidade de produzir compostos voláteis e a capacidade de inibir o patógeno após resistir a altas temperaturas. No ensaio de inibição indireta por compostos voláteis, todos os isolados demonstraram baixa capacidade inibitória. No geral as maiores inibições ficaram entre 21 e 33% (Figura 14), demonstrando que tais compostos influenciam pouco no processo inibitório.

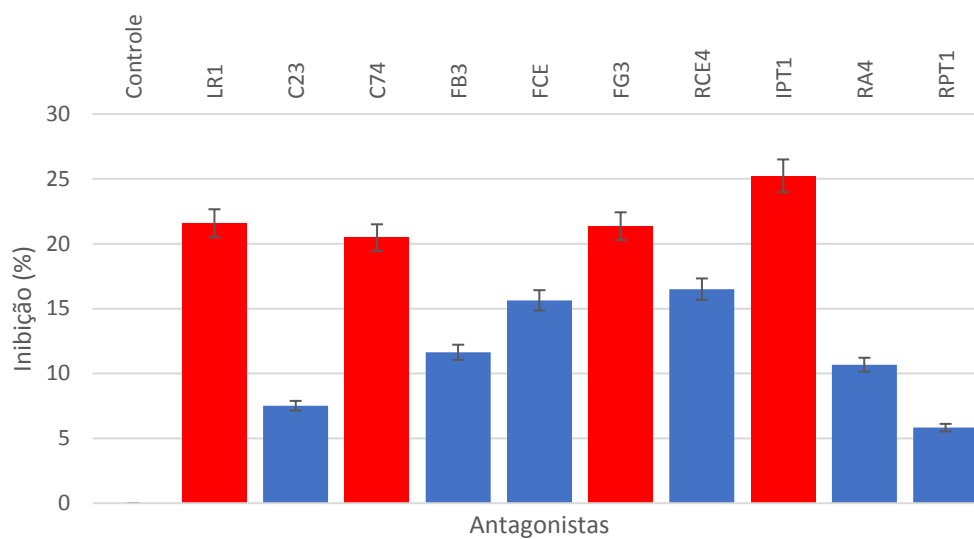


Figura 14. Avaliação da atividade antagônica dos isolados por meio do ensaio de inibição indireta por compostos voláteis contra o crescimento micelial de *C. lindemuthianum*. As barras vermelhas destacam os 4 isolados que obtiveram os melhores resultados no ensaio. As barras em azul destacam os isolados que tiveram desempenho inferior a 20%.

No ensaio de termoestabilidade dos isolados, quase a totalidade dos isolados foram afetados pelo tratamento térmico, demonstrando inatividade celular durante o período de 48h para reativação das células. Apenas 1 isolado (RPT1) resistiu ao tratamento e ainda assim apresentou alta eficiência inibitória contra o desenvolvimento micelial do patógeno (Figura 15).

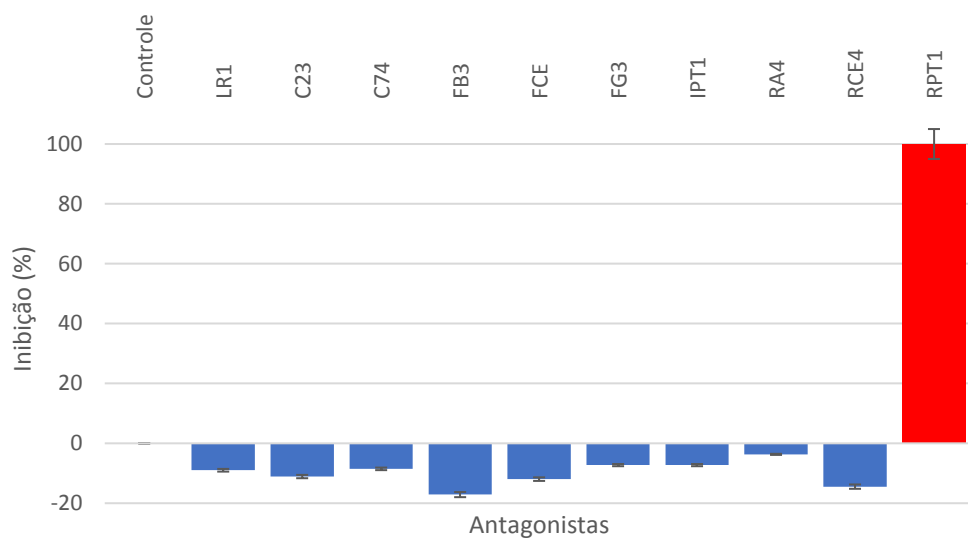


Figura 15. Avaliação da atividade antagônica dos isolados por meio do ensaio de inibição indireta por meio do ensaio de termoestabilidade dos isolados contra o crescimento micelial de *C.lindemuthianum*. As barras vermelhas destacam o único isolado (RPT1) a resistir ao tratamento térmico e inibir cerca de 90% do desenvolvimento micelial do patógeno.

A partir dos 18 isolados bacterianos previamente obtidos a partir de plantas e solos da região do QF, foi realizada a seleção do melhor antagonista pelos ensaios de inibição direta e indireta contra *Colletotrichum lindemuthianum*. Após criteriosa análise, 5 isolados (LR1, C23, C74, RA4 e RPT1) foram selecionados pelos elevados percentuais de taxas inibitórias (Figura 16).

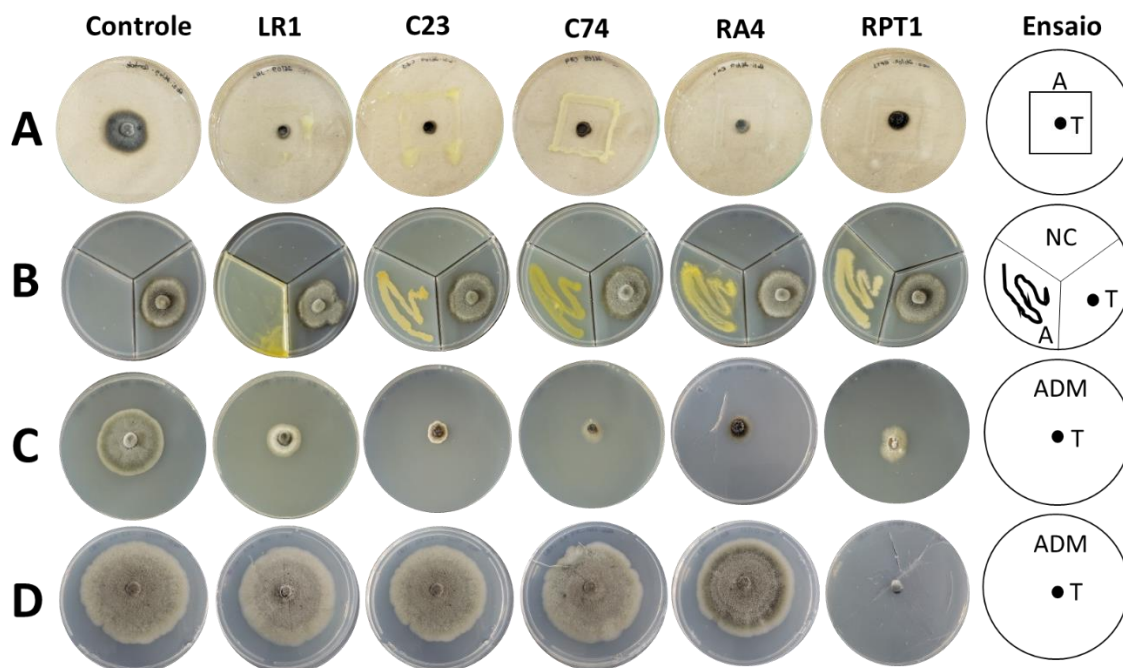


Figura 16. Avaliação dos ensaios de inibição direta e indireta dos isolados contra o crescimento micelial de *C. lindemuthianum*. Em (A) Inibição direta, no qual os isolados interagem diretamente com o patógeno. Em (B) Inibição indireta por compostos voláteis, no qual os compostos voláteis produzidos pelos isolados interagem com o patógeno. Em (C) Inibição indireta por compostos difusíveis, no qual os compostos produzidos em meio sólido interagem com o patógeno. Em (D) Inibição indireta após verificada termoestabilidade dos isolados, no qual os compostos produzidos pelos isolados após serem submetidos ao tratamento térmico (80°C – 5min), interagem com o patógeno. A= isolado bacteriano; T= disco micelial do patógeno; NC= ausência de isolado bacteriano e patógeno; ADM= meio sólido contendo compostos produzidos pelos isolados bacterianos.

No ensaio de inibição direta contra *C. lindemuthianum*, os 5 isolados apresentaram taxas de inibição acima de 67%, o isolado RPT1 foi o que obteve a menor taxa de inibição, enquanto a melhor inibição foi verificada no isolado RA4 contra o patógeno (Figura 16). No ensaio de inibição indireta por compostos não voláteis difusíveis contra *C. lindemuthianum*, os 5 isolados apresentaram taxas de inibição acima de 75%, o isolado RA4 foi o que obteve a menor taxa de inibição neste ensaio, enquanto a melhor inibição foi verificada no isolado C23 contra o patógeno. No ensaio de inibição indireta por compostos voláteis contra *C. lindemuthianum*, os 5 isolados apresentaram taxas de inibição entre 5 e 21%, o isolado LR1 foi o que obteve a menor taxa de inibição neste ensaio, enquanto a melhor inibição foi verificada no isolado LR1 contra o patógeno. No ensaio de inibição indireta após verificada a termoestabilidade dos isolados contra *C. lindemuthianum*, os 5 isolados apresentaram taxas

de inibição entre -11% e 90%, o isolado C23 foi o que obteve a menor taxa de inibição neste ensaio, enquanto a melhor inibição foi verificada no isolado RPT1 contra o patógeno (Figura 17).

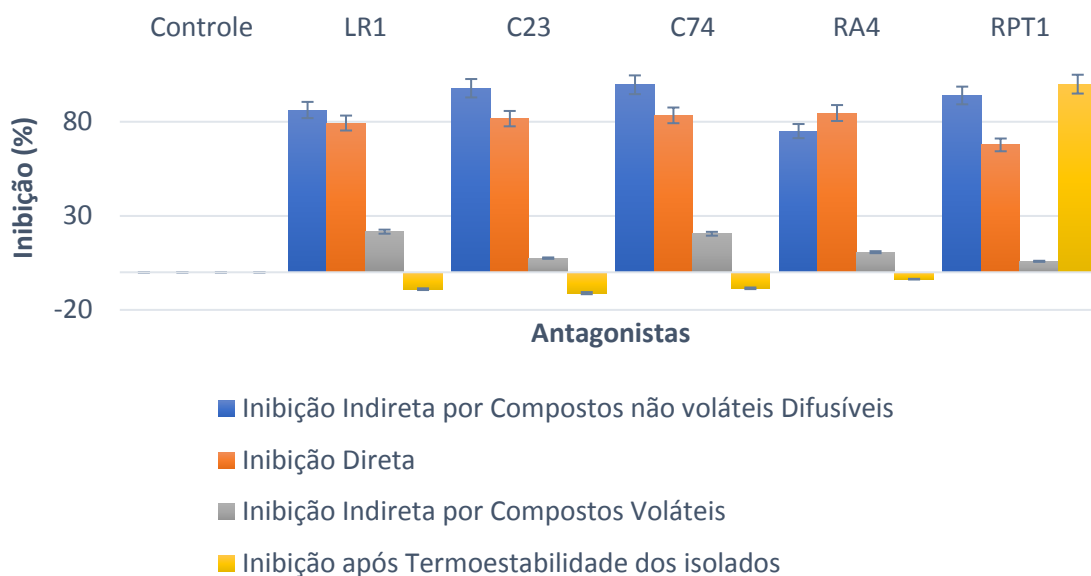


Figura 17. Análise das inibições nos diferentes ensaios realizados com os 5 isolados com maior potencial de antagonismo ao patógeno *C. lindemuthianum*.

Ao final dos ensaios de inibição contra *C.lindemuthianum*, com os 5 melhores candidatos a antagonistas, procedeu-se os ensaios visando avaliar a capacidade destes isolados em promoverem o crescimento de plantas *in vitro* e *in vivo*, no feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.).

5.3 Ensaios para promoção de crescimento de plantas *in vitro*

No ensaio de solubilização de fosfato, dos 5 isolados bacterianos avaliados 3 apresentaram capacidade de solubilizar fosfato inorgânico (PO_4^{3-}) em meio sólido fosfato. Os microrganismos que apresentaram halo transparente ao redor da colônia foram considerados positivos e os que não apresentaram halo foram considerados negativos para a solubilização de fosfato (Figura 18).

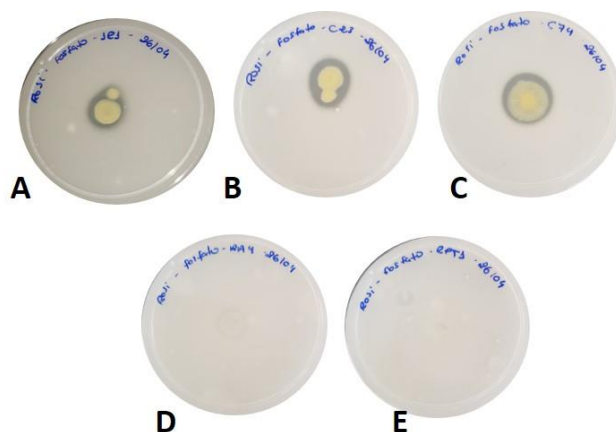


Figura 18. Ensaio de solubilização de fosfato em meio sólido fosfato. Em (A, B, C) os isolados LR1, C23 e C74 nos quais o resultado foi positivo para solubilização de fosfato. Em (D, E) os isolados RA4 e RPT1 nos quais o resultado foi negativo, não sendo possível visualizar a formação do halo transparente pelo método utilizado.

Para o ensaio de produção de sideróforos, dos 5 isolados bacterianos avaliados, 2 apresentaram capacidade de produzir sideróforos, sendo C23, C74. O isolado LR1 não apresentou produção de sideróforos, enquanto os isolados RA4 e RPT1, não foi observado halo nenhum no meio. Os microrganismos que apresentaram halo alaranjado ao redor dos isolados foram considerados positivos e os que não apresentaram halo foram considerados negativos para a produção de sideróforos, como pode ser observado na Figura 19.

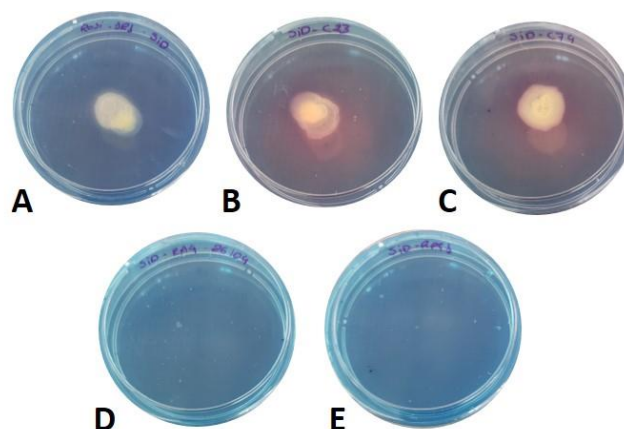


Figura 19. Ensaio de produção de sideróforos em meio sólido. Em (A) o isolado LR1, que apresentou halo branco e por tanto, considerado negativo para produção de sideróforos. Em (B, C) os isolados C23 e C74 nos quais o resultado foi positivo para produção de sideróforos. Em (D, E) os isolados RA4 e RPT1 nos quais o resultado foi negativo, não sendo possível visualizar a formação do halo pelo método utilizado.

5.4 Ensaios para promoção de crescimento de plantas em casa de vegetação *in vivo*

Os resultados obtidos não conseguiram ser conclusivos a respeito do potencial biotecnológico dos isolados bacterianos como agentes de promoção do crescimento vegetal *in vivo*. Foram selecionadas cinco bactérias LR1, C23, C74, RA4 e RPT1 para avaliar o efeito destes microrganismos e seus metabólicos em ensaios *in vivo* em casa de vegetação. Porém, por dificuldades encontradas durante a instalação do experimento, as plantas num primeiro momento apresentaram estiolamento, ocasionado pela ausência de luz no período de emergência (Figura 20). Na repetição do experimento, houve falhas no controle da umidade no interior da casa de vegetação, resultando no excesso de água e conseqüente encharcamento dos recipientes, como resultado as plantas não emergiram, tornando a avaliação do experimento inviável (Figura 21).



Figura 20. Ensaio de promoção de crescimento vegetal, em plantas de *Phaseolus vulgaris* apresentando estiolamento durante desenvolvimento em casa de vegetação (1º ensaio).



Figura 21. Ensaio de promoção de crescimento vegetal, em plantas de *Phaseolus vulgaris* apresentando clorose, ausência de germinação e encharcamento (lodo) durante desenvolvimento em casa de vegetação (2º ensaio).

5.5 Identificação das bactérias

Apenas os cinco isolados bacterianos (LR1, C23, C74, RA4 e RPT1), foram submetidos ao sequenciamento parcial do gene 16s para identificação das espécies. Os resultados do sequenciamento parcial do gene 16s foram positivos para 3 dos 5 isolados sequenciados. O isolado C23 foi identificado como pertencente ao gênero *Pantoea*, enquanto os isolados C74 e RA4 pertence ao gênero como *Acinetobacter*. (Quadro 2).

Quadro 2. Identificação dos isolados após o sequenciamento 16S.

ID LAB	ID 16S	Cobertura	P%ID	Acession	Gênero/Espécie
LR1	MD 44	-	-	-	-
C23	MD 25	96,57%	100%	LC498100.1	<i>Pantoea sp.</i>
C74	MD 29	99%	95,11%	MK875784.1	<i>Acinetobacter sp.</i>
RA4	MD 36	100%	94,79%	MK165150.1	<i>Acinetobacter sp.</i>
RPT1	MD 45	84%	83,55%	CP022427.1	<i>Pantoea ananatis</i>

5.6 Potencial de aplicação dos isolados

Com o objetivo de compilar todos os resultados deste trabalho foi criada uma tabela que permite identificar os isolados com maior potencial de aplicação (Tabela 1).

Tabela 1. Perfil dos isolados frente aos ensaios *in vitro* da atividade fisiológica e antifúngica contra *Colletotrichum lindemuthianum* e *Fusarium oxysporum*

Isolado	Inibição Direta <i>Fusarium</i>	Inibição Direta CIC89	Inibição Indireta Difusíveis CIC89	Inibição Indireta Voláteis CIC89	Inibição Indireta Termoestáveis CIC89	Solubilização de Fosfato	Produção de Sideróforo
LR1	51%	79%	86%	21%	-8%	+	-
C74	51%	81%	97%	7%	-11%	+	+
C23	25%	83%	99%	20%	-8%	+	+
RA4	23%	84%	75%	10%	-3%	-	-
RPT1	22%	67%	93%	5%	90%	-	-

* Isolados selecionados para o ensaio *in vivo* em casa de vegetação; (-) resultado do ensaio negativo; (+) resultado do ensaio positivo; *Fusarium oxysporum*; CIC89= *Colletotrichum lindemuthianum*.

6. DISCUSSÃO

6.1 Avaliação do potencial antagônico a plantas e de promoção de crescimento vegetal

A busca por controladores biológicos contra agentes fitopatogênicos tem sido uma constante (Zehnder *et al.*, 2001). Neste trabalho analisamos a capacidade de inibição de 62 isolados bacterianos (Caneschi *et al.*, 2018) obtidos partir de plantas e solos da região do QF em atuarem como controladores biológicos de *Colletotrichum*.

Inicialmente os ensaios de inibição foram conduzidos tendo como alvo *Fusarium*, agente causal da fusariose que afeta distintas culturas agrícolas, ocasionando prejuízos severos (Torres, 2000). O ensaio de antibiose direta contra este alvo revelou que as bactérias do QF foram capazes de induzir redução no crescimento do fungo com taxas variando entre 20 e 60% em meio de cultura. Apesar de não serem as melhores inibições para controle efetivo do patógeno os resultados apresentados neste trabalho se equiparam a outros trabalhos. Gonçalves e colaboradores, (2017) em seu estudo utilizando isolados bacterianos extraídos do rizoplano de solos agrícolas e sob vegetação nativa do cerrado, obtiveram inibições entre 50-60% no crescimento do patógeno. Mnasri e colaboradores, (2016) ao estudarem o antagonismo promovido por fungos e bactérias obtidos de raízes de trigo e cevada contra a murcha no tomate, obtiveram redução entre 30 a 65% no desenvolvimento micelial do patógeno quando comparados aos respectivos. Estudos realizados por Singh e colaboradores (1999), descrevem o sucesso em suprimir a murcha do pepino entre 64 e 71%, causada por *Fusarium oxysporum f. sp. cucumerinum*, ao utilizarem duas cepas bacterianas *Paenibacillus sp.* e *Streptomyces sp.* fato que nos abre novos leques para o futuro da pesquisa ao se combinar duas ou mais cepas bacterianas, afim de obter melhores resultados contra *Fusarium*. Proposta esta que abre oportunidade para novos ensaios combinando as melhores cepas (C23 e LR1) capazes de inibir *Fusarium* descritas neste trabalho.

A partir dos 18 isolados bacterianos que apresentaram taxas de inibição entre 20 e 60% contra *Fusarium*, ensaios para análise do potencial antagônico ao fungo fitopatogênico *Colletotrichum lindemuthianum* foram conduzidos. A seleção deste alvo deu-se pela importância da doença e pela ausência de produtos microbiológicos no mercado para atender a demanda crescente por tecnologias alternativas e ambientalmente menos danosas. A

antracnose é uma doença de destaque na queda da produção de feijões por todo o mundo (Padder; Sharma, 2010), o que agrega valores aplicáveis aos achados descritos neste trabalho.

Dos ensaios realizados para avaliar o antagonismo contra *Colletotrichum lindemuthianum*, percebeu significativa diferença entre os diferentes métodos utilizados neste estudo, o que corrobora uma série de trabalhos descritos na literatura com o mesmo propósito de busca de novos controladores a *Colletotrichum*. Teixeira e colaboradores (2010) obtiveram resultados similares ao confrontar isolados bacterianos isolados de solo contra os fungos fitopatogênicos, *C. lindemuthianum*, *S. sclerotiorum* e *F. solani*. Em seus resultados o melhor isolado foi capaz de inibir o desenvolvimento dos patógenos entre 61 e 97% e o isolado 73 demonstrou inibição de 94% ao ser confrontado contra *C. lindemuthianum* e *Pythium spp.*, apresentando médias de inibições de 94,4% e 47,9% respectivamente. Estudos similares conduzidos por Girish, 2018, rastreamam cerca de seis cepas bacterianas, obtidas do banco de coleção microbiana do Instituto de Tecnologia Microbiana (IMTECH) em Chandigarh, Índia, das quais duas pertencentes ao gênero *Bacillus* e *Pseudomonas*, que apresentaram atividade antifúngica significativa contra os dois fungos dos gêneros relatados neste trabalho, sendo a espécie *Colletotrichum falcatum* e *Fusarium moniliforme*. O que corrobora com a nossa hipótese na qual os isolados poderiam ser antagonistas de ambos os fungos utilizados em nosso estudo. Gholami e colaboradores,(2013) ao avaliarem isolados bacterianos oriundos de raízes de plantas obtiveram inibições de até 76% da taxa de crescimento do fungo em campo. Indicando o possível uso de isolados bacterianos como agentes de biocontrole.

Sileshi e colaboradores, (2014) obtiveram resultados contrastantes aos obtidos neste trabalho ao confrontarem fungos e bactérias antagonistas contra *C. lindemuthianum*, no estudo, os efeitos antagônicos de bactérias do gênero *Pseudomonas* foi de cerca de 40%, fato que releva a importância de nossos candidatos a antagonistas, visto que obtemos inibições de até 90% utilizando os isolados bacterianos do QF.

Nos ensaios por inibição indireta, as inibições por compostos voláteis foram pouco significativas atingindo máximo de 15% de taxa de inibição, demonstrando que a inibição observada no ensaio por contato direto não foi mediada por estes compostos. Padder e colaboradores (2011) em seus estudos obtiveram potencial inibidor promovido por compostos voláteis significativo quando comparados aos resultados deste trabalho, cerca de 55,98% utilizando o fungo *Trichoderma viride* no controle de *C. lindemuthianum*. A justificativa para

esta discrepância no potencial de inibição pode estar ligada ao fato de os autores terem usado um fungo como controlador, enquanto este trabalho focou no controle mediado por bactérias.

Apesar desta baixa inibição mediada por compostos voláteis, por compostos difusíveis as taxas de inibição foram bastante elevadas, variando entre 75 e 99% para os 5 isolados selecionados. Adicionalmente, o ensaio visando avaliar a inibição por isolados termoestáveis demonstrou que a bactérias antagonista RPT1 mostrou-se ser termófila e ainda manteve sua capacidade em produzir compostos com antagônicas, que ao serem difundidos em meio sólido, tiveram a capacidade de inibir o patógeno. Fato que demonstra a importância em estudar microrganismos de ambientes extremos, assim como suas potencialidades biotecnológicas, devida as pressões de seleções e resistência adquiridas por estes microrganismos ao longo da história.

Dos ensaios de promoção de crescimento vegetal *in vitro*, os isolados selecionados previamente, LR1, C23 e C74 obtiveram bons desempenhos na solubilização de fosfato, fato que os coloca evidencia, visto que, Nahas (2002) descreve em seu estudo sobre a pouca disponibilidade de microrganismos na rizosfera que possuem a capacidade de disponibilizar fosfato para as plantas, segundo o qual, cerca de 5 a 10% da microbiota total dos solos possuem essa capacidade.

Bactérias solubilizadoras de fosfato quando estão associadas a microrganismos benéficos ao solo melhoram o crescimento das plantas, contribuindo pelo aumento da produtividade. Dentre os mecanismos estão: a mineralização de nutrientes, pela solubilização de fosfatos minerais, ainda podem atuar como agentes quelantes de ferro e também produzem hormônios de crescimento como auxinas e giberelinas (Barbosa; Silveira; Leal, 2017). Chabot e colaboradores, (1996) chegaram à conclusão da solubilização de fosfato ser um bom mecanismo de promoção de crescimento de plantas ao avaliarem o efeito de BPCP de bactérias no desenvolvimento de alface e milho, em solo fértil e muito fértil, devido ao aumento da disponibilidade do nutriente para as plantas.

De acordo com Ullah e colaboradores (2015), as bactérias podem melhorar o crescimento das plantas por meio da fixação de nitrogênio, assim como atividades enzimáticas ou produção de substâncias como sideróforos e agentes quelantes, segundo o estudo, as bactérias solubilizantes de fosfato e aquelas que produziram sideróforos, além de melhorarem o crescimento das plantas, podem transformar metais pesados em formas solúveis e

biodisponíveis. Estes resultados corroboram tal estudo, de modo que, 2 dos cinco isolados avaliados apresentaram tanto a característica de produção de sideróforos e 3 isolados apresentaram a característica de solubilizar fosfato, alguns até ambas características.

Felestrino e colaboradores (2017) em seu estudo visando analisar a diversidade de bactérias Associadas a planta *Langsdorffia hypogaea*, no qual dos 81 isolados obtidos, 62 produziram sideróforos, resultado diferente dos obtidos em nosso estudo, mas evidencia a adaptação das plantas do Quadrilátero Ferrífero, assim como suas potencialidades. Padder e colaboradores (2011) ao avaliar as atividades antifúngicas de bioagentes e fungicidas que pode ser usado para controlar a antracnose do feijão, avaliaram que dos microrganismos utilizados, todos os antagonistas os bioagentes produziram sideróforos capazes de inibir o crescimento de micélios do patógeno, o que indica a relação entre antagonismo e produção de sideróforos. Fato evidenciado em nosso estudo, o que nos recorre a este como um dos possíveis mecanismos utilizados por nossos isolados dentre os outros que ainda precisam ser compreendidos.

Embora os resultados de promoção de crescimento vegetal *in vivo* tenham sido inconclusivos, devido às características observadas *in vitro*, a hipótese de promoção de crescimento de plantas e potencial agente de biocontrole ainda é vista como promissora como objetivos de estudos futuros. Andreote e colaboradores, (2014) descreve que a microbiota em interação com a rizosfera desempenha funções importantes na regulação fisiológica das plantas, essa interação segundo ele, ocorre por meio da biodisponibilização de nutrientes e por meio do controle de microrganismos patogênicos distribuídos no rizoplano, dentre os mecanismos coordenados por estes microrganismos, a promoção de crescimento através da produção de fitohormônios, produção de sideróforos e solubilização de fosfato, fato que corrobora nossa hipótese sobre o potencial destes microrganismos ainda pouco estudados.

6.2 Identificação das bactérias

Os resultados do sequenciamento parcial do gene 16s indicaram que os isolados C23 e RPT1 pertencem ao gênero *Pantoea*. Bactérias deste gênero fazem parte de um grupo de isolados encontrados em diversos nichos ecológicos, apresentam geralmente pigmentação amarela ou bege e mobilidade, são endofíticos não patogênicos de plantas (De Maayer *et al.*, 2012). Além disto, podem ser considerados como bons promotores de crescimento vegetal contribuindo por meio da produção de hormônios ácido indol-acético (IAA) e solubilização de fosfato (De Maayer *et al.*, 2012). Estudos demonstram a capacidade de cepas de *Pantoea*

em proteger as plantas contra várias doenças incluindo bacterioses em plantas, doenças fúngicas e podridões pós-colheita de frutas (De Maayer *et al.*, 2012; Smits *et al.*, 2011). Fato que corrobora com nossos resultados, pois o isolado C23 apresentou tanto a capacidade de solubilizar fosfato quanto de produzir sideróforos, embora o isolado RPT1 não obteve o mesmo desempenho nos ensaios avaliados, entretanto os dois isolados tiveram alto potencial antagonico verificado em seus compostos pelo ensaio de inibição indireta por compostos não voláteis difusíveis e pelo ensaio de inibição direta.

Os outros dois isolados identificados, C74 e RA4, pertencem ao gênero *Acinetobacter*. Este gênero tem como característica a presença de bacilos Gram-negativos, estritamente aeróbios, ubíquos, não fermentadores de glicose, com a presença de fímbrias que promovem mobilidade negativas, catalase positiva, oxidase negativa, apresentam ainda colônias mucóides quando as células são encapsuladas. Tem como temperatura ótima para desenvolvimento entre 20 e 37°C e um ótimo de temperatura entre 33 a 35°C. Frequentemente são saprófitas, e podem ocorrer naturalmente no solo, água, esgoto e alimentos como vegetais crus, assim como na pele e no trato respiratório humano (Juni. E, 2015). Estudos demonstraram que bactérias do gênero *Acinetobacter*, promoveram inibição de até 49% ao serem confrontadas contra *Fusarium oxysporum*, resultados que colaboram com os encontrados neste estudo (Ks; Jahagirdar; Dn, 2018), ao serem confrontados contra *Fusarium*, o isolado C74 promoveu inibição de 51% no desenvolvimento micelial do patógeno, fato contrastante foi obtido com o isolado RA4 que inibiu 23% do patógeno. Em contrapartida, ao serem utilizados contra *C. lindemuthianum* ambos os isolados demonstraram alta capacidade inibitória pelo mesmo ensaio realizado anteriormente contra *Fusarium*, atingindo inibição de 81 e 84% respectivamente, para C74 e RA4, o que evidencia o potencial destes isolados em inibirem o desenvolvimento micelial de fungos patogênicos.

Apesar dos resultados de sequenciamento não terem sido satisfatórios para o isolado LR1, outras tentativas de sequenciamento serão conduzidas para que se possa ter uma certeza a que gênero o isolado pertence, permitindo assim outras abordagens metodológicas de investigação de seu potencial.

CONCLUSÕES

O ecossistema do Quadrilátero Ferrífero, representado neste estudo por microrganismos de solo e plantas, tem com este trabalho retratado pela primeira vez o antagonismo e a promoção de crescimento vegetal *in vitro*.

Dos 62 isolados bacterianos avaliados, 18 foram capazes de inibir *Fusarium* entre 20, 25 e acima de 50%

5 isolados: LR1, C23, C74, RA4 e RPT1, inibiram entre 75 e 90% do fungo *Colletotrichum lindemuthianum*

3 (LR1, C23 e C74) apresentaram capacidade de solubilizar fosfato inorgânico (PO_4^{3-}) em meio sólido fosfato

2 (C23, C74), apresentaram a capacidade de produzir sideróforos

Os isolados C23 e C74 apresentaram os melhores resultados nos ensaios realizados, e portanto, são os isolados com melhor potencial biotecnológico

Foi possível identificar 2 gêneros, dos isolados avaliados: *Pantoea* e *Acinetobacter*.

PERSPECTIVAS

Estudos mais avançados serão realizados, visando confirmar a capacidade dos isolados em promover o antagonismo a fungos de interesse agrícola assim como a promoção do crescimento vegetal.

- Ensaio em casa de vegetação com inoculação em diferentes estádios de desenvolvimento da planta;
- Ensaio a campo para observar a adaptação a microbiota existente;
- Testar a atividade antifúngica para o *Colletotrichum lindemuthianum in vivo*;
- Testar isolados em outras culturas;
- Analisar os extratos orgânicos do isolado selecionado por diferentes métodos cromatográficos;
- Caracterizar a capacidade antagônica destes isolados por meios de ensaios bioquímicos;
- Obter extratos orgânicos do isolado selecionado com diferentes solventes; Testar a antibiose frente ao *Colletotrichum lindemuthianum* causador da antracnose no feijoeiro, *in vivo*;
- Avaliar a capacidade destes isolados de atuarem como promotores de crescimento em plantas de interesse agrícola.

Esperamos ainda, publicar um artigo destacando os resultados apresentados, colocando em evidência a experiência da equipe e capacidade do laboratório, como os pioneiros dentro da Universidade a conduzir de um trabalho voltado para área agrícola, nas dependências da instituição, utilizando microrganismos do QF. Parte destas atividades serão finalizadas durante meu estagio doutoral na UFOP, junto ao PPG Biotecnologia e sob orientação do prof. Leandro Marcio Moreira.

ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O MESTRADO

• Resumos publicados em anais de congressos

MATOS, R. C.; SILVA, S. A.; CORDEIRO, I. F.; LEMES, C. G. C.; SANCHEZ, A. B.; QUEIROZ, M. V.; MOREIRA, L.M. Antagonistic activity of bacteria from quadrilátero ferrífero, Minas Gerais, to *Colletotrichum lindemuthianum*. In: III International Symposium on Fungal Stress - ISFUS, 2019, São José dos Campos - SP. Annals of the International Symposium on Fungal Stress - ISFUS, 2019.

LEMES, C. G. C.; VILLA, M. M.; **MATOS, R. C.;** KAMINO, L. H. Y.; CARMO, F. F.; FERRO, J. A.; MOREIRA, L.M. Potential of isolates obtained from canga caves of the Quadrilátero Ferrífero as Plant Growth-Promoting Bacterial. In: Simpósio Internacional em Microbiologia Agrícola - SIMA, 2019, Lavras. Anais do Simpósio Internacional em Microbiologia Agrícola, 2019.

MATOS, R. C.; SILVA, S. A.; CORDEIRO, I. F.; LEMES, C. G. C.; SANCHEZ, A. B.; QUEIROZ, M. V.; MOREIRA, L.M. Atividade antagônica de bactérias do quadrilátero ferrífero contra *Colletotrichum lindemuthianum*. In: VI Simpósio de Microbiologia da UFMG - CONECTA SIM: Microbiologia Interligada, 2019, Belo Horizonte. Anais do Simpósio de Microbiologia da UFMG, 2019.

FERNANDES, C. H. P.; CORDEIRO, I. F.; SANCHEZ, A. B.; **MATOS, R. C.;** MOREIRA, L.M. Potencial antifúngico de isolados bacterianos obtidos a partir da epiderme de anuros do quadrilátero ferrífero - MG. In: VI Simpósio de Microbiologia da UFMG - CONECTA SIM: Microbiologia Interligada. Belo Horizonte. Anais do Simpósio de Microbiologia da UFMG, 2019.

MATOS, R. C.; SILVA, S. A.; CORDEIRO, I. F.; LEMES, C. G. C.; SANCHEZ, A. B.; QUEIROZ, M. V.; MOREIRA, L.M. Atividade antagônica de bactérias do quadrilátero ferrífero contra *Colletotrichum lindemuthianum*. In: IV Mostra de Pós-Graduação da UFOP/ Encontro de Saberes. Ouro Preto. Anais do SEIC - UFOP, 2019.

SILVA, S. A.; **MATOS, R. C.;** SANCHEZ, A. B.; LEMES, C. G. C.; DAMASCENO, M. R. A.; CORDEIRO, I. F.; ROCHA, L. C. M.; CANESCHI, W. L.; MOREIRA, L.M.; GARCIA, C. C. M. Investigação e aplicação biotecnológica de bactérias com elevada capacidade de sobrevivência e remoção de danos de DNA. In: IV Mostra de Pós-Graduação da UFOP / Encontro de Saberes. Ouro Preto. Anais do SEIC - UFOP, 2019.

MATOS, R. C.; SILVA, S. A.; CORDEIRO, I. F.; LEMES, C. G. C.; SANCHEZ, A. B.; QUEIROZ, M.V.; MOREIRA, L.M. Antagonistic activity of bacteria from Quadrilátero Ferrífero, Minas Gerais, to *Colletrotrichum lindemuthianum*. In: Simpósio Internacional em Microbiologia Agrícola - SIMA, 2019, Lavras. Anais do Simpósio Internacional em Microbiologia Agrícola, 2019.

• **Apresentações de Trabalho**

MATOS, R. C.; SILVA, S. A.; CORDEIRO, I. F.; LEMES, C. G. C.; SANCHEZ, A. B.; QUEIROZ, M. V.; MOREIRA, L.M. Antagonistic activity of bacteria from the Iron Quadrangle to *Colletrotrichum lindemuthianum*, 2019.

MATOS, R. C.; SILVA, S. A.; CORDEIRO, I. F.; LEMES, C. G. C.; SANCHEZ, A. B.; QUEIROZ, M. V.; MOREIRA, L.M. Atividade antagônica de bactérias do quadrilátero ferrífero contra *Colletrotrichum lindemuthianum*, 2019.

MATOS, R. C.; SILVA, S. A.; CORDEIRO, I. F.; LEMES, C. G. C.; SANCHEZ, A. B.; QUEIROZ, M. V.; MOREIRA, L.M. Atividade antagônica de bactérias do quadrilátero ferrífero contra *Colletrotrichum lindemuthianum*, 2019.

MATOS, R. C.; SILVA, S. A.; CORDEIRO, I. F.; LEMES, C. G. C.; SANCHEZ, A. B.; QUEIROZ, M. V.; MOREIRA, L.M. Antagonistic activity of bacteria from the Iron Quadrangle to *Colletrotrichum lindemuthianum*, 2019.

• **Participação em eventos:**

III International Symposium on Fungal Stress. Antagonistic activity of bacteria from quadrilátero ferrífero, minas gerais, to *Colletrotrichum lindemuthianum*, 2019.

IV Mostra de Pós-Graduação da UFOP / Encontro de Saberes. Universidade Federal de Ouro Preto, 2019.

Simpósio Internacional em Microbiologia Agrícola. Universidade Federal de Lavras, 2019.

VI Simpósio de Microbiologia da UFMG / CONECTA SIM: Microbiologia Interligada, 2019.

V Curso de Verão em Biotecnologia - Biostartups. Universidade Federal de Ouro Preto, 2018.

REFERÊNCIAS

- AHMED, N.; SHAHAB, S. Phosphate Solubilization: Their Mechanism Genetics And Application. *The Internet Journal of Microbiology*, v. 9, n. 1, 2009.
- ANDREOTE, F. D.; GUMIERE, T.; DURRER, A. Exploring interactions of plant microbiomes. *Scientia Agricola*, v. 71, n. 6, p. 528–539, dez. 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-90162014000600013&lng=en&tlng=en>.
- BALARDIN, R. S.; JAROSZ, A. M.; KELLY, J. D. Virulence and molecular diversity in *Colletotrichum lindemuthianum* from South, Central, and North America. *Phytopathology*, v. 87, n. 12, p. 1184–1191, 1997.
- BARBOSA, A.; SILVEIRA, L.; LEAL, P. Caracterização de rizobactérias associadas à melocactus conoideus quanto a mecanismos de promoção de crescimento de plantas. *Revista Ciência e Desenvolvimento*, v. 10, n. 3, p. 328–345, 2017.
- BARBOSA, G. V. Superfícies de erosão no quadrilátero ferrífero, Minas Gerais. *Revista Brasileira de Geociências*. [S.l.: s.n.], 1980. v. 10. p. 90–101.
- BECKMAN, C. H. *The Nature of Wilt Diseases of Plants*. St. Paul, Minnesota, USA: APS Press, 1987.
- BISHOP, C. D.; COOPER, R. M. An ultrastructural study of vascular colonization in three vascular wilt diseases I. Colonization of susceptible cultivars. *Physiological Plant Pathology*, v. 23, n. 3, p. 323–343, 1 nov. 1983. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0048405983900188>>. Acesso em: 29 jan. 2020.
- BULGARELLI, D. *et al.* Structure and Functions of the Bacterial Microbiota of Plants. *Annual Review of Plant Biology*, v. 64, n. 1, p. 807–838, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120106>>.
- CAMARGO, O. *et al.* Identification of *Glomerella cingulata* f. sp. phaseoli recombinants by RAPD markers. *Genetics and molecular research : GMR*, v. 6, p. 607–615, 2007.
- CANESCHI, W. L. *et al.* Brazilian ironstone plant communities as reservoirs of culturable bacteria with diverse biotechnological potential. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, n. JUL, p. 1–17, 2018.

- CARMO, F. F.; KAMINO, L. H. Y. *Geoespeleologia em rochas ferríferas: Cenário atual e conservação*. [S.l: s.n.], 2015. Disponível em: <<http://www.institutoprístico.org.br/wp-content/uploads/2016/03/Geossistemas-ferruginosos-no-Brasil-CD.pdf>>.
- CHABOT, R.; ANTOUN, H.; CESCAS, M. P. Growth promotion of maize and lettuce by phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar. phaseoli. *Plant and Soil*, v. 184, n. 2, p. 311–321, jun. 1996. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF00010460>>.
- CONAB. Acompanhamento da safra brasileira 2016. *Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos 2012/2013*, p. 1–29, 2017a.
- CONAB, C. N. DE A. Perspectivas agropecuária 2018/19. v. 6, p. 104, 2017b. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>.
- COTET, G. B.; BALGIU, B. A.; ZALESCHI (NEGREA), V. – C. Assessment procedure for the soft skills requested by Industry 4.0. *Matec Web of Conferences*, v. 121, n. 2, p. 07005, 9 ago. 2017. Disponível em: <[https://www.uam.es/gruposinv/meva/publicaciones/jesus/capitulos_espanyol_jesus/2005_motivacion para el aprendizaje Perspectiva alumnos.pdf](https://www.uam.es/gruposinv/meva/publicaciones/jesus/capitulos_espanyol_jesus/2005_motivacion%20para%20el%20aprendizaje%20Perspectiva%20alumnos.pdf)><https://www.researchgate.net/profile/Juan_Aparicio7/publication/253571379_Los_estudios_sobre_el_cambio_conceptual_>.
- DARBEN, L. M. *et al.* Common bean germplasm resistant to races 73 and 2047 of *Colletotrichum lindemuthianum*. *African Journal of Biotechnology*, v. 16, n. 19, p. 1142–1149, 2017.
- DE MAAYER, P. *et al.* The large universal Pantoea plasmid LPP-1 plays a major role in biological and ecological diversification. *BMC Genomics*, v. 13, n. 1, p. 1–12, 2012.
- DELGADO-SALINAS, A. *et al.* Phylogenetic analysis of the cultivated and wild species of *Phaseolus* (Fabaceae). *Systematic botany*, v. 24, n. 3, p. 438–460, 1999. Disponível em: <<https://doi.org/10.2307/2419699>>.
- DIANA, J. E.; PUI, C. F.; SON, R. Enumeration of *Salmonella* spp., *Salmonella typhi* and *Salmonella typhimurium* in fruit juices. *International Food Research Journal*, v. 19, n. 1, p. 51–56, 2012.
- DORR, J. V. N. *Physiographic, Stratigraphic and Structural Development of the Quadrilátero Ferrífero Minas Gerais, Brazil*. [S.l: s.n.], 1969. v. 2. Disponível em: <<https://pubs.usgs.gov/pp/0641a/report.pdf>>.

- DUAN, J. *et al.* The Complete Genome Sequence of the Plant Growth-Promoting Bacterium *Pseudomonas sp.* Uw4. *Plos One*, v. 8, n. 3, 2013.
- DUIJFF, B. J. *et al.* Microbial antagonism at the root level is involved in the suppression of Fusarium wilt by the combination of non pathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47 and *Pseudomonas putida* WCS358. *Phytopathology*, v. 89, n. 11, p. 1073–1079, 1999.
- ESPAÑA, M. D. *et al.* Eucalyptus leaf byproduct inhibits the anthracnose-causing fungus *Colletotrichum gloeosporioides*. *Industrial Crops and Products*, v. 108, n. July, p. 793–797, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.08.002>>.
- FALLEIROS, M. O. *et al.* Mixture of *Colletotrichum lindemuthianum* races in anthracnose resistance screening and its implication for common bean breeding. *Tropical Plant Pathology*, v. 43, n. 3, p. 271–277, 2018.
- FELESTRINO, ÉRICA B. *et al.* Plant growth promoting bacteria associated with *Langsdorffia Hypogaea*-Rhizosphere-Host biological interface: A neglected model of bacterial prospectation. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, n. FEB, p. 20–34, 2017.
- FELESTRINO, ÉRICA BARBOSA *et al.* *Alcaligenes faecalis* associated with Mimosa calodendron rhizosphere assist plant survival in arsenic rich soils. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, v. 17, n. 4, p. 1102–1115, 2017.
- FISHER, N. L. *et al.* Carnation Leaves as a Substrate and for Preserving Cultures of Fusarium species. *Phytopathology*, v. 72, n. 1, p. 151–153, 1982.
- GEPTS, P. *et al.* Genomics of Phaseolus Beans, a Major Source of Dietary Protein and Micronutrients in the Tropics. *Genomics of Tropical Crop Plants*. [S.l: s.n.], 2008. .
- GERKE, J. Phosphate, aluminium and iron in the soil solution of three different soils in relation to varying concentrations of citric acid. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde*, v. 155, n. 4, p. 339–343, 1992. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jpln.19921550417>>.
- GHOLAMI, M.; KHAKVAR, R.; ALIASGHARZAD, N. Application of endophytic bacteria for controlling anthracnose disease (*Colletotrichum lindemuthianum*) on bean plants. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, v. 46, n. 15, p. 1831–1838, 2013.
- GIRISH, K.; SUSHMA, G. Screening of bacteria for antifungal activity against phytopathogenic fungi of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *EurAsian Journal of*

BioSciences, v. 12, n. 2, p. 195–203, 2018.

GLICK, B. R. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. *Scientifica*, v. 2012, p. 1–15, 2012. Disponível em:

<<http://www.hindawi.com/journals/scientifica/2012/963401/>>.

GONÇALVES, O. S. *et al.* Prospecção de *Bacillus subtilis* como agente de biocontrole contra *fusarium sp.* *Revista Mirante*, v. 10, n. 19814089, 2017.

GOULART, A. C. P. *Fungos em Sementes de Soja -Detecção, Importância e Controle*. [S.l: s.n.], 2005.

HALFELD-VIEIRA, B. D. A. *et al.* *Defensivos Agrícolas Naturais: Uso e Perspectivas*. [S.l: s.n.], 2016.

HALLMANN, J.; RODRÍGUEZ-KÁBANA, R.; KLOEPPER, J. Chitin-mediated changes in bacterial communities of the soil, rhizosphere and within roots of cotton in relation to nematode control. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 31, p. 551–560, 1999.

HOOG, G. S. DE *et al.* Atlas of clinical fungi (2nd edn). G.S. de Hoog, J. Guarro, J. Gené, M.J. Figueras. n. February, 2014.

IBGE. *Ibge. Ambiência*. [S.l: s.n.], 2017. v. 30. p. 1–81.

KHAN, M. S. *et al.* Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi - Current perspective. *Archives of Agronomy and Soil Science*, v. 56, n. 1, p. 73–98, 2009.

KIMATI, H.; GALLI, F. *Glomerella cingulata* sp. phaseoli, Fase ascógena do agente causal da antracnose do feijoeiro. *Anais da E.S.A. Luiz de Queiroz*, v. 28, 1970.

KLOEPPER, J. W. *et al.* Plant root-bacterial interactions in biological control of soilborne diseases and potential extension to systemic and foliar diseases. *Australasian Plant Pathology*, v. 28, n. 1, p. 21–26, 1999.

KLOEPPER, JOSEPH W.; RYU, C. M.; ZHANG, S. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus spp.* *Phytopathology*, v. 94, n. 11, p. 1259–1266, 2004.

KOBAYASHI, T.; NISHIZAWA, N. Iron Uptake, Translocation, and Regulation in Higher Plants. *Annual review of plant biology*, v. 63, p. 131–152, 2012.

KS, B.; JAHAGIRDAR, S.; DN, K. Antagonistic activity of bacterial endophytes against major soilborne pathogens of soybean. v. 6, n. 6, p. 43–46, 2018.

- LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. The Fusarium Laboratory Manual. *The Fusarium Laboratory Manual*, p. 1–388, 2007.
- MASSENSINI, A. M. *et al.* Solubilização potencial de fosfatos mediada pela microbiota rizosférica de eucalipto cultivado em topossequência típica da zona da mata mineira. *Revista Brasileira de Ciencia do Solo*, v. 39, n. 3, p. 692–700, 2015.
- MENDGEN, K.; HAHN, M.; DEISING, H. Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology*, v. 34, n. 1, p. 367–386, 1996. Disponível em: <<https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.34.1.367>>.
- MENEZES, M. Aspectos biológicos e taxonômicos de espécies do gênero colletotrichum. *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica*, v. 3, n. 0, p. 170–179, 2006.
- MERCADO-RUARO, P.; DELGADO-SALINAS, A. Karyotypic studies on species of Phaseolus (Fabaceae: Phaseolinae). *American Journal of Botany*, v. 85, n. 1, p. 1–9, 1998.
- MESSINGER, A. N. N. J. M.; BARCLAY, R. Production of siderophores. *Biochemical Education*, v. 11, n. 2, p. 49–88, 1983.
- MNASRI, N. *et al.* Efficacy of some rhizospheric and endophytic bacteria in vitro and as seed coating for the control of Fusarium culmorum infecting durum wheat in Tunisia. *European Journal of Plant Pathology*, v. 147, n. 3, p. 501–515, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10658-016-1018-3>>.
- MORANDI, M. A.; BETTIOL, W. Controle Biológico de Doenças de Plantas no Brasil Marcos Históricos do Controle Biológico de Doenças de Plantas no Brasil. p. 7–15, 2008.
- NAHAS, E. Microrganismos do solo produtores de fosfatases em diferentes sistemas agrícolas. *Bragantia*, v. 61, n. 3, p. 267–275, 2002.
- NELSON, P E. Taxonomy of fungi in the genus *Fusarium* with emphasis on *Fusarium oxysporum*. *Fusarium wilt of banana*. [S.l: s.n.], 1990. p. 27–35.
- NELSON, PAUL E; DIGNANI, M. C.; ANAISSIE, E. J. Taxonomy, biology, and clinical aspects of Fusarium species. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 7, n. 4, p. 479–504, 1994.
- O'DONNELL, K. *et al.* Internet-Accessible DNA Sequence Database for Identifying Fusaria from Human and Animal Infections. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 48, n. 10, p. 3708 LP – 3718, 1 out. 2010. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/content/48/10/3708.abstract>>.

OHARA, T.; TSUGE, T. FoSTUA, Encoding a basic helix-loop-helix protein, differentially regulates development of three kinds of asexual spores, macroconidia, microconidia, and chlamydospores, in the fungal plant pathogen *Fusarium oxysporum*. *Eukaryotic Cell*, v. 3, n. 6, p. 1412–1422, 2004.

OLIVEIRA-FILHO, E. C.; FARIA, M. R.; CASTRO, M. L. M. P. DE. Regulamentação de produtos biológicos para o controle de pragas agrícolas. *Recursos Genéticos*, 2004.

Disponível em: <<http://agris.fao.org/agris-search/search/display.do?f=2012/BR/BR2012100600006.xml;BR20041185447>>.

OTEINO, N. *et al.* Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates. *Frontiers in Microbiology*, v. 6, n. JUL, p. 1–9, 2015.

PADDER, B. A. *et al.* *Colletotrichum lindemuthianum*, the causal agent of bean anthracnose. *Journal of Plant Pathology*, v. 99, n. 2, p. 317–330, 2017a.

PADDER, B. A. *et al.* Offered review *Colletotrichum lindemuthianum*, the causal agent of. *Journal of Plant Pathology*, v. 99 (2), n. March, p. 317–330, 2017b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4454/jpp.v99i2.3867>>.

PADDER, B. A.; SHARMA, P. N. Distribution of *Colletotrichum lindemuthianum* Race Flora and its Implication in Deployment of Resistant Sources across Himachal Pradesh. *Research Journal of Agricultural Sciences*, v. 1, n. 1, p. 1–6, 2010.

PADDER, B. A.; SHARMA, P. N. In vitro and in vivo antagonism of biocontrol agents against *Colletotrichum lindemuthianum* causing bean anthracnose. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, v. 44, n. 10, p. 961–969, 2011.

QUEIPO-ORTUNO, M. I. *et al.* Preparation of Bacterial DNA Template by Boiling and Effect of Immunoglobulin G as an Inhibitor in Real-Time PCR for Serum Samples from Patients with Brucellosis. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 15, n. 2, p. 293–296, 1 fev. 2008. Disponível em: <<http://cvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/CVI.00270-07>>.

REICHARD, P. U. *Effects of Microbial and Plant Siderophore Ligands on Dissolution of Iron Oxides*. 2005. 12–19 f. 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.3929/ethz-a-010025751>>.

RIGOTTO, R. M.; VASCONCELOS, D. P. E; ROCHA, M. M. Pesticide use in Brazil and problems for public health. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 30, n. 7, p. 1360–1362, jul. 2014.

Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2014000701360&lng=en&tlng=en>.

SAHA, M. *et al.* Microbial siderophores and their potential applications: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 23, n. 5, p. 3984–3999, 2016.

SAMBUICHI, R. H. R. *et al.* Antecedente e aspectos fundantes da agroecologia e produção orgânica na agenda das políticas públicas no Brasil. [S.l: s.n.], 2017.

SCHWYN, B.; NEILANDS, J. B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*, v. 160, n. 1, p. 47–56, 1987.

SHARMA, S. B. *et al.* Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils Seema. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 35, n. 12, p. 3305–3307, 2013.

SILESHI, F. *et al.* In vitro evaluation of some fungicides and bioagents against common bean anthracnose (*Colletotrichum lindemuthianum* Sacc. Magnus) Briosi Cavara. *African Journal of Microbiology Research*, v. 8, n. 20, p. 2000–2005, 2014.

SINGH, P. P. *et al.* Biological control of *Fusarium* wilt of cucumber by chitinolytic bacteria. *Phytopathology*, v. 89, n. 1, p. 92–99, 1999.

SMITS, T. H. M. *et al.* Metabolic versatility and antibacterial metabolite biosynthesis are distinguishing genomic features of the fire blight antagonist *Pantoea vagans* C9-1. *PLoS ONE*, v. 6, n. 7, 2011.

STOREY, E. *et al.* Characterization of ‘Schizokinen’; a dihydroxamate-type siderophore produced by *Rhizobium leguminosarum* IARI 917. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*, v. 19, p. 637–649, 2007.

TEIXEIRA, A. P.; FILHO, D. D. S. J. Isolamento de microrganismos do solo com ênfase no controle biológico de patógenos de importância econômica. n. 2007, 2010.

TORRES, G. A. Algunos aspectos de los hongos del genero *Fusarium* y de la especie *Fusarium oxysporum*. *Agronomia Colombiana*, v. 17, n. 1–3, p. 11–22, 2000.

ULLAH, A. *et al.* Phytoremediation of heavy metals assisted by plant growth promoting (PGP) bacteria: A review. *Environmental and Experimental Botany*, v. 117, n. January, p. 28–40, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2015.05.001>>.

VASSILEV, N. *et al.* Improved plant growth with rock phosphate solubilized by *Aspergillus niger* grown on sugar-beet waste. v. 55, p. 237–241, 1996.

VASSILEVA, M. *et al.* Effect of encapsulated cells of *Enterobacter* sp on plant growth and phosphate uptake. *Bioresource Technology - bioresource Technol*, v. 67, p. 229–232, 1999.

WINDING, A.; BINNERUP, S. J.; PRITCHARD, H. Non-target effects of bacterial biological control agents suppressing root pathogenic fungi. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 47, n. 2, p. 129–141, fev. 2004. Disponível em: <[https://academic.oup.com/femsec/article-lookup/doi/10.1016/S0168-6496\(03\)00261-7](https://academic.oup.com/femsec/article-lookup/doi/10.1016/S0168-6496(03)00261-7)>.

ZEHNDER, G. *et al.* Application of Rhizobacteria for Induced Resistance. *European Journal of Plant Pathology*, v. 107, p. 39–50, 2001.