

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

Isolamento e caracterização de bactérias produtoras de compostos orgânicos voláteis (COVs) com aplicação agrônômica

Julia Capozzi Franke

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2023**

Julia Capozzi Franke
Engenheira Agrônoma

Isolamento e caracterização de bactérias produtoras de compostos orgânicos voláteis (COVs) com aplicação agrônoma
versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **FERNANDO DINI ANDREOTE**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Franke, Julia Capozzi

Isolamento e caracterização de bactérias produtoras de compostos orgânicos voláteis (COVs) com aplicação agrônômica / Julia Capozzi Franke. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2023.

103 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

1. Bactérias rizosféricas 2. Biocontrole 3. Promoção de crescimento I. Título

*Dedico este trabalho aos meus pais
Edio e Vivian e às minhas irmãs
Nathalia e Stella.*

*Vocês são minha inspiração e
motivação para buscar meus
objetivos a cada dia.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais que sempre me incentivaram e tornaram possível a minha educação, assim também como minhas irmãs pelo apoio e companheirismo.

Aos meus amigos por estarem comigo diariamente durante toda essa trajetória.

Ao meu orientador Fernando, assim como todos os membros do Laboratório de Microbiologia do Solo que me auxiliaram de alguma forma durante o processo, permitindo que o presente trabalho tenha sido realizado.

À empresa Andrios Assessoria pela oportunidade e aos meus colegas de trabalho Alessandra, Felipe, Bruna e Stella, por tornarem a minha caminhada mais leve e divertida e, em especial, ao Armando, por todo o suporte necessário durante o desenvolvimento deste projeto.

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT	8
1. INTRODUÇÃO.....	9
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1. Características dos compostos voláteis microbianos	11
2.2. Fatores que influenciam a produção de compostos voláteis.....	12
2.3. Compostos voláteis em interações microbianas	13
2.3.1. Controle biológico	16
2.3.2. Toxicidade direta contra patógenos.....	17
2.3.3. Controle de pragas	18
2.3.4. Disrupção do quorum sensing	18
2.4. Compostos voláteis em interações microrganismo-planta	20
2.4.1. Promoção do crescimento e nutrição das plantas	21
2.4.2. Tolerância ao estresse abiótico	22
2.4.3. Indução de defesas vegetais	24
2.4.4. Qualidade das safras.....	25
2.5. Fitopatógenos de solo	26
2.5.1. <i>Rhizoctonia solani</i>	27
2.5.2. <i>Fusarium oxysporum</i>	28
3. HIPÓTESES	29
4. OBJETIVOS.....	31
4.1. Objetivos gerais	31
4.2. Objetivos específicos	31
5. MATERIAL E MÉTODOS	33
5.1. Coleta dos solos e obtenção dos isolados	33
5.2. Teste de inibição de crescimento dos patógenos	34
5.3. Teste de inibição de crescimento dos patógenos por COVs.....	35
5.4. Teste de promoção de crescimento de plantas.....	36
5.5. Teste de promoção de crescimento das plantas por COVs	38
5.6. Seleção das fontes de carbono promissoras	38
5.7. Identificação dos isolados componentes da coleção	39
6. RESULTADOS	41

6.1. Coleta dos solos e obtenção dos isolados.....	41
6.2. Teste de inibição de crescimento dos patógenos	43
6.3. Teste de inibição de crescimento dos patógenos por COVs	44
6.4. Teste de promoção de crescimento de plantas	48
6.5. Teste de promoção de crescimento das plantas por COVs.....	49
6.6. Seleção das fontes de carbono promissoras	58
6.7. Identificação dos isolados componentes da coleção	60
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	67
REFERÊNCIAS	71
APÊNDICES	87

RESUMO

Isolamento e caracterização de bactérias produtoras de compostos orgânicos voláteis (COVs) com aplicação agrônômica

Os compostos orgânicos voláteis (COVs) englobam um grande e diversificado grupo de moléculas pequenas e com alta difusibilidade, permitindo sua atuação distante do ponto de produção, o que os tornam ideais para mediar interações entre organismos a curta e longa distância. Os COVs microbianos possuem significativo potencial de aplicação na agricultura, por terem potencial para promoverem o crescimento da planta e induzir resistência a fatores de estresses bióticos e abióticos. Todavia, os estudos nessa área ainda são pouco aprofundados em relação à diversidade biológica e aplicação deste conhecimento. O presente trabalho objetivou avaliar o potencial de COVs emitidos por bactérias rizosféricas isoladas de feijão, trigo e cana-de-açúcar, com foco na busca da produção de compostos atuantes no biocontrole de patógenos (*Rhizoctonia solani* e *Fusarium oxysporum*) e na promoção de crescimento de plantas. A performance dos isolados para os diferentes potenciais explorados se deu em condições de cultivo, por avaliação do crescimento micelial do patógeno (teste de biocontrole) e medição de parte aérea e radículas das plântulas de diferentes espécies, em contato com os COVs produzidos por cada microrganismo da coleção obtida. Fontes de carbono (C) capazes de potencializar a produção dos COVs foram avaliadas. Os isolados mais promissores na produção de COVs com as funções desejadas foram submetidos ao sequenciamento do gene 16S DNAr para a identificação taxonômica. Com relação às melhores condições nutricionais, 2 isolados, FF12 e FC24, apresentaram maior grau de inibição de *F. oxysporum* em meios contendo glicose e manitol como fonte de C, respectivamente. No total foram identificados 16 isolados com potencial de produção de COVs de interesse: 11 com inibição para *R. solani*, 3 para *F. oxysporum*, 1 inibindo ambos e 1 promotor de crescimento de plantas. Todos os isolados ativos mostraram-se pertencentes à família Bacillaceae, com destaque para o gênero *Bacillus*, reforçando a relevância desse grupo em desempenhar funções de interesse agrônômico.

Palavras-chave: Bactérias rizosféricas, Biocontrole, Promoção de crescimento

ABSTRACT

Isolation and characterization of bacteria producing volatile organic compounds (VOCs) of agronomic application

Volatile organic compounds (VOCs) encompass a large and diverse group of small molecules with high diffusibility, allowing their action far from the point of production, which makes them ideal for mediating interactions between organisms at short and long distances. Microbial VOCs have significant potential for application in agriculture, as they have the potential to promote plant growth and induce resistance to biotic and abiotic stress factors. However, studies in this area are still not very deep in relation to biological diversity and the application of this knowledge. The present work aimed to evaluate the potential of VOCs emitted by rhizospheric bacteria isolated from beans, wheat and sugarcane, focusing on the search to produce compounds that act in the biocontrol of pathogens (*Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum*) and in the promotion of growth of plants. The performance of the isolates for the different exploited potentials took place in culture conditions, by evaluating the mycelial growth of the pathogen (biocontrol test) and measuring the aerial part and rootlets of the seedlings of different species, in contact with the VOCs produced by each microorganism of the obtained collection. Carbon (C) sources capable of potentiating the production of VOCs were evaluated. The most promising isolates in producing VOCs with the desired functions were submitted to 16S rDNA gene sequencing for taxonomic identification. Regarding the best nutritional conditions, 2 isolates, FF12 and FC24, showed more inhibition of *F. oxysporum* in media containing glucose and mannitol as a source of C, respectively. In total, 16 isolates with the potential to produce VOCs of interest were identified: 11 inhibiting *R. solani*, 3 inhibiting *F. oxysporum*, 1 inhibiting both, and 1 plant growth promoter. All active isolates belonged to the Bacillaceae family, with emphasis on the genus *Bacillus*, reinforcing the relevance of this group in performing functions of agronomic interest.

Keywords: Rhizospheric bacteria, Biocontrol, Growth promotion

1. INTRODUÇÃO

Os compostos orgânicos voláteis (COVs), emitidos como produtos do metabolismo de diversos microrganismos, são pequenos e possuem capacidade de fácil difusão no ar e na água, o que permite que se dispersem do seu ponto de produção, por meio da atmosfera, poros do solo e líquidos, tornando-se ideais meios de comunicação química na mediação de curtas e longas distâncias na troca de informação intra ou interespecies (Bitas et al., 2013; Schmidt et al., 2015).

Os COVs microbianos possuem representantes em diferentes classes químicas, como álcoois, ácidos, ésteres, cetonas, entre outros, e são produzidos por uma ampla gama de vias biossintéticas, apresentando variações estruturais altamente diversas (Piechulla e Degenhardt, 2014; Weisskopf et al., 2021). As análises desses compostos são realizadas em sua grande maioria por espectrômetro de massas associado à cromatografia gasosa (GC-MS) (Bitas et al., 2013).

Representantes de COVs conhecidos, são a geosmina e o 2-metilisoborneol (MIB), que são terpenos voláteis, sesquiterpeno e monoterpeneo, respectivamente. A eutrofização das águas gera a floração de cianobactérias, produtoras desses compostos que conferem gosto e odor de terra e mofo à água, sendo detectados a concentrações bastante baixas, da ordem de 10 ng.L^{-1} (Sotero-Martins et al., 2021).

Os COVs também desempenham papel benéfico, estudos vêm demonstrando o potencial de aplicação desses compostos na agricultura pelo uso em inspeção fitossanitária e qualidade de safra (Cellini et al., 2021), como indicadores da qualidade do solo (Brown et al., 2021), na promoção do crescimento e saúde da planta, por interrupção de quórum sensing (Helman e Chernin, 2015; Kviatkovski et al., 2015), indução de resistência sistêmica a fatores bióticos (Pieterse et al., 2014; Song et al., 2019; Silva et al., 2021), e fatores abióticos como estresse hídrico e salinidade (Cho et al., 2008; Zhang et al., 2010; Vaishnav et al., 2015; Ledger et al., 2016). Apesar do destaque para compostos bacterianos, essa indução também pode ser obtida por voláteis fúngicos (Bitas et al., 2015; Ditengou et al., 2015; Li et al., 2018).

O antagonismo mediado por voláteis bacterianos contra fungos fitopatogênicos se mostra como ferramenta promissora no controle biológico (Spraker et al., 2014; Rybakova et al., 2017), contribuindo para o desenvolvimento

de métodos de fitossanidade que aliviem o emprego excessivo de pesticidas (Bitas et al., 2013). Apesar dos benefícios pontuados, esse potencial ainda é pouco abordado em pesquisas comparado à outras áreas (Weisskopf et al., 2021).

Desse modo, o projeto objetivou estudar COVs emitidos por bactérias previamente isoladas da rizosfera de plantas de feijão, trigo e cana-de-açúcar, avaliando seu potencial no biocontrole de *Rhizoctonia solani* e *Fusarium oxysporum* (fungos de solo que ocasionam doenças em diversas plantas de importância econômica), além de avaliar a capacidade desses compostos de promover o crescimento de plantas.

As bactérias foram avaliadas *in vitro* e, aquelas que se apresentaram promissoras foram identificadas por meio de sequenciamento do gene 16S DNAr. As mesmas foram cultivadas em meios com acesso a fontes de carbono específicas, a fim de potencializar o crescimento dos isolados e a produção dos COVs funcionais.

As informações obtidas permitiram um maior entendimento no que diz respeito às funções biológicas desses compostos, enfocando seu potencial de aplicação agrícola, contribuindo futuramente para a redução da dependência química da agricultura.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Características dos compostos voláteis microbianos

Os compostos voláteis são moléculas abundantes e bastante diversas (Dixon et al., 2011), sendo produtos do metabolismo de humanos, animais, plantas, bactérias e fungos (Sohrabi et al., 2014). Os voláteis microbianos são compostos que podem ser detectados na fase gasosa da cultura microbiana e, em comparação com outros metabólitos secundários (por exemplo, enzimas, antibióticos e toxinas), são normalmente pequenos (<300 Daltons), com até dois grupos funcionais e capacidade de difusão fácil no ar e na água (Schmidt et al., 2015; Weisskopf et al., 2021), tendo a capacidade de se dispersar a partir do seu local de produção, atravessando a atmosfera, poros do solo e líquidos, tornando-se excelentes comunicadores químicos para a transmissão de informações em curtas e longas distâncias, tanto intra como interespecies (Bitas et al., 2013).

Para a análise desses compostos geralmente utiliza-se um espectrômetro de massa acoplado à cromatografia gasosa (GC-MS), que combina a capacidade de separação da cromatografia e a identificação e caracterização dos compostos pela espectrometria (Bitas et al., 2013) e a análise do *headspace* acima de uma cultura microbiana dá uma boa indicação da presença de compostos na fase gasosa, com moléculas que variam de amônia (massa molecular 17Da) até hidrocarboneto diterpeno (massa molecular 272Da) (Weisskopf et al., 2021) (Figura 1).

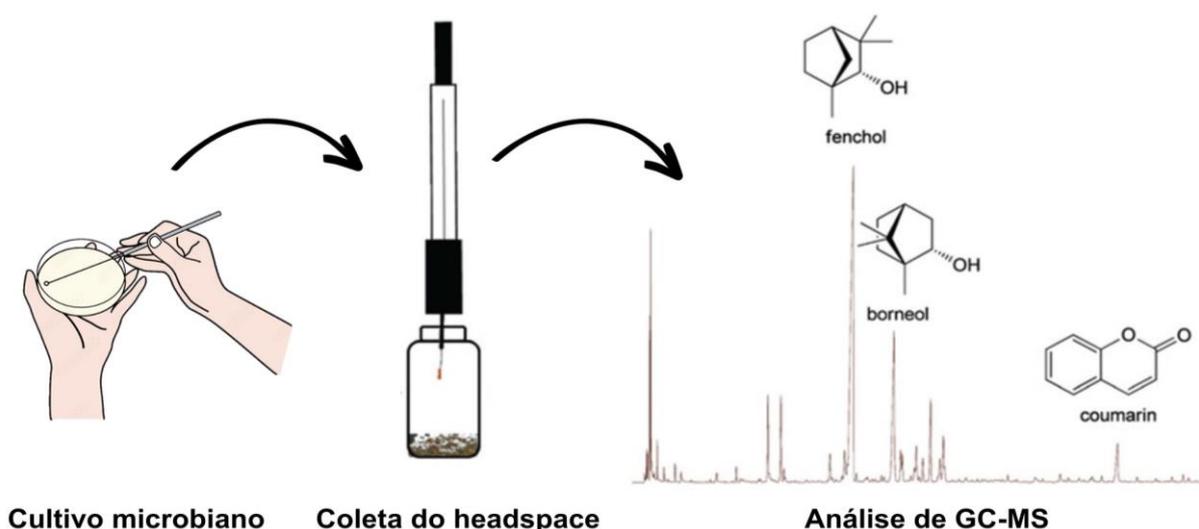


Figura 1. Esquema de análise de compostos orgânicos voláteis (VOCs) de culturas microbianas, pela extração do headspace combinado com cromatografia gasosa-espectrometria de massa (GC/MS).

Fonte: Do próprio autor (2023). Adaptado de Stierlin et al. (2019).

Até o momento, as estruturas químicas de aproximadamente 1000 voláteis foram descritas, originando-se de uma ampla gama de gêneros e espécies de bactérias e fungos produtores de COVs (Effmert et al., 2012; Lemfack et al., 2014). Os voláteis bacterianos são tipicamente dominados por alcenos, álcoois, cetonas, terpenos, benzenoides, pirazinas, ácidos e ésteres, enquanto os voláteis fúngicos são dominados por álcoois, benzenoides, aldeídos, alcenos, ácidos, ésteres e cetonas (Piechulla e Degenhardt, 2014). As principais fontes biossintéticas de voláteis microbianos são a oxidação da glicose, os produtos de fermentação, o metabolismo do enxofre, a via biossintética dos ácidos graxos, a via de terpeno, entre outros. (Peñuelas et al., 2014).

2.2. Fatores que influenciam a produção de compostos voláteis

A produção e função dos COVs podem variar de acordo com o meio de cultivo utilizado (Garbeva et al., 2014b). Por exemplo, diferentes meios de cultura resultaram em diferentes perfis de voláteis produzidos por bactérias como *Lysobacter* sp. e *C. crocatus* (Lazazzara et al., 2017). No entanto, é importante notar que esses meios de cultura diferem do ambiente natural onde os microrganismos vivem. Um estudo sobre cepas de *Burkholderia* spp. cultivadas em meios com limitação nutricional presente ou ausente mostrou mudanças significativas no perfil volátil das cepas, com condições pobres em nutrientes induzindo a emissão de terpenos em alguns isolados avaliados (Blom et al., 2011).

Além da composição do meio de cultivo, fatores ambientais como temperatura, umidade, pH e níveis de oxigênio também podem influenciar a composição dos compostos voláteis produzidos pelos microrganismos. Esses fatores podem afetar diretamente as propriedades físicas, como sua volatilidade, ou indiretamente, influenciando o metabolismo e a taxa de crescimento dos microrganismos. Por exemplo, a presença ou ausência de oxigênio pode ter um impacto significativo na formação dos compostos voláteis bacterianos, dependendo se a respiração aeróbica ou a fermentação são os processos metabólicos preferenciais (Weisskopf et al., 2021).

Outro fator que pode influenciar a emissão de compostos voláteis, são as interações microbianas atuando como sinais químicos entre os microrganismos (Tyc et al., 2015). Estudos recentes mostraram que a bactéria *Serratia plymuthica* responde aos terpenos produzidos pelo fungo *Fusarium culmorum*, aumentando a produção de terpenos em resposta (Schmidt et al., 2017). Essas interações bióticas podem desempenhar um papel importante em ambientes naturais com comunidades microbianas diversas. Recentemente, um estudo investigou o efeito da redução da diversidade microbiana (fungos e bactérias) do solo na emissão volátil e descobriu que a redução da diversidade resultou em emissões voláteis gerais mais baixas e uma diminuição no número de compostos voláteis emitidos. Certos filos bacterianos (por exemplo, Proteobacteria e Bacteroidetes) e todos os filos fúngicos foram positivamente correlacionados com a emissão volátil (Hol et al., 2015; van Aagtmaal et al., 2015; Abis et al., 2020).

2.3. Compostos voláteis em interações microbianas

Diversas interações entre microrganismos são mediadas por compostos orgânicos voláteis, modulando fatores como motilidade, virulência, formação de biofilme, produção de metabólitos secundários, resistência a antibióticos e crescimento (Kim et al., 2013; Létoffé et al., 2014; Chen et al., 2015; Briard et al., 2016), além de induzir mudanças na expressão gênica graças a capacidade de difusão passiva pela parede ou membrana celular, podendo atingir todos os componentes celulares, incluindo nucleóides (Avalos et al., 2018).

Um estudo mostrou que o indol atua como molécula sinalizadora interespecífica, este composto influenciou o padrão de expressão de genes de *Pseudomonas putida*, envolvidos no metabolismo celular, biossíntese da parede celular e defesa contra o estresse (Molina-Santiago et al., 2014). Em outro trabalho, voláteis emitidos por *Serratia plymuthica* levaram à supressão significativa da transcrição dos genes da acil-homoserina lactona sintase de *Pseudomonas chlororaphis* e *Pseudomonas aeruginosa* (Chernin et al., 2011). E a exposição ao composto volátil trimetilamina demonstrou modificar os perfis de resistência a antibióticos de várias bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Létoffé et al., 2014).

Os voláteis também podem causar efeitos nos fungos. O acúmulo da molécula farnesol, um sesquiterpeno, em leveduras patogênicas oportunistas humanas *Candida albicans* e *Candida dubliniensis*, bloqueou a mudança da morfologia de levedura para micélio, o desenvolvimento micelial e a formação de biofilme, características importantes para a virulência de *Candida* spp. (Hornby et al., 2001; Martins et al., 2007).

A produção desses compostos também está presente em endofíticos. Dois fungos endofíticos (FE), *Phyllosticta* sp e *Preussia* sp., isolados das folhas de *Platonia insignis* Mart. Foram avaliados em relação as suas produções de COVs por microextração em fase sólida (HS-SPME-GC-MS), sendo identificados 23 COVs, como: álcoois 26%, hidrocarbonetos alifáticos 26%, ésteres 21,8%, cetonas 17,5% e outras classes 8,7% (Lustosa, 2023).

Um estudo com objetivo de selecionar e identificar fungos endofíticos de *Coffea arábica* produtores de COVs e avaliar o efeito no crescimento de fungos fitopatogênicos observou que os COVs inibiram o crescimento dos patógenos com diferentes eficácias. Os COVs produzidos por *Muscodor coffeanum* (COAD 1842) apresentou efeito fungicida contra *Aspergillus ochraceus* em grãos de café. Seis fungos endofíticos inibiram completamente o crescimento de *Fusarium verticillioides* inoculado em sementes de milho (Monteiro et al., 2017).

Este é apenas um dos estudos que apresentam o potencial de COVs produzidos por endofíticos. A revisão elaborada por Moraes, Ferraz e Chapla (2020) traz diversos exemplos de aplicações biotecnológicas dos mesmos, envolvendo biocombustíveis, micofumigação, aleloquímicos, flavorizantes e quimiotaxonomia.

A sensibilidade aos voláteis pode apresentar grande variação entre as espécies de fungos, por exemplo, estudos relataram que *Fusarium solani* é pouco afetado por voláteis bacterianos, enquanto espécies do gênero *Pythium* são bastante sensíveis (Kai et al., 2009; Effmert et al., 2012; Garbeva et al., 2014a, b). Alta sensibilidade também foi relatada para o patógeno *Phytophthora infestans*, sendo o cianeto de hidrogênio e 1-undeceno os principais compostos responsáveis pela inibição do crescimento (Hunziker et al., 2015). Os voláteis fúngicos também podem ter efeitos inibitórios sobre outros fungos, como os endofíticos *Muscodor albus* e *Oxysporus latemarginatus* que inibiram fortemente o crescimento de *Botrytis cinerea* e *Rhizoctonia solani* (Strobel et al., 2001).

A atividade antibacteriana de COVs é pouco descrita em estudos, com apenas alguns compostos específicos indicados, incluindo lactonas voláteis, como γ -butirolactonas, que exibem atividade antibacteriana contra uma ampla gama de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Schulz et al., 2010). Recentemente, relatou-se que os voláteis emitidos por *Pseudomonas fluorescens* e *Serratia plymuthica* têm efeitos bacterioestáticos contra os patógenos de plantas *Agrobacterium tumefaciens* e *A. vitis* e inibindo o crescimento dos mesmos. O principal volátil emitido por *S. plymuthica* sob as condições testadas foi dissulfeto de dimetila, enquanto *P. fluorescens* emitiu uma mistura de 1-undeceno, metanotiol, acetato de metanotiol e dissulfeto de dimetila (Dandurishvili et al., 2011).

Curiosamente, o mesmo composto volátil pode ter efeitos opostos em diferentes tipos de microrganismos alvos. Por exemplo, compostos voláteis derivados de enxofre (S), como dissulfeto de dimetila e trissulfeto de dimetila podem inibir fortemente o crescimento de *Rhizoctonia solani*, *Fusarium culmorum* e *Pythium ultimum*, enquanto promove o crescimento de algumas bactérias como *Pseudomonas sp.* (Garbeva et al, 2014 a, b).

Embora as interações mediadas por voláteis sejam predominantemente unidirecionais, alguns estudos relataram interações bidirecionais. Por exemplo, um estudo investigou o diálogo mediado por voláteis entre o patógeno fúngico de plantas *Verticillium longisporum* e a bactéria benéfica de controle biológico *Paenibacillus polymyxa*. Ambos os microrganismos responderam aos voláteis do outro, mas de maneiras distintas. Enquanto o crescimento e a atividade metabólica de *P. polymyxa* foram aumentados, o metabolismo e o crescimento de *V. longisporum* foram inibidos, com regulação positiva de genes relacionados ao estresse e à produção de voláteis antimicrobianos (Rybakova et al., 2017). Outro estudo examinou a interação bidirecional mediada por voláteis entre o fungo *Aspergillus flavus* e a bactéria *Ralstonia solanacearum*, ambos patógenos de amendoim. Em resposta aos voláteis fúngicos, *R. solanacearum* reduziu a produção de polissacarídeos extracelulares, enquanto *A. flavus* diminuiu a produção de conídios e aumentou a produção de aflatoxina nas sementes de amendoim (Spraker et al., 2014).

Os voláteis também podem ter papel importante na interação predador-presa, por exemplo, ajudando o predador a detectar sua presa em longas distâncias. Ao

testar interações mediadas por voláteis entre bactérias do solo e protistas, e comparando aqueles com interações tróficas diretas, um estudo demonstrou que voláteis bacterianos específicos podem fornecer aos protistas informações precoces sobre presas adequadas (Schulz-Bohm et al., 2017a). Com base nas diferenças nos perfis de voláteis, os microrganismos, portanto, parecem ser capazes de distinguir entre os microrganismos vizinhos (amigo, inimigo ou presa) e ajustar seu comportamento e desempenho (persistir, invadir, escapar ou defender) (Audrain et al., 2015; Schulz-Bohm et al., 2017b).

2.3.1. Controle biológico

Uma abordagem sustentável para controlar doenças e pragas agrícolas é a utilização de agentes de controle biológico (ACBs) que reduzem a população de patógenos de várias maneiras, como matando-os diretamente, interferindo em seu metabolismo ou competindo por recursos e, nesse cenário, os COVs têm sido estudados como mediadores de efeitos de longo alcance no controle biológico (Cellini et al., 2021). Embora suas concentrações na atmosfera sejam baixas, em matrizes ou locais específicos, os COVs podem atingir concentrações substanciais, permitindo uma ação direta e concentrada. Além disso, os COVs podem induzir defesas sistêmicas nas plantas, preparando-as para ataques de patógenos. Os COVs também podem influenciar interações planta-praga e ser usados no controle de pragas (Heil e Karban, 2010; Bailly e Weiskopf, 2017).

No entanto, o uso de ACBs apresenta desafios, como a eficácia variável devido a fatores ambientais e agrícolas, a diminuição da população de ACBs após sua liberação e a necessidade de coformulantes para prolongar sua vida útil. O desenvolvimento de comunidades bacterianas sintéticas é uma perspectiva promissora para superar essas limitações, proporcionando uma comunidade microbiana mais estável e resistente, com múltiplos mecanismos de ação integrados (Busby et al., 2017; Mazzola e Freilich, 2017). Embora os COVs ainda não tenham sido amplamente aplicados no controle biológico, eles têm potencial para desempenhar um papel importante nessa abordagem.

2.3.2. Toxicidade direta contra patógenos

Os COVs exercem toxicidade direta contra patógenos, sofrendo influência de diversos fatores. Além da natureza química do composto, a taxa de liberação, as condições adequadas para sua produção e a dinâmica da fase gasosa que regula sua volatilidade e estabilidade desempenham papel importante em sua utilidade ecológica (Bailly e Weisskopf, 2017).

Diversas bactérias, como *Actinomyces*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Serratia*, *Burkholderia*, *Xanthomonas* e *Erwinia* spp., têm sido estudadas em relação à toxicidade dos COVs. Alguns dos compostos voláteis que inibem o crescimento de competidores incluem amônia, cianeto e metabólitos contendo enxofre e efeitos sinérgicos também podem ocorrer entre diferentes compostos voláteis (Piechulla et al., 2017).

Fungos e oomicetos são frequentemente sensíveis aos COVs, afetando tanto a alongação de micélios quanto a germinação de esporos (Velázquez-Becerra et al., 2013; Wang et al., 2013; Popova et al., 2014; de Vrieze et al., 2015). Por outro lado, há menos relatos de controle mediado por COVs de patógenos bacterianos, como *Agrobacterium* spp. (Dandurishvili et al., 2011) e *Ralstonia solanacearum* (Raza et al., 2016).

A importância da toxicidade dos COVs para a competição entre espécies em condições reais é debatida devido à dependência das taxas de produção e acumulação desses compostos (Sharifi e Ryu, 2016). No entanto, esse mecanismo de supressão de patógenos tem sido observado em agentes de biocontrole comerciais, levando à adoção de alguns COVs, como benzotiazol e sulfetos de dimetila, como princípios ativos em tratamentos com biocidas exógenos (Fernando et al., 2005; de Vrieze et al., 2015).

A biomimética, que envolve a simulação de processos biológicos para fins práticos, pode ser uma abordagem aconselhável em condições de campo, permitindo um maior controle sobre a natureza química, dosagem e tempo dos tratamentos (Gabriel et al., 2018). No entanto, as condições para tratamentos exógenos com COVs incluem a viabilidade tecnológica da aplicação de gás ao alvo (solo, dossel ou culturas armazenadas) e a baixa toxicidade nas dosagens para o operador e organismos não alvo (Cellini et al., 2021).

2.3.3. Controle de pragas

As emissões voláteis bacterianas foram eficazes na redução da sobrevivência e replicação de pragas, como a *Drosophila suzukii* e alguns nematoides (Popova et al., 2014; Xu et al., 2015). No entanto, o uso de compostos voláteis bacterianos tóxicos é impraticável contra a maioria das espécies animais móveis, devido a restrições de exposição e concentração. Em vez disso, agentes de biocontrole microbianos que liberam compostos tóxicos podem atuar como biopesticidas eficazes para pragas fixas ou do solo, com menor impacto ambiental (Cellini et al., 2021).

Insetos e nematoides utilizam semioquímicos para coordenar funções vitais, como alimentação, acasalamento, oviposição e comportamento de alarme. Bactérias associadas a pragas ou plantas contribuem para a produção de compostos voláteis biologicamente ativos. Algumas pragas são atraídas por esses compostos, enquanto outras são repelidas por eles (Davis et al., 2013). A associação com certas bactérias pode influenciar as preferências de insetos pelos compostos voláteis emitidos por esses micróbios (Farine et al., 2017).

Os compostos voláteis bacterianos também desempenham um papel na atração de parasitoides, seja diretamente atraindo micróbios que indicam uma fonte de alimento ou indiretamente induzindo a liberação de compostos voláteis das plantas (Leroy et al., 2011; D'Alessandro et al., 2014). No caso de nematoides, certos compostos atrativos produzidos por bactérias estimulam a ingestão bacteriana pelos hospedeiros, levando à morte dos vermes (Niu et al., 2010).

Portanto, os compostos voláteis bacterianos têm potencial para serem aplicados no controle de pragas. Tecnologias baseadas nesses compostos, como atrativos, repelentes e feromônios sintéticos, têm sido usadas em estratégias de controle, como atrair-e-matar, empurrar-puxar e confusão sexual. No entanto, as informações sobre semioquímicos para essas tecnologias são atualmente limitadas a um número relativamente pequeno de espécies de insetos, principalmente Lepidoptera, Diptera e Coleoptera (Cellini et al., 2021).

2.3.4. Disrupção do quorum sensing

O quorum sensing (QS) é um sistema de comunicação bacteriano que regula a expressão de fenótipos sociais em resposta à densidade populacional, isso

envolve a produção de compostos sinalizadores e a expressão de receptores específicos para esses sinais (Cellini et al., 2021). O QS influencia a motilidade bacteriana, formação de biofilmes, produção de metabólitos secundários e fatores de virulência, melhorando a adaptação bacteriana em um ambiente competitivo (Hassani et al., 2018). Algumas bactérias patogênicas dependem da estimulação por outros microrganismos para expressar plenamente sua virulência (Venturi et al., 2010).

Um exemplo estudado de sinal de QS são as N-acil-homoserina lactonas (AHLs), usadas por várias bactérias Gram-negativas, incluindo patógenos de plantas. Outros compostos, como derivados de peptídeos, aminoácidos e ácidos graxos, também mediam o QS. A atividade de QS foi estudada principalmente em soluções aquosas, mas sua natureza semivolátil sugere uma possível ação de sinalização no ar (Cellini et al., 2021).

A interrupção do QS pode ser uma estratégia para reduzir a população de patógenos e controlar doenças em plantas (Helman e Chernin, 2015). Vários métodos foram desenvolvidos que se enquadram em duas categorias: inibidores de QS e supressores de quórum (quórum quenching - QQs) (Beitelshees et al., 2018). O primeiro método, a inibição do QS, visa bloquear o QS, introduzindo pequenas moléculas análogas que superam as moléculas sinalizadoras (Brackman, Coenye, 2015). Usando esta estratégia, é possível alterar fenótipos celulares expressos em biofilmes maduros. Por exemplo, a via de sinalização do gene regulador acessório (GRA), que é capaz de inibir importantes proteínas da matriz do biofilme (proteínas de ligação à bronectina (FnBPs) e proteína A) produzidas por *Staphylococcus aureus* (Solano, Echeverz e Lasa, 2014). Por outro lado, os inibidores de quorum desligam o QS por meio de inibidores enzimáticos, principalmente as lactonases, devido à sua capacidade de degradar moléculas de AHL (Dong et al., 2002; Lin et al., 2003). Uma dessas enzimas foi relatada como capaz de diminuir a virulência de isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*, interrompendo o QS e reduzindo a formação de biofilme (Guendouze et al., 2017) (Figura 2).



Figura 2. Métodos para bloquear o mecanismo de QS. O QS dependente de AHL dentro dos biofilmes (esquerda) pode ser bloqueado usando a inibição competitiva do QS que supera a AHL (meio) ou enzimas de extinção de quorum que inativam os sinais AHL (direita). Fonte: Do próprio autor (2023). Adaptado de Beitelshes et al. (2018).

Alguns COVs, como o dissulfeto de dimetila (DMDS) e cetonas lineares, foram demonstrados como inibidores do QS em certas bactérias (Chernin et al., 2011; Plyuta et al., 2014; Kviatkovski et al., 2015).

2.4. Compostos voláteis em interações microrganismo-planta

Conforme já descrito, por suas propriedades gasosas, os COVs atuam como moléculas de sinalização e podem levar à ativação de uma série de sinais que regulam vários processos fisiológicos que afetam a saúde e o crescimento das plantas (Effmert et al., 2012; Kanchiswamy et al., 2015b).

Além de estimular o crescimento das plantas por sinalização hormonal e absorção de água e nutrientes, os voláteis microbianos mostraram aumentar a tolerância das plantas a estresses bióticos e abióticos. A exposição das plantas aos voláteis microbianos também pode desencadear a indução de resistência sistêmica, ou seja, uma capacidade de defesa aprimorada de toda a planta após a detecção local de um patógeno (Pieterse et al., 2014). Com relação ao estresse abiótico, diversas espécies demonstraram capacidade de amenizar os efeitos da seca e/ou

estresse salino, pela exposição da planta aos seus voláteis bacterianos (Cho et al., 2008; Vaishnav et al., 2015; Ledger et al., 2016; Song et al., 2019) e fúngicos (Ditengou et al., 2015; Zhang et al., 2010). Além disso, interações de COVs bacterianos com as culturas, podem influenciar a qualidade das safras (Zhou et al., 2016). Esses pontos serão discutidos de forma mais detalhada a seguir.

2.4.1. Promoção do crescimento e nutrição das plantas

A promoção do crescimento por COVs foi demonstrada em várias espécies cultivadas, incluindo alfafa, cevada, manjeriço, brócolis, alface, álamo, soja, tabaco e tomate (Piechulla et al., 2017; Fincheira e Quiroz, 2018). Esses efeitos estão relacionados à modulação de hormônios vegetais, como citocininas (Ryu et al., 2003), auxinas, brassinosteroides (Bhattacharyya et al., 2015), giberelinas, etileno (Tahir et al., 2017) e estrigolactonas (Jiang et al., 2019).

Um estudo pioneiro descobriu que a exposição da planta *Arabidopsis thaliana* aos voláteis emitidos por diferentes linhagens de *Bacillus* resultou em um aumento significativo do crescimento da planta (Ryu et al., 2003). Isso levou a relatos subsequentes de modulação do crescimento de *A. thaliana* e outras espécies vegetais por meio de misturas voláteis de bactérias diversas (Blom et al., 2011; Sanchez-Lopez et al., 2016). Os efeitos dos voláteis bacterianos variaram de um aumento drástico no crescimento até a morte das plantas, dependendo do meio de cultivo. Os voláteis inorgânicos, como amônia e cianeto de hidrogênio, foram associados principalmente à morte das plantas, enquanto o 2-feniletanol, um volátil orgânico comum, reduziu o crescimento de *A. thaliana* e *Medicago sativa* em altas concentrações (Velazquez-Becerra et al., 2011).

A promoção do crescimento das plantas expostas às misturas microbianas é parcialmente devido ao dióxido de carbono gerado pela respiração bacteriana (Kai e Piechulla, 2009). Além disso, compostos voláteis orgânicos, como 2,3-butanodiol, indol e dimetildissulfeto, quando aplicados isoladamente, promovem o crescimento das plantas (Meldau et al., 2013; Groenhagen et al., 2013; Bailly et al., 2014). Isso sugere que várias moléculas orgânicas contribuem significativamente para o estímulo geral do crescimento das plantas pelos voláteis microbianos.

Os mecanismos subjacentes à promoção do crescimento pelos voláteis microbianos ainda não são completamente compreendidos, mas estudos indicam

que são diversos (Weisskopf et al., 2021). Os voláteis bacterianos podem manipular os hormônios vegetais, como a auxina, para aumentar a biomassa das raízes e partes aéreas das plantas (Zhang et al., 2003; Bailly et al., 2014).

Embora os efeitos hormonais possam moldar a alocação de recursos dentro da planta e sua progressão fenológica (Sánchez-López et al., 2016), a promoção do crescimento das plantas e o aumento da biomassa devem estar acompanhados de um aumento correspondente na nutrição. Por exemplo, a estimulação do metabolismo e/ou sinalização de auxina gera alterações na arquitetura das raízes das plantas, o que contribui para a absorção de água e nutrientes (Bailly et al., 2014). O etileno participa da ativação de sistemas de captação de minerais (Iqbal et al., 2013). Os COVs estão envolvidos na contrariedade da inibição da fotossíntese mediada por carboidratos e ácido abscísico (ABA), permitindo taxas mais altas de fixação de CO₂ (Zhang et al., 2008a). estimulando a absorção de ferro (Wang et al., 2017; Hernández-Calderón et al., 2018) e enxofre (Gabriel et al., 2018).

A maioria dos estudos se concentra em bactérias, todavia, os fungos também emitem compostos voláteis que afetam o crescimento das plantas. Alguns desses voláteis estimulam a formação de raízes laterais, enquanto outros induzem resistência sistêmica contra fungos necrotróficos (Zhang et al., 2010; Ditengou et al., 2015). Surpreendentemente, as plantas não parecem distinguir entre voláteis emitidos por fungos benéficos e patogênicos, pois ambos geralmente promovem o crescimento e a floração das plantas, isso pode ser devido à sobreposição dos perfis voláteis ou à presença de compostos compartilhados entre microrganismos e plantas (Moisan et al., 2019). A estimulação do crescimento e a supressão das respostas de defesa das plantas são de interesse tanto para microrganismos benéficos quanto patogênicos (Blom et al., 2011; Wenke et al., 2012).

2.4.2. Tolerância ao estresse abiótico

A promoção do crescimento das plantas por microrganismos pode resultar do aumento da tolerância a estresses ambientais. Embora os mecanismos muitas vezes não estejam totalmente elucidados (Garbeva e Weisskopf, 2020), tais efeitos geralmente são induzidos pela liberação de hormônios voláteis pelos microrganismos (notadamente etileno, metil-jasmonato e metil-salicilato), ou

envolvem a cascata de sinalização dos hormônios vegetais (Kanchiswamy et al., 2015a).

O conhecimento atual sobre a tolerância induzida por COVs refere-se principalmente ao estresse osmótico, salino e/ou hídrico. Estresses abióticos, como deficiência hídrica, estresse osmótico e toxicidade do sal, estimulam a produção de óxido nítrico (NO) e etileno nas plantas, os quais têm efeitos fisiológicos variados (Cellini et al., 2021). As bactérias associadas as plantas podem influenciar indiretamente a emissão desses compostos ou produzi-los diretamente, por exemplo, o 2,3-butanodiol, produzido pelas bactérias *Bacillus subtilis* GB03 e *Pseudomonas chlororaphis* O6, aumenta a tolerância da planta *Arabidopsis thaliana* à deficiência hídrica e ao estresse osmótico e diversas vias de sinalização, como ABA, ácido salicílico, etileno e ácido jasmônico, estão envolvidas nesse processo. Além disso, *B. subtilis* GB03 estimula a biossíntese de osmoprotetores, melhorando o crescimento da planta sob condições de restrição hídrica e estresse osmótico (Cho et al., 2008; Zhang et al., 2010).

A interação com bactérias que produzem COVs também pode melhorar a tolerância das plantas ao estresse salino. Por exemplo, *B. subtilis* GB03 e seu composto volátil acetoina aumentam a tolerância da hortelã-pimenta ao estresse salino, estimulando a biossíntese de ácido salicílico e reduzindo o ABA (Cappellari e Banchio, 2020). Outro mecanismo envolve a regulação tecido-específica dos transportadores de íons HKT, que promovem a recirculação interna de Na⁺ nas partes aéreas da planta (Zhang et al., 2008b). Além disso, o NO produzido pelas plantas sob estresse salino está relacionado ao aumento da colonização da rizosfera por certas cepas de *Pseudomonas*, estimulando as defesas antioxidantes e a expressão de transportadores de íons na soja (Vaishnav et al., 2016). Outros COVs indutores de tolerância ao sal, como 2-undecanona, 1-heptanol e 3-metil-butanol, foram identificados em *Parabulkoidea phytofirmans* (Ledger et al., 2016).

O estresse de seca e altas temperaturas promove a emissão de isopreno pelas plantas, que desempenha um papel na proteção contra espécies reativas de oxigênio e nitrogênio formadas durante o estresse (Lantz et al., 2019). Algumas bactérias, como exemplares do gênero *Bacillus*, produzem isopreno e sua emissão pode ser aumentada em condições de estresse. Isso sugere que as bactérias associadas as plantas podem mediar as respostas das plantas a esses estresses

(Xue e Ahring, 2011). Além disso, as bactérias do solo e da filosfera podem utilizar o isopreno derivado da planta como fonte de carbono, afetando diretamente o metabolismo do isopreno no hospedeiro (McGenity et al., 2018).

Essa área de pesquisa pode contribuir significativamente para a fitorremediação e para a adaptação das culturas a estresses relacionados as mudanças climáticas (Sangiorgio et al., 2020). Por exemplo, a recuperação de solos marginais pode ser melhorada por meio do estímulo a ramificação radicular, exercido por algumas bactérias simbióticas para aumentar a liberação de carbono orgânico na rizosfera. Entre os COVs implicados nessa interação planta-microrganismo, o 1-butanol e o sinal de QS butirolactona podem desempenhar um papel importante (Gutiérrez-Luna et al., 2010).

2.4.3. Indução de defesas vegetais

A aplicação de COVs para induzir defesas vegetais tem recebido atenção, especialmente no contexto da resistência sistêmica induzida (RSI) e no combate às doenças virais (Kong et al., 2018). A RSI ocorre por meio de interações simbióticas entre a planta hospedeira e bactérias que promovem tanto a defesa quanto o crescimento das plantas. No entanto, os mecanismos de percepção e decodificação dos sinais induzidos pelos COVs ainda não são totalmente compreendidos (Garbeva e Weiskopf, 2020).

O 2,3-butanodiol é um exemplo bem estudado de COV indutor de defesa, mas foi observado tanto em bactérias que induzem defesa (*Bacillus* e *Serratia* spp., e *Pseudomonas chlororaphis*) quanto em bactérias patogênicas (*Erwinia*, *Pectobacterium* e *Dickeya* spp.) (Ryu et al., 2004; Han et al., 2006; Marquez-Villavicencio et al., 2011; Spinelli et al., 2012). Sua ação e de outros compostos relacionados estão associadas a diferentes vias de sinalização, como o ácido salicílico, jasmonato e etileno, que ativam respostas defensivas específicas nas plantas (Ryu et al., 2004; Rudrappa et al., 2010; Kong et al., 2018). Além do 2,3-butanodiol, outras moléculas também foram identificadas como indutoras de defesa nas plantas (Piechulla et al., 2017; Cofer et al., 2018) e em alguns casos, como o DMDS e benzotiazol, efeitos diretos de indução de defesa antimicrobiana e vegetal podem coexistir (Huang et al., 2012).

Os COVs podem atuar de forma sinérgica em misturas complexas, proporcionando proteção contra uma ampla gama de patógenos ao modular simultaneamente várias vias de sinalização e essas misturas de COVs têm a vantagem de estimular a defesa sem causar grandes mudanças fisiológicas nas plantas, geralmente a RSI é ativada apenas após o desafio do patógeno e não está associada à alterações no fenótipo ou no rendimento das culturas (Heil e Karban, 2010; Farag et al., 2013; Garbeva e Weiskopf, 2020).

2.4.4. Qualidade das safras

A interação bacteriana com as culturas tem um impacto significativo na qualidade das culturas. Por exemplo, a exposição de plantas aromáticas como hortelã-pimenta e manjeriço, ou plantas medicinais como *Atractylodes lancea*, aos COVs emitidos por bactérias *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Azospirillum* mostrou aumentar o teor de óleos essenciais (Banchio et al., 2009; Santoro, et al., 2011; Zhou, et al. 2016). A presença de certas espécies bacterianas pode contribuir para a diversidade e intensidade dos compostos orgânicos voláteis (COVs) em plantas, afetando seus perfis aromáticos. No armazenamento pós-colheita, as tecnologias baseadas em COVs biogênicos e bactérias que emitem COVs oferecem soluções para o controle de doenças, com menos preocupações em comparação com fungicidas sintéticos.

Além disso, certas cepas de *Bacillus* e *Streptomyces* foram identificadas por suas propriedades antifúngicas e testadas em diversas frutas, demonstrando eficácia contra uma ampla gama de patógenos (Arrebola et al., 2010; Li et al., 2012; Gotor-Vila et al., 2017; Boukaew et al., 2018; Liu et al., 2018). Os compostos produzidos pelas cepas bacterianas (como cedrol, 2-pentilfuran e acetofenona) também são encontrados nos aromas de frutas, tornando seu uso no controle de doenças pós-colheita mais aceitável. No caso das videiras, a microflora presente nas bagas, incluindo *Paenibacillus* spp., produz compostos voláteis que podem melhorar a qualidade do vinho (Verginer et al., 2010). Pesquisas futuras devem explorar essa contribuição da microflora para as propriedades aromáticas das frutas e produtos derivados.

A Figura 3 traz uma visão geral dos tópicos citados, incluindo as funções microbianas, os mecanismos de ação envolvidos e os efeitos gerados nas plantas. O

exemplo demonstrado é específico para bactérias, mas, como já abordado, os COVs fúngicos também apresentam esse potencial.

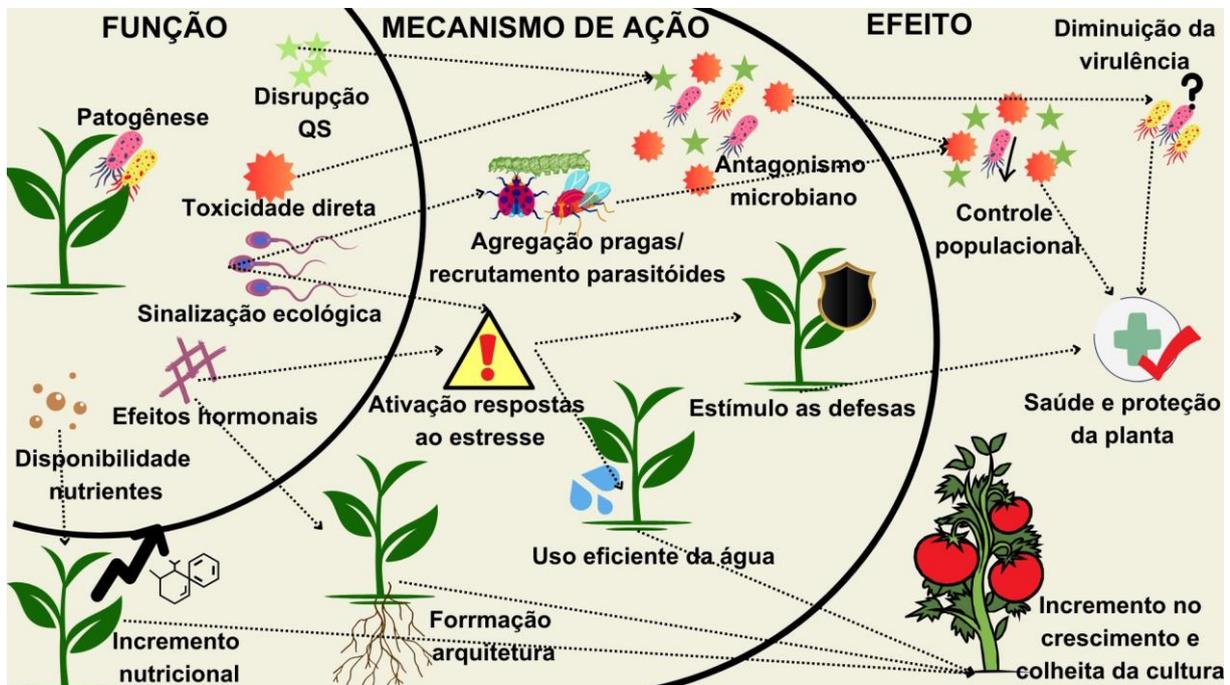


Figura 2. Esquema de funções biológicas mediadas por compostos orgânicos voláteis (COVs) de bactérias associadas a plantas. Fonte: Do próprio autor (2023). Adaptado de Cellini et al. (2021).

2.5. Fitopatógenos de solo

As doenças radiculares transmitidas pelo solo são causadas por microrganismos presentes nesse ambiente, como fungos, oomicetos e vírus transmitidos por esses microrganismos. Esses patógenos podem viver no solo independentemente da presença de seus hospedeiros, competindo com a microflora e dependendo de fatores biológicos e ambientais para sua disseminação. Essa variabilidade epidemiológica e as incertezas quanto à gravidade da doença em cada safra causam perdas significativas de rendimento nas culturas afetadas (Anees, Edel-Hermann e Steinberg; 2010). O presente trabalho trará enfoque para duas espécies de fungos de grande importância para culturas agrícolas, *Rhizoctonia solani* e *Fusarium oxysporum* que terão suas características detalhadas nos tópicos seguintes.

2.5.1. *Rhizoctonia solani*

O fungo *Rhizoctonia solani* é uma forma imperfeita, assexual (anamorfo) de *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk (teleomorfo), de acordo com filogeneticistas (Garcia et al., 2006), o nome *T. cucumeris* deve agora ser usado para designar *R. solani*, mas, por uma questão de clareza, os termos *R. solani* serão mantidos neste texto. Este fungo fitopatogênico é um saprófito de solo universal e parasita facultativo, crescendo em matéria orgânica do solo ou restos de plantas (Papavizas, 1970; Ogoshi, 1996). Possui um amplo espectro de hospedeiros e causa danos significativos em culturas agrícolas incluindo forragem, açúcar, oleaginosas, culturas ornamentais (Bolkan e Ribeiro, 1985; MacNish, 1996; Wrather et al., 1997; Demirci, 1998; Ryder et al., 1998; Pascual e Hyakumachi, 2000; Hietala et al., 2005)

Embora *R. solani* não produza esporos assexuados para dispersão de longa distância, o fungo sobrevive em condições desfavoráveis formando escleródios contendo micélio (Ogoshi, 1987; Sumner, 1996). A densidade de inóculo do fungo varia e geralmente não está relacionada à incidência da doença (Kinsbursky e Weinhold, 1988). A maior parte do inóculo está presente no solo superficial (MacNish e Dodman, 1987; Paula et al., 2008).

As doenças causadas por *R. solani* manifestam-se em manchas que mudam de configuração, podem variar em tamanho e se expandem durante a estação de crescimento, dependendo da densidade do inóculo e da cultura hospedeira. A expressão da doença varia de acordo com a maturidade da planta, tornando difícil estimar o tamanho real das manchas. Muitas vezes, várias pequenas manchas se fundem, resultando em configurações variáveis (Hyakumachi e Ui, 1982; MacNish et al., 1993; MacNish, 1996; Schneider et al., 2001).

A transmissão à longa distância ocorre entre as estações e é atribuída ao movimento da água e à dispersão mecânica do inóculo durante a colheita e os procedimentos de cultivo (MacNish, 1996; Truscott e Gilligan, 2001). A produção de manchas com configurações variáveis está relacionada à dispersão restrita do inóculo. As manchas surgem devido à presença de inóculo primário retido no campo de culturas anteriores. Durante a fase parasitária, o inóculo primário infesta a planta hospedeira e o inóculo secundário pode se propagar localmente por autoinfecção ou transmitir-se em curta distância por aloinfecção entre plantas contíguas (Anees, Edel-Hermann e Steinberg; 2010). O controle da doença envolve principalmente

medidas como desinfecção de equipamentos agrícolas e ajuste do tempo de semeadura, além da rotação de culturas, porém, não isoladamente, uma vez que o patógeno possui amplo espectro de hospedeiros e pode escapar mesmo em rotações longas (Balali et al., 1995).

2.5.2. *Fusarium oxysporum*

O *Fusarium oxysporum* é um fungo ascomiceto patogênico transmitido pelo solo que afeta várias plantas em todo o mundo, causando a doença conhecida como murcha de *Fusarium* (Flood, 2006). Existem mais de 100 espécies específicas de hospedeiros desse fungo que são amplamente distribuídas globalmente (Gordon, 2017). O fungo se reproduz assexualmente através da produção de esporos, que podem permanecer dormentes no solo por longos períodos, causando danos significativos em várias culturas, como bananas, tomates, óleo de palma, entre outras (Altinok, 2013).

A disseminação do patógeno ocorre por meio de diversos mecanismos, como materiais de plantio infectados, sementes, ferramentas agrícolas, ar e água (Gamliel-Atinsky et al., 2009). A infecção do fungo ocorre por meio dos esporos, que infectam as raízes das plantas e se espalham pelos tecidos vasculares, apresentando sintomas como crescimento retardado, clorose foliar e alterações nos tecidos vasculares, levando à murcha e morte gradual das plantas, sendo as perdas agrícolas significativas em várias regiões (Chung, 2012).

Alguns métodos de controle da doença incluem práticas culturais, como a remoção completa e destruição de plantas infectadas (Renard e Quillec, 1983) e a rotação com uma cultura não hospedeira, além da solarização, uso de sementes certificadas e livres de patógenos e ferramentas agrícolas limpas e esterilizadas (Joshi, 2018). O uso de fungicidas para fumigar os solos é outra forma, mas está enfrentando desafios devido à existência de espécies assintomáticas. A maneira mais eficaz de lidar com essa ameaça é usar variedades resistentes (Corley e Tinker, 2003).

3. HIPÓTESES

- Bactérias isoladas de solos rizosféricos de culturas agrícolas produzem compostos orgânicos voláteis que colaboram para o controle de fungos patogênicos de solo e promoção de crescimento de plantas;
- A adição de fontes de carbono específicas no meio de cultura contribui para melhores respostas de biocontrole e promoção de crescimento das plantas.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivos gerais

Avaliar o potencial de compostos orgânicos voláteis emitidos por bactérias rizosféricas isoladas de culturas agrícolas, na promoção de crescimento de plantas e no biocontrole de fungos patogênicos de solo.

4.2. Objetivos específicos

- Avaliar *in vitro* o potencial dos COVs emitidos pelas bactérias rizosféricas isoladas, para biocontrole e promoção de crescimento de plantas;
- Selecionar fontes de carbono que potencializam a produção dos COVs com ação benéfica;
- Caracterizar os isolados selecionados com potencial de produção de COVs de interesse.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Coleta dos solos e obtenção dos isolados

Plantas de feijão, trigo e cana-de-açúcar foram selecionadas para a realização da coleta de solo rizosférico. Por pertencerem a famílias diferentes, possuem estrutura e morfologia distintas, o que inclui seus sistemas radiculares, oferecendo uma fonte de seleção diferenciada. As plantas de feijão estavam sob sistema de plantio direto e as de trigo e cana-de-açúcar, em sistemas convencionais.

A coleta ocorreu durante o mês de agosto de 2021, em áreas agrícolas experimentais da ESALQ/USP, em regiões distintas e as amostras de solo local foram encaminhadas para análise das características químicas e físicas particulares de cada um deles. A amostragem para a posterior etapa de obtenção dos isolados se deu pela remoção das plantas e cuidadosa separação da porção do solo aderida ao sistema radicular, conforme exemplificado na Figura 4. Foram retiradas três plantas de cada espécie e, para cada uma, separaram-se três amostras de solo, totalizando nove amostras de solo rizosférico por cultura. O fatorial estudado por meio da combinação dos diferentes solos e espécies vegetais gera um cenário adequado para se obter a coleção microbiana com a funcionalidade desejada e representada por ampla biodiversidade.



Figura 4. Remoção e armazenamento do solo aderido ao sistema radicular de um exemplar de planta de feijão coletado em campo. Fonte: Do próprio autor (2022).

Para a obtenção da coleção de isolados foram pesadas 10 gramas de cada amostra de solo e diluídas em 90 mL de solução salina de NaCl 0,85%. A suspensão foi mantida sob agitação contínua a 150 rpm, e temperatura de 28°C, durante 30 minutos, a fim de que as bactérias migrassem da rizosfera para a solução salina. Após isso, prosseguiu-se com a técnica de diluição seriada com fator de diluição 1:10 (Romeiro, 2007). Alíquotas de diversas diluições (10^{-1} até 10^{-8}) foram adicionadas a placas de cultivo com dois meios de cultura, o caldo de triptona de soja – TSA (15g/L de triptona, 5g/L de digestão papaica de soja, 5g/L de cloreto de sódio, 15g/L de ágar) e o Ágar nutriente – NA (5g/L de peptona, 3g/L de extrato de carne, 5g/L de cloreto de sódio, 15g/L de ágar), os diferentes meios promovem maior possibilidade de seleção de microrganismos distintos. As placas foram incubadas a 28 °C até o crescimento das colônias bacterianas.

Após esse período, as colônias que apresentaram coloração e morfologia distintas, foram purificadas por técnica de estriamento, para obter-se uma coleção microbiana representada por ampla biodiversidade (uma vez que a classe de COVs produzidos varia de acordo com a espécie do microrganismo).

5.2. Teste de inibição de crescimento dos patógenos

Com os isolados obtidos, prosseguiu-se para o teste de inibição do crescimento micelial *in vitro* dos patógenos, conforme a metodologia do pareamento de culturas não-quantitativo (Filippi et al., 2011). Com o auxílio de alças descartáveis, os isolados foram inoculados em placas de Petri de 150x20mm, contendo o meio de cultura BDA (batata dextrose ágar), cada placa contou com quatro isolados sendo testados simultaneamente. O inóculo foi feito nas laterais das placas e as mesmas foram incubadas a 28 °C para o crescimento microbiano. Posteriormente, adicionou-se ao centro da placa um disco de micélio do patógeno, conforme Figura 5, e as placas foram vedadas e incubadas a 25°C e fotoperíodo de 12h. Foi feita a avaliação diária do crescimento e, como controle, foram utilizadas placas de Petri com BDA contendo apenas o disco de micélio. Foi feita a avaliação diária da inibição através do crescimento vegetativo do patógeno. A última avaliação ocorreu quando o tratamento controle atingiu a borda da placa de Petri. O código dos isolados foi indicado pela letra inicial do fungo patogênico testado

(R:*Rhizoctonia solani*, F:*Fusarium oxysporum*), a letra inicial da cultura de origem (feijão, cana-de-açúcar e trigo) e o número correspondente de cada um.



Figura 5. Preparo dos discos de micélio de *Rhizoctonia solani* e adição ao centro das placas de BDA contendo os isolados já crescidos. Fonte: Do próprio autor (2022).

Para aqueles isolados que apresentaram resposta positiva, o presente teste foi refeito, como forma de garantir que os mesmos apresentavam o potencial de biocontrole avaliado.

5.3. Teste de inibição de crescimento dos patógenos por COVs

Foi realizado o teste de inibição do crescimento micelial *in vitro* do patógeno, conforme a metodologia do pareamento de culturas não-quantitativo (Filippi et al. 2011), todavia, utilizou-se placas de Petri bipartidas, conforme descrito por Raza et al. (2016), desta forma, garantiu-se que os microrganismos crescessem na mesma atmosfera, mas sem contato direto entre eles. Para isso, os isolados foram repicados no centro de um dos lados de uma placa de Petri bipartida contendo o meio de cultivo TSA. A outra metade continha o meio Batata Dextrose Ágar (BDA) e recebeu um disco de micélio do patógeno.

As placas foram vedadas e incubadas a 25°C e fotoperíodo de 12h. Como controle, foram utilizadas placas de Petri bipartidas contendo apenas o disco de micélio. Realizou-se a avaliação da inibição através da mensuração diária do crescimento vegetativo do patógeno, nos sentidos vertical e horizontal da placa

(Apêndice A). O procedimento foi realizado em triplicata para cada isolado e a última avaliação foi feita quando o tratamento controle atingiu a borda da placa de Petri.

5.4. Teste de promoção de crescimento de plantas

Para a avaliação do potencial de promoção do crescimento de plantas, optou-se pela cultura do milho no desenvolvimento da experimentação, por sua relativa facilidade de cultivo e ciclo de curta duração, com rápido crescimento inicial.

O experimento foi realizado com bandejas contendo células de 55 cm de comprimento, 28 cm de largura e 8 cm de profundidade, as quais foram preenchidas com uma mistura de solo, areia e vermiculita. As sementes de milho foram desinfestadas superficialmente (álcool 70% - 3 minutos, hipoclorito de sódio 2% - 7 minutos, álcool 70% - 1 minuto, seguido de três lavagens com água destilada esterilizada) e em cada célula adicionou-se duas sementes (Figura 6A). Todos os isolados obtidos na etapa de seleção foram crescidos em meio TSB, e, após isso, adicionou-se na 1mL do inóculo de cada isolado, ajustado em espectrofotômetro para concentração de $1,0 \times 10^8$ UFC/ml, na região próxima a semente (Figura 6B).

Realizou-se o experimento com 3 repetições para cada isolado. Nas sementes controle, foram adicionadas apenas o meio de cultura TSB, sem inóculo. Após 5 dias da semeadura, foi realizado o desbaste, mantendo apenas uma planta por célula (Figura 6C). As bandejas foram mantidas em casa de vegetação com temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$, sob regime de irrigação diária.

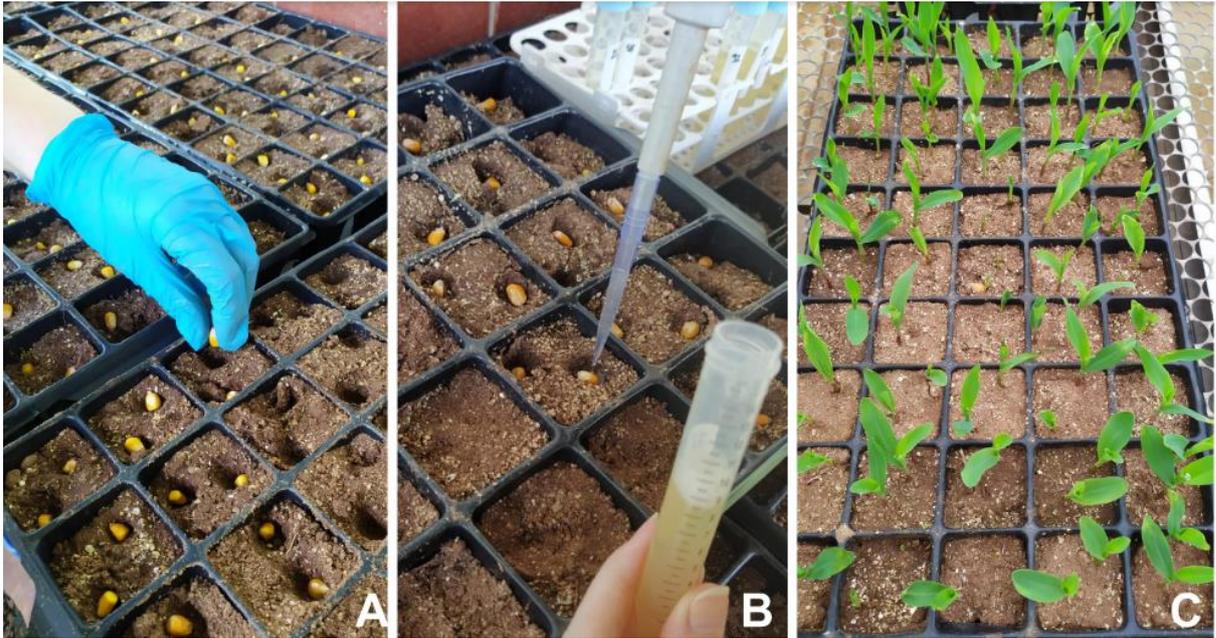


Figura 6. A) Semeadura do milho, com duas sementes por células. **B)** Adição do inoculo na região próxima a semente. **C)** Plântulas com 5 DAS (dias após sementeira), antes da realização do desbaste. Fonte: Do próprio autor (2022).

Com 10 DAS (dias após sementeira), foi realizada a primeira avaliação de altura das plantas, medindo-se da base da planta rente ao solo até a folha de inserção mais alta cuja aurícula seja visível. Deu-se prosseguimento ao teste, com uma segunda medição das alturas das plantas com 18 DAS, seguida de desmontagem e avaliação da massa da matéria seca da parte aérea e raiz.

A partir dos dados obtidos, com auxílio do software RStudio, foi realizada a análise de variância, considerando-se o valor de p significativo quando menor do que 0,05, seguido de comparação de médias por meio do teste de Tukey, não sendo encontradas diferenças significativas entre os isolados e o controle. Como esse teste considera cada isolado como um tratamento e realiza uma comparação de todos entre si, ocorre uma sobreposição dos dados, não se mostrando um método de grande eficiência para a detecção de diferenças significativas neste caso específico.

Sendo assim, optou-se pelo teste de Dunnett a 95%, a fim de comparar cada tratamento com o controle de maneira individual. Esse tipo de teste foi escolhido pois o intuito deste ensaio foi avaliar a capacidade dos microrganismos de potencializar o crescimento das plantas em comparação com os casos de ausência destes microrganismos, a comparação entre os isolados não se fez necessária.

O código gerado para facilitar a organização e interpretação dos dados inclui a sigla PC: promoção de crescimento, a letra inicial da cultura de origem (C: cana-de-açúcar, F: feijão, T: trigo) e o número correspondente do isolado.

5.5. Teste de promoção de crescimento das plantas por COVs

Os isolados foram repicados no centro de um dos lados de uma placa de Petri bipartida contendo meio TSA. A outra metade da placa continha papel filtro dobrado pela metade (tipo qualitativo com diâmetro de 9cm e gramatura de 80g/m²), no qual adicionou-se três sementes de milho desinfestadas superficialmente (álcool 70% - 3 minutos, hipoclorito de sódio 2% - 7 minutos, álcool 70% - 1 minuto, seguido de três lavagens com água destilada esterilizada) e pré-germinadas. A montagem das placas foi feita em triplicata, somando, no total, 9 sementes de milho para cada um dos isolados. O controle constou de placas com meio TSA em um dos lados, sem a inoculação bacteriana e, na outra divisória, as sementes de milho no papel filtro. Após isso, adicionou-se 2ml de água destilada autoclavada ao papel filtro com as sementes. As placas foram mantidas a temperatura ambiente por 7 dias e os comprimentos das raízes e dos coleótilos foram avaliados (Bernardes et al., 2010) (Apêndice B).

O mesmo teste foi realizado também para trigo e alface, todavia, utilizou-se 10 sementes dessas culturas por placa, em duplicata, totalizando 20 leituras finais para cada isolado, além disso, pelo tamanho reduzido das sementes, adicionou-se apenas 1 mL de água autoclavada ao papel filtro, e as avaliações foram realizadas 14 dias após a montagem (Apêndices C e D). Especificamente para o trigo, foi avaliado um parâmetro adicional, de número de ramificações. Prosseguiu-se do mesmo modo com o teste de Dunnett a 95%.

5.6. Seleção das fontes de carbono promissoras

Com a obtenção dos isolados com potencial de biocontrole e promoção de crescimento por COVs prosseguiu-se para o teste com o objetivo de analisar se o acesso a fontes de carbono específicas potencializa o crescimento dos isolados e a produção dos COVs funcionais. Assim, as bactérias selecionadas foram cultivadas em placas de Petri com divisória do mesmo modo como descrito nos itens “Teste de inibição de crescimento do patógeno por COVs” e “Teste de promoção de

crescimento das plantas por COVs” , todavia, em comparação ao meio TSA, foi utilizado o meio mineral BH - Bushnell e Haas (1941) (Tabela 1). As fontes de carbono testadas foram: glicose, sacarose, lactose, galactose, manitol e sorbitol. As mesmas foram selecionadas por serem comumente utilizadas em pesquisas semelhantes (de Mello, 1998; Faria et al., 2006; Oliveira et al., 2020) e por estarem disponíveis no laboratório em que se desenvolveu a presente pesquisa, não sendo levado em consideração o fator econômico para a produção dos meios de cultivo. A avaliação se deu por medições como anteriormente, para observar se alguma das fontes de C apresenta resultados superiores ao TSA. Para cada isolado, foi feita a comparação entre os valores obtidos em cada uma das fontes e no TSA, com análise de variância, considerando-se o valor de p significativo quando menor do que 0,05, seguido de teste estatístico de Tukey.

Tabela 1. Reagentes utilizados e suas respectivas quantidades para a produção dos meios Bushnell Haas (BH) com fontes de carbono e Ágar Triptona de Soja (TSA).

Meio Bushnell Haas (BH)								
Reagente	MgSO ₄	CaCl ₂	KH ₂ PO ₄	K ₂ HPO ₄	(NH ₄) ₂ SO ₄	FeCl ₃	Fonte C*	Ágar
g/L meio	0,2	0,02	1,0	1,0	1,0	0,05	10,0	15,0
Meio Ágar Triptona de Soja (TSA)								
Reagente	Peptona de caseína	Digestão de soja	NaCl	K ₂ HPO ₄	Glicose monohidratada	Ágar		
g/L meio	17,0	3,0	5,0	2,5	2,5	15,0		

*As fontes de carbono adicionadas ao meio para a realização dos testes foram: glicose monohidratada, sacarose, lactose, galactose, manitol e sorbitol.

5.7. Identificação dos isolados componentes da coleção

Para a identificação dos isolados de interesse, prosseguiu-se com o sequenciamento do gene 16S DNAr. Assim, os mesmos foram cultivados e submetidos ao processo de extração de DNA com o Wizard® Genomic DNA Purification Kit, seguindo o protocolo disponibilizado pelo fabricante (Promega, Brasil). A amplificação dos fragmentos alvos do sequenciamento se deu por PCR, amplificado com os iniciadores 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'), conforme realizado por Lillo et al. (2006) e os produtos de amplificação foram purificados com o kit Wizard® SV Gel and PCR

Clean-Up System e submetidos ao sequenciamento de DNA pelo método de Sanger, realizado no equipamento Applied Biosystems™ 3100. Avaliou-se a qualidade das sequências obtidas pelo programa CLC Genomics Workbench, que realizou o trimmer dos pares de base com baixa qualidade, dando origem ao arquivo fasta, contendo o consenso das sequências de alta qualidade de todos os isolados. Realizou-se o alinhamento com outras sequências de região 16S DNAr de espécies relacionadas, com alta similaridade, obtidas a partir do banco de dados do NCBI GenBank utilizando o programa de busca avançada BLAST (Altschul et al. 1997) por meio do software Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA 6.6) (Tamura et al. 2013). As sequências foram agrupadas em uma árvore filogenética utilizando a análise de Neighbor Joining (NJ) (Saitou e Nei, 1987), estimando as distâncias evolutivas com valores de bootstrap superiores a 50%, calculados a partir de 1000 repetições, tendo como modelo evolutivo Kimura-2-parâmetros (K2P) (Kimura, 1980).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Coleta dos solos e obtenção dos isolados

Uma amostra composta de cada um dos três diferentes tipos de solo coletados para a obtenção dos isolados foi encaminhada para a realização das análises físicas e químicas, permitindo a caracterização dos mesmos, conforme as Tabelas 2 e 3, dispostas a seguir.

Tabela 2. Parâmetros físicos analisados nos solos rizosféricos coletados das culturas.

Parâmetros físicos	Unidades	Feijão	Cana	Trigo
Areia total	g.kg ⁻¹	389	536	367
Silte	g.kg ⁻¹	205	187	250
Argila (c/disp.)	g.kg ⁻¹	407	278	383
Classe textural	-	arg	md-arg	arg

Métodos: Buyoucos (densímetro) (SSSA Book Series. Methods of Soil Analysis, Part 4).

Classe de diâmetros (mm) conforme USDA: (A) Cinco frações de areia: muito grossa (MG) = 2 a 1; grossa (G) 1 a 0,5; média (M) = 0,5 a 0,25; fina (F) = 0,25 a 0,10; muito fina (MF) = 0,10 a 0,05. Areia total (AT) = 2 a 0,05; silte = 0,05 a 0,002; argila total < 0,002; argila água < 0,002.

Classe de textura = Argila (c/ dispersante até 149 g/kg = arenosa (ar); 150 a 249 g/kg = média arenosa (md-ar); 250 a 349 g/kg = média argilosa (md-arg); 350 a 599 g/kg = argilosa (arg); 600 g/kg ou superior = muito argilosa (mt-arg).

Tabela 3. Parâmetros químicos analisados nos solos rizosféricos coletados das culturas.

Parâmetros químicos	Unidades	Feijão	Cana	Trigo
Cálcio KCl 1 mol/L	mmolc.dm ⁻³	101,5	83,5	84,1
Magnésio KCl 1 mol/L	mmolc.dm ⁻³	24,4	27,5	26,9
SB	mmolc.dm ⁻³	134,9	115,9	118,9
CTC	mmolc.dm ⁻³	156,2	147	146,3
V	%	86	79	81
pH CaCl ₂	-	6,11	5,53	5,78
M.O. Colorimétrica	g.dm ⁻³	32	47,4	32,3
Fósforo Resina	mg.dm ⁻³	621,7	334,5	386,8
Potássio Resina	mmolc.dm ⁻³	8,97	6,73	7,88
H+Al SMP	mmolc.dm ⁻³	21,3	31,1	27,4

Métodos: pH em CaCl₂ 0,01 mol/L; fósforo (P) método colorimétrico extraído com resina trocadora de íons, potássio (K) extração com resina trocadora de íons e determinação em espectrofotômetro de emissão atômica; Cálcio (Ca) e Magnésio (Mg) extração com cloreto de potássio e determinação em espectrofotômetro de absorção atômica; acidez potencial (H+Al) extraído com tampão SMP (Manual de análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais. IAC, 2001). SB: Soma de bases trocáveis; CTC: Capacidade de troca de cátions; V: Saturação da CTC por bases.

Após a coleta e a realização da técnica de plaqueamento dos solos em diferentes diluições e meios de cultivo, foram obtidas placas com colônias diversas, conforme Figuras 7 e 8.

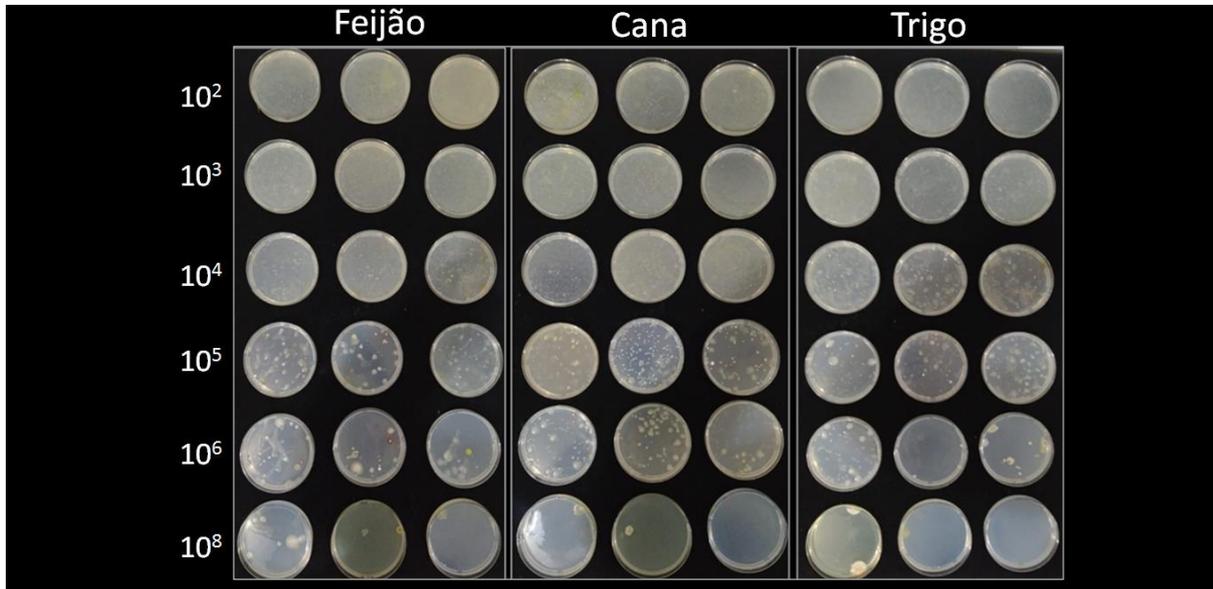


Figura 7. Crescimento das colônias bacterianas nas diferentes culturas, diluições no meio de cultivo ágar nutriente (NA). Fonte: Do próprio autor (2022).

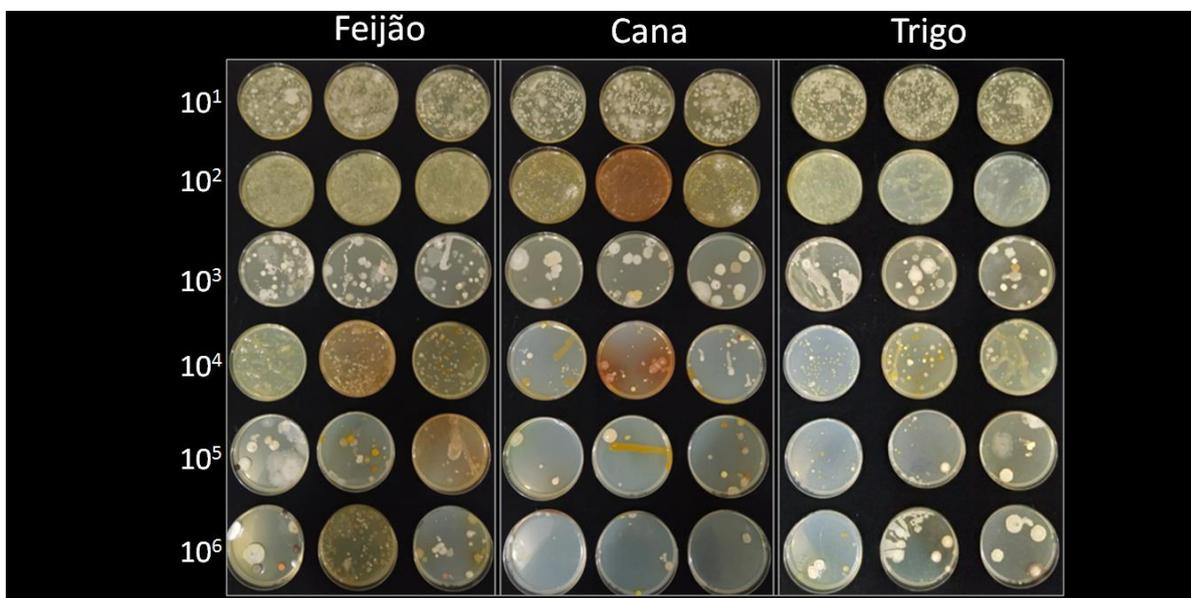


Figura 8. Crescimento das colônias bacterianas nas diferentes culturas, diluições no meio de cultivo caldo de triptona de soja (TSA). Fonte: Do próprio autor (2022).

Com o posterior estriamento e purificação de algumas dessas colônias, obteve-se uma coleção de 147 isolados, sendo 56 provenientes da cultura do feijão, 46 da cana-de-açúcar e 45 do trigo, alguns exemplares estão dispostos na Figura 9.



Figura 9. Exemplo de isolados bacterianos com diferentes características obtidos a partir da purificação, selecionados da rizosfera das plantas de feijão. Fonte: Do próprio autor (2022).

6.2. Teste de inibição de crescimento dos patógenos

Para *R. solani*, 23 isolados inibiram seu crescimento vegetativo (9 de feijão, 8 de cana-de-açúcar e 6 de trigo). Para *F. oxysporum*, 44 apresentaram esse potencial (12 de feijão, 16 de cana-de-açúcar e 16 de trigo). Dentre esses, 13 dos isolados inibiram os dois patógenos. Alguns exemplos são demonstrados na Figura 10.

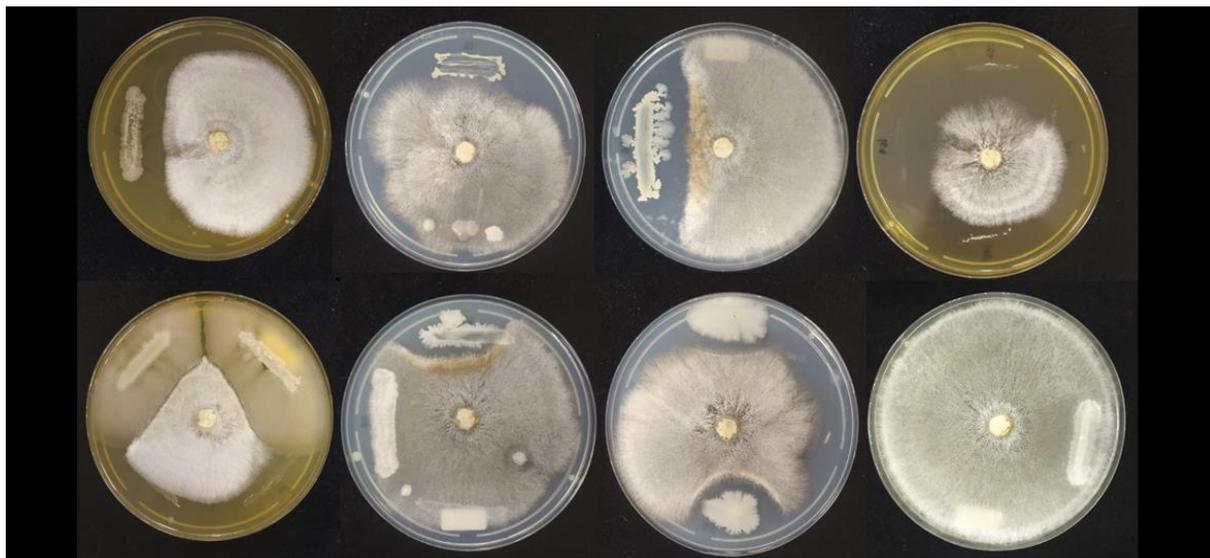


Figura 10. Exemplos de isolados com potencial de inibição de crescimento do patógeno *R. solani*. A placa no canto inferior direito apresenta um caso sem inibição. Fonte: Do próprio autor (2022).

Foi realizada a medição da distância entre o crescimento da biomassa do isolado e o micélio do patógeno (halo que separa os dois microrganismos), para avaliar a intensidade da inibição. Os valores estão dispostos nas Tabelas 4 e 5.

Tabela 4. Média do halo (cm) dos isolados com potencial de inibição de *Rhizoctonia solani*.

Halo de inibição (cm)							
RF01) 2,2	RF04) 1,2	RF07) 1,7	RC10) 3,2	RC13) 2,2	RC16) 4,2	RT19) 2,0	RT22) 3,3
RF02) 2,7	RF05) 2,9	RF08) 1,3	RC11) 3,5	RC14) 1,3	RC17) 4,0	RT20) 1,8	RT23) 3,4
RF03) 3,4	RF06) 2,1	RF09) 0,9	RC12) 2,6	RC15) 3,8	RT18) 2,7	RT21) 1,1	-

Tabela 5. Média do halo (cm) dos isolados com potencial de inibição de *Fusarium oxysporum*.

Halo de inibição (cm)							
FF01) 4,1	FF07) 0,8	FC13) 2,3	FC19) 2,8	FC25) 2,2	FT31) 0,9	FT37) 2,3	FT43) 3,0
FF02) 2,3	FF08) 0,9	FC14) 2,6	FC20) 1,8	FC26) 3,3	FT32) 3,2	FT38) 1,7	FT44) 3,9
FF03) 2,7	FF09) 3,7	FC15) 2,2	FC21) 1,2	FC27) 3,1	FT33) 1,5	FT39) 2,2	-
FF04) 1,2	FF10) 4,2	FC16) 3,1	FC22) 1,5	FC28) 2,5	FT34) 1,9	FT40) 1,6	-
FF05) 4,0	FF11) 1,9	FC17) 4,1	FC23) 2,1	FT29) 1,6	FT35) 2,5	FT41) 3,1	-
FF06) 3,1	FF12) 2,8	FC18) 3,3	FC24) 3,2	FT30) 1,0	FT36) 2,8	FT42) 2,0	-

6.3. Teste de inibição de crescimento dos patógenos por COVs

Dos 23 isolados que apresentaram inibição de *Rhizoctonia solani* no teste inicial, 12 deles demonstraram capacidade inibitória pela ação de COVs (52,2%), 7

deles oriundos da rizosfera de feijão (sistema de plantio direto), 3 de trigo (sistema convencional) e 2 de cana-de-açúcar (sistema convencional) e, para *Fusarium oxysporum*, dos 44 selecionados anteriormente, apenas 4 isolados demonstraram essa característica de interesse (9,1%), 2 originados do feijão, 1 de trigo e 1 de cana-de-açúcar. O grau de inibição variou entre os isolados, conforme visto nas Figuras 11 e 12.

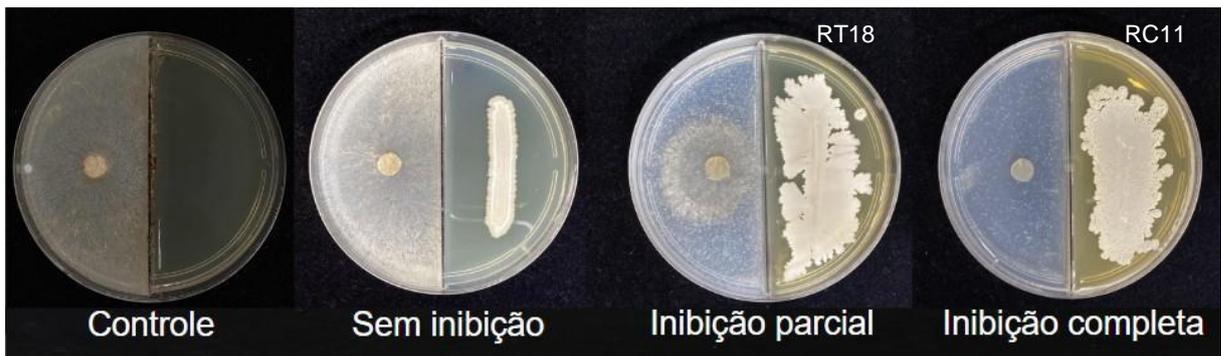


Figura 11. Isolados com característica inibitória por produção de COV'S, comparado a um isolado sem essa capacidade e ao controle (da esquerda para a direita), para o patógeno *R. solani*. Fonte: Do próprio autor (2022).

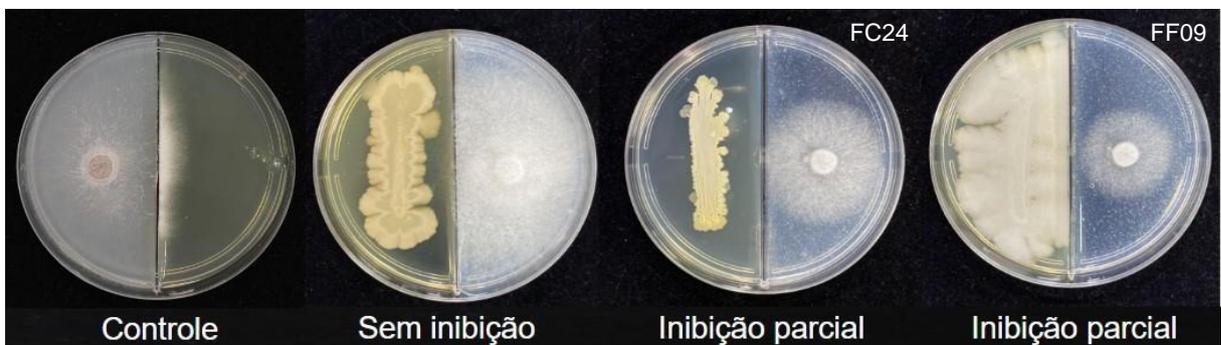


Figura 12. Isolado com característica inibitória por produção de COV'S, comparado a um isolado sem essa capacidade e ao controle (da esquerda para a direita), para o patógeno *F. oxysporum*. Fonte: Do próprio autor (2022).

No que se refere a *Rhizoctonia solani*, dos 12 isolados, 8 deles apresentaram capacidade de inibição de 100%, um com 87,5% os outros 3 estavam na faixa de 54-48% de inibição. Já para *Fusarium oxysporum*, nenhum dos isolados selecionados foram capazes de inibir totalmente o crescimento do patógeno, estando todos os 4 na faixa de 30-10% conforme as Tabelas 6 e 7 a seguir.

Tabela 6. Isolados com potencial de inibição de *Rhizoctonia solani*, a partir da medição do diâmetro médio do micélio do fungo nas placas de Petri bipartidas.

Isolado	Rizosfera de origem	Código	Identificação por sequenciamento 16S rDNA	Diâmetro micélio (cm)	Capacidade inibitória (%)
1	Feijão	RF01	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	0	100
2	Cana-de-açúcar	RC11	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	0	100
3	Feijão	RF02	<i>Bacillus subtilis</i>	0	100
4	Feijão	RF03	<i>Bacillus subtilis</i>	0	100
5	Feijão	RF05	<i>Bacillus subtilis</i>	0	100
6	Feijão	RF06	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	0	100
7	Cana-de-açúcar	RC15	<i>Bacillus subtilis</i>	0	100
8	Feijão	RF07	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	0	100
9	Trigo	RT17 (RFT01)	<i>Bacillus safensis</i>	0,75	87,5
10	Trigo	RT18	<i>Bacillus safensis</i>	2,75	54,2
11	Feijão	RF08	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	3,00	50,0
12	Trigo	RT22	<i>Bacillus subtilis</i>	3,10	48,3
Controle	-	-	-	6,00	0,0

Tabela 7. Isolados com potencial de inibição de *Fusarium oxysporum*, a partir da medição do diâmetro médio do micélio do fungo nas placas de Petri bipartidas.

Isolado	Rizosfera de origem	Código	Identificação por sequenciamento 16S rDNA	Diâmetro micélio (cm)	Capacidade inibitória (%)
1	Feijão	FF09	<i>Priestia Megaterium</i>	4,20	30,0
2	Feijão	FF12	<i>Bacillus thuringiensis</i>	4,55	24,2
3	Cana-de-açúcar	FC24	<i>Bacillus thuringiensis</i>	5,05	15,8
4	Trigo	FT41 (RFT01)	<i>Bacillus safensis</i>	5,20	13,3
Controle	-	-	-	6,00	0,0

É possível dizer que a ação de COVs se mostrou bastante relevante na inibição do fungo *Rhizoctonia solani*, já que mais da metade dos isolados que anteriormente apresentaram esse potencial inibitório de modo generalizado, demonstraram essa capacidade especificamente através da produção desses compostos, além disso, a grande maioria deles foi capaz de inibir por completo o crescimento do fungo. Já para *Fusarium oxysporum*, esse fato não foi observado,

apenas 9% dos isolados que anteriormente inibiram o fungo por algum mecanismo apresentaram capacidade inibitória pela ação de COVs, no entanto, em um potencial bastante reduzido, não ultrapassando 30% de inibição.

Apenas um único isolado apresentou capacidade inibitória em algum grau para os dois fungos, oriundo da rizosfera de plantas de trigo, recebendo uma nova codificação, com a sigla de ambos os patógenos, RFT01, indicado nas Tabelas 6 e 7 acima. Assim, 15 isolados no total foram selecionados nessa etapa.

As condições presentes dentro de cada trabalho desenvolvido na área são específicas e, desse modo, os resultados também podem apresentar variações. Relatos anteriores sobre diferenças na sensibilidade à fungistase entre diferentes microrganismos são encontradas (Garbeva et al., 2011). Também são vistas variações dentro das mesmas espécies microbianas, que podem apresentar uma alta ou baixa resposta de inibição por COVs de acordo com as condições estabelecidas.

Estudos conduzidos por Garbeva et al. (2014b), demonstraram que *Rhizoctonia solani* foi fortemente inibido por COVs da maioria das diversas cepas de bactérias avaliadas (gêneros *Collimonas*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Serratia*, entre outros), por outro lado, *Chaetomium globosum* e *Trichoderma harzianum* foram bastante resistentes aos voláteis bacterianos. Kai et al. (2007) testou o efeito de COVs de 10 bactérias obtidas de uma coleção de microrganismos antagonistas, tendo, a sua maioria, influenciado negativamente o crescimento micelial de *Rhizoctonia solani*, com inibições significativas (99-80%).

Já em outra pesquisa, Hunziker et al. (2015) isolou bactérias de brotações e raízes da cultura da batata e verificou que a *R. solani* foi geralmente pouco afetada pelos voláteis das linhagens isoladas: mesmo a linhagem mais fortemente inibitória, S04, permitiu que o fungo crescesse quase 60% de seu crescimento normal. Nesse mesmo estudo, o *F. oxysporum* se mostrou o organismo-alvo menos afetado, sendo extremamente resistente aos voláteis bacterianos, com quase nenhuma inibição significativa do crescimento após a exposição a qualquer uma das 32 linhagens.

Por outro lado, Li et al. (2018) em seu trabalho, demonstrou que voláteis provenientes do material de rizoma de *Atractylodes lancea* suprimiram significativamente o crescimento de *F. oxysporum*. Também, em seus estudos, Yuan et al. (2012) verificou que a cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* (NJN-6), isolada do

solo da rizosfera de plantas saudáveis de banana, produziu COVs que reduziram o crescimento micelial e a germinação de esporos de *F. oxysporum*. A inibição foi de aproximadamente 30% a 40% em comparação com o controle após 3 dias, sugerindo que os COVs bacterianos não foram capazes de matar *F. oxysporum*, mas tiveram um efeito significativamente inibitório no micélio fúngico.

6.4. Teste de promoção de crescimento de plantas

Exemplares de plantas de milho desmontadas com 18 DAS que se apresentaram superiores ao controle para parâmetros avaliados estão dispostos nas Figuras 13 e 14, a seguir.



Figura 13. Plantas de milho 18 DAS, experimento realizado em triplicata, controle (direita) comparado com isolados (esquerda) que se apresentaram acima da média para o parâmetro altura.

Fonte: Do próprio autor (2022).



Figura 14. Plantas de milho 18 DAS, experimento realizado em triplicata, controle (direita) comparado com isolados (esquerda) que se apresentaram acima da média para o parâmetro massa seca de raiz.

Fonte: Do próprio autor (2022).

Os resultados obtidos com a realização do teste de Dunnett a 95% indicaram que, para o parâmetro altura (cm), dois isolados apresentaram diferença significativa, PCF01 e PCF02, com valores de 8,7 cm e 8,5 cm, comparados ao controle, com 6,9 cm (Apêndices E e H).

Com relação a massa seca de parte aérea (g), quatro isolados se mostraram superiores ao controle estatisticamente (PCC01, PCC02, PCT01, PCT02), com valores entre 0,603 a 0,470 g e controle com 0,282 g (Apêndices F e I). Para massa seca de raiz (g), dois isolados (PCF03, PCF04), apresentaram média de 0,678 g e 0,525 g, superiores ao controle com 0,289 g (Apêndices G e J).

Os oitos isolados mencionados foram selecionados para prosseguimento com os testes de promoção de crescimento por COVs.

6.5. Teste de promoção de crescimento das plantas por COVs

Após sete dias de incubação, as placas em triplicata contendo três sementes de milho (Figura 15) foram avaliadas nos parâmetros comprimento do coleóptilo e raiz (cm), obtendo um total de 9 leituras por isolado.



Figura 15. Exemplo de alguns isolados nas placas com sementes de milho, após 7 dias de crescimento, comparados com o controle (primeira linha). Fonte: Do próprio autor (2022).

Os resultados dos parâmetros analisados nos 8 isolados testados em sementes de milho podem ser vistos na Tabela 8. Os valores medidos foram submetidos ao teste estatístico de Dunnett a 95%, do mesmo modo como realizado para o ensaio de promoção de crescimento em bandejas e nenhum deles apresentou diferença comparado ao controle. Os dados estão dispostos em ordem decrescente nas Figuras 16 e 17. Inferiu-se que uma das possíveis causas para o resultado obtido é o fato de o milho apresentar uma semente relativamente grande, com uma fonte de reserva nutricional significativa e, pode-se inferir que essa reserva tenha sido suficiente para suprir as demandas durante o período avaliado (7 dias), não sendo possível observar a real influência dos isolados como potencial de crescimento, já que a sua ação não se mostrou necessária para a planta se desenvolver nesses primeiros dias. Todavia, o tamanho das placas utilizadas para o teste impossibilitou uma avaliação durante um período maior de dias, já que o espaço para o crescimento se mostra um fator limitante. Por essa razão, optou-se pela realização do teste novamente, com alface e trigo, sementes menores, com

reservas inferiores quando comparadas ao milho, e que podem ser avaliadas por um período mais longo, sem que houvesse uma limitação espacial.

Tabela 8. Comprimento (em centímetros) do coleóptilo e raiz das plântulas de milho após 7 dias de crescimento, para cada um dos isolados testados comparados ao controle.

Isolado	Coleóptilo	Desvio padrão	Raiz	Desvio padrão
PCF01	2,778	0,435	3,756	0,646
PCF02	3,544	0,561	3,967	1,823
PCF03	3,097	0,611	3,976	1,336
PCF04	3,327	0,654	3,9	1,797
PCC01	3,179	0,552	3,211	1,767
PCC02	3,833	0,541	3,211	1,254
PCT01	3,456	0,478	3,176	0,986
PCT02	2,867	1,397	3,266	1,472
Controle	3,322	0,682	3,811	1,096

Comparação de médias por meio do teste de Dunnet 95% (considerando-se o valor de p significativo quando menor do que 0,05), valores com diferença significativa em relação ao controle estão indicados com um (*).

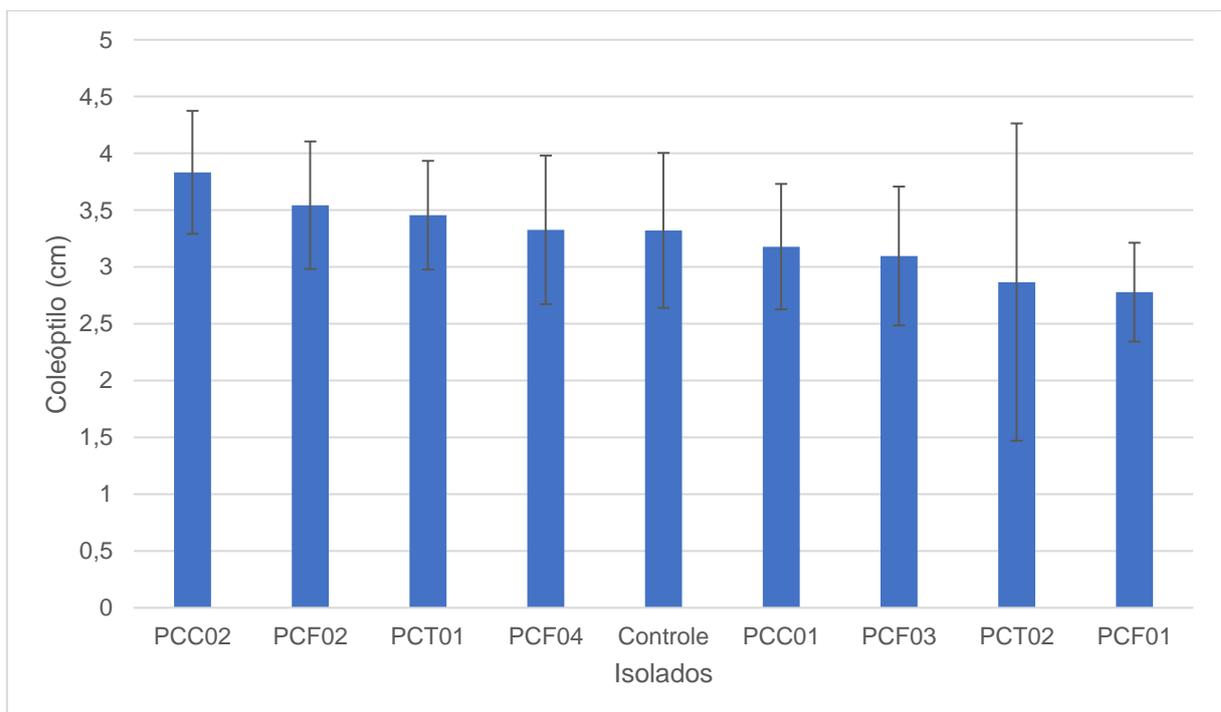


Figura 16. Comprimento (em centímetros) do coleóptilo das plântulas de milho após 7 dias de crescimento, para cada um dos isolados testados comparados ao controle.

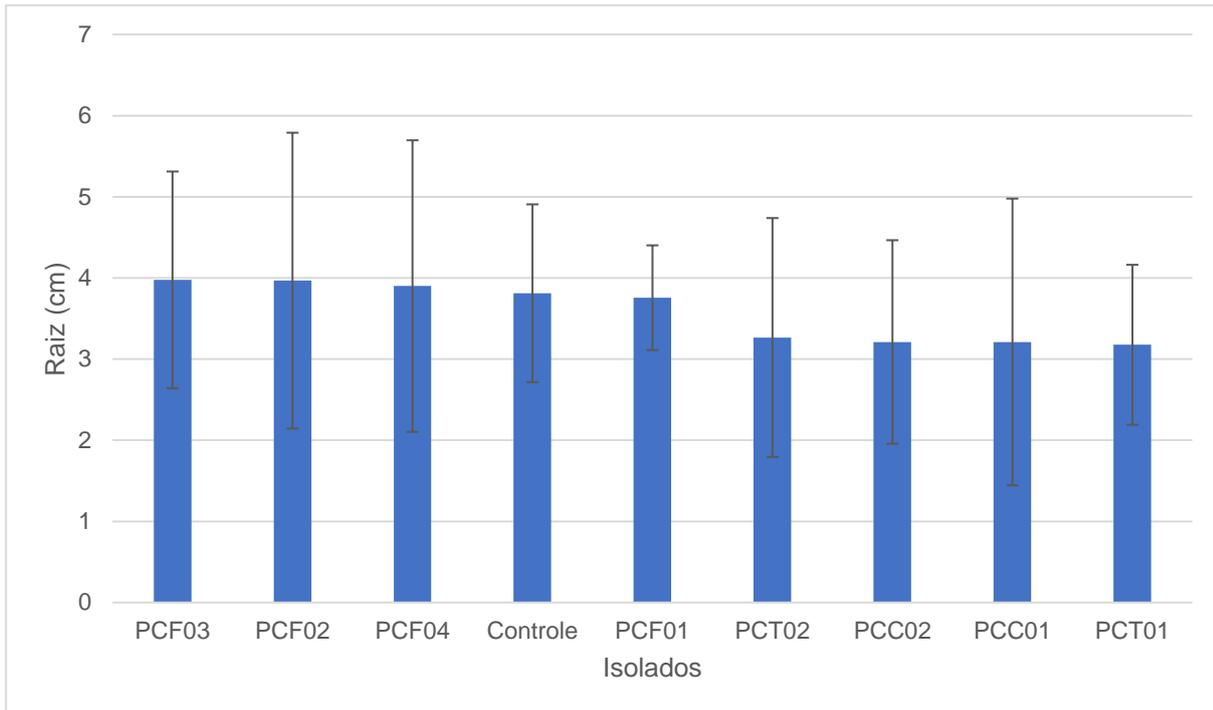


Figura 17. Comprimento (em centímetros) da raiz das plântulas de milho após 7 dias de crescimento, para cada um dos isolados testados comparados ao controle.

Com relação aos testes para as espécies de alface e trigo, o período de avaliação foi de 14 dias, e o resultado pode ser observado nas Figuras 18 e 19.

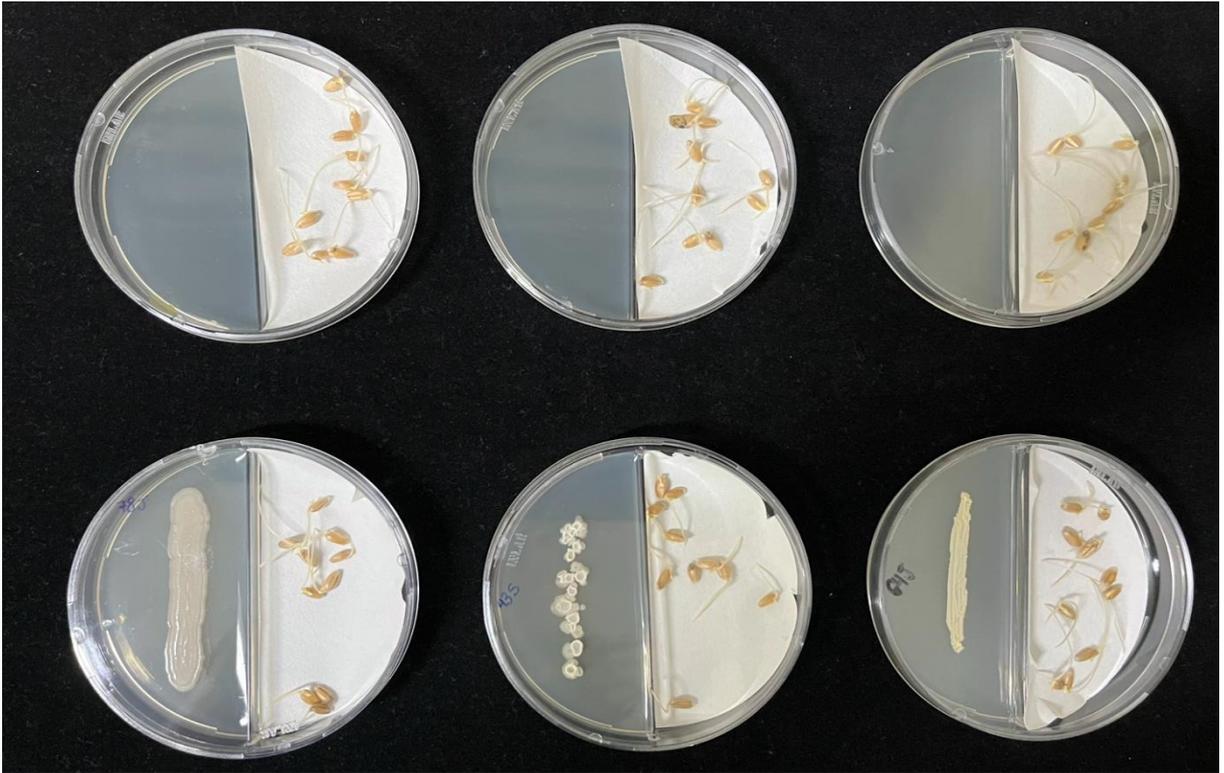


Figura 18. Exemplo de alguns isolados nas placas com sementes de trigo, após 14 dias de crescimento, comparados com o controle (primeira linha). Fonte: Do próprio autor (2022).



Figura 19. Exemplo de alguns isolados nas placas com sementes de alfaca, após 14 dias de crescimento, comparados com o controle (primeira linha). Fonte: Do próprio autor (2022).

Os resultados das avaliações após os 14 dias para as espécies de alface e trigo estão contidos nas Tabelas 9 e 10.

Tabela 9. Comprimento (em centímetros) do hipocótilo e raiz das plântulas de alface após 14 dias de crescimento, para cada um dos isolados testados comparados ao controle.

Isolado	Hipocótilo	Desvio padrão	Raiz	Desvio padrão
PCF01	1,64	0,25	0,60	0,17
PCF02	1,77	0,21	1,62	0,66
PCF03	1,87	0,55	1,83	0,57
PCF04	1,77	0,28	0,89	0,21
PCC01	2,54	0,44	2,21	0,59
PCC02	2,02	0,65	1,91	0,55
PCT01	1,14	0,42	0,64	0,28
PCT02	0,88	0,23	1,78	0,13
Controle	2,54	0,30	2,56	0,47

Comparação de médias por meio do teste de Dunnet 95% (considerando-se o valor de p significativo quando menor do que 0,05), valores com diferença significativa em relação ao controle estão indicados com um (*).

Tabela 10. Comprimento (em centímetros) do coleótilo e raiz das plântulas de trigo após 14 dias de crescimento, para cada um dos isolados testados comparados ao controle.

Isolado	Coleótilo	Desvio padrão	Raiz	Desvio padrão
PCF01	1,33	0,62	2,81	1,02
PCF02	1,49	0,68	5,16	1,51
PCF03	2,04*	0,65	3,79	1,07
PCF04	1,47	0,61	4,09	0,66
PCC01	1,17	0,57	4,62	0,81
PCC02	1,28	0,62	4,73	0,80
PCT01	1,00	0,39	3,58	0,56
PCT02	1,19	0,65	2,71	0,31
Controle	1,19	0,64	5,41	1,54

Comparação de médias por meio do teste de Dunnet 95% (considerando-se o valor de p significativo quando menor do que 0,05), valores com diferença significativa em relação ao controle estão indicados com um (*).

Os resultados foram, do mesmo modo, submetidos ao teste de Dunnet a 95%. Para a alface, assim como para o milho, não foram encontradas diferenças significativas em relação ao controle para nenhum dos parâmetros avaliados. Para a cultura do trigo, com relação ao parâmetro ramificação, todos os isolados, assim como o controle, apresentaram em média 3 ramificações por plântula, não sendo,

portanto, um fator de destaque no teste realizado. No que se refere ao comprimento do coleótilo, apenas um isolado diferiu positivamente, o PCF03, com valor de 2,04 cm em comparação com o controle, que atingiu 1,19 cm. Para comprimento de raiz, nenhum isolado se apresentou significativamente superior ao controle. Os dados estão organizados em ordem decrescente nas Figuras 20 a 23.

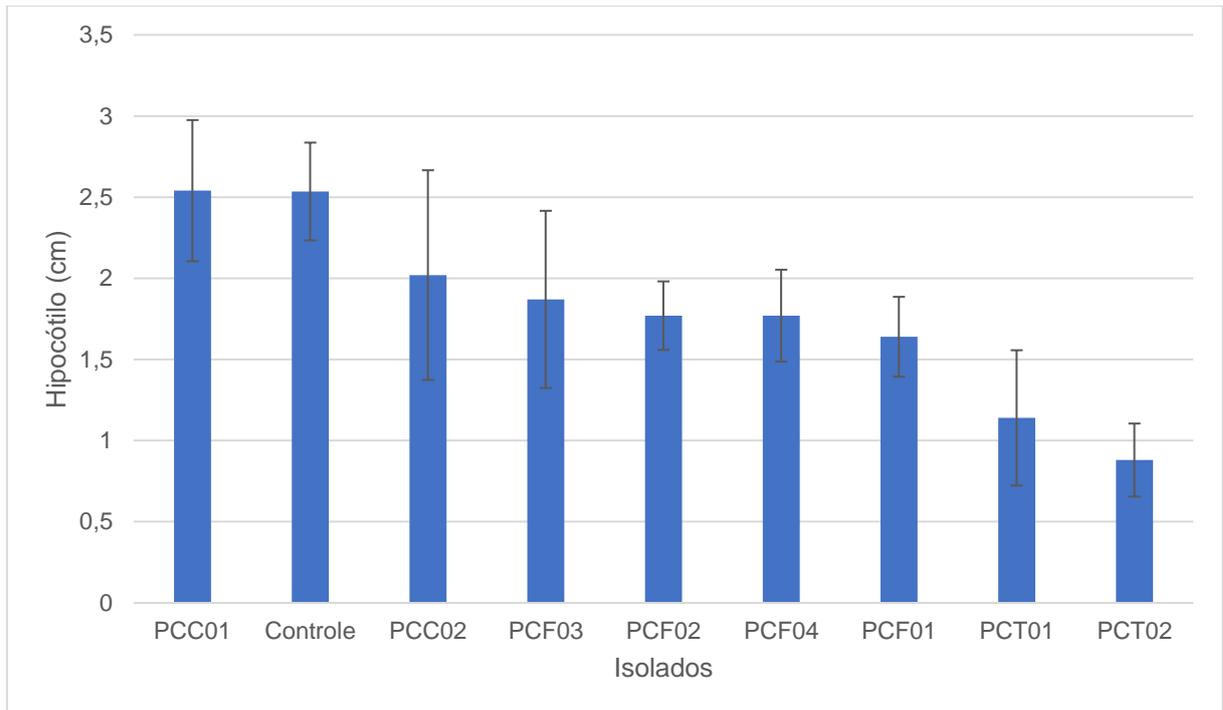


Figura 20. Comprimento (em centímetros) do hipocótilo das plântulas de alface após 14 dias de crescimento, para cada um dos isolados testados comparados ao controle.

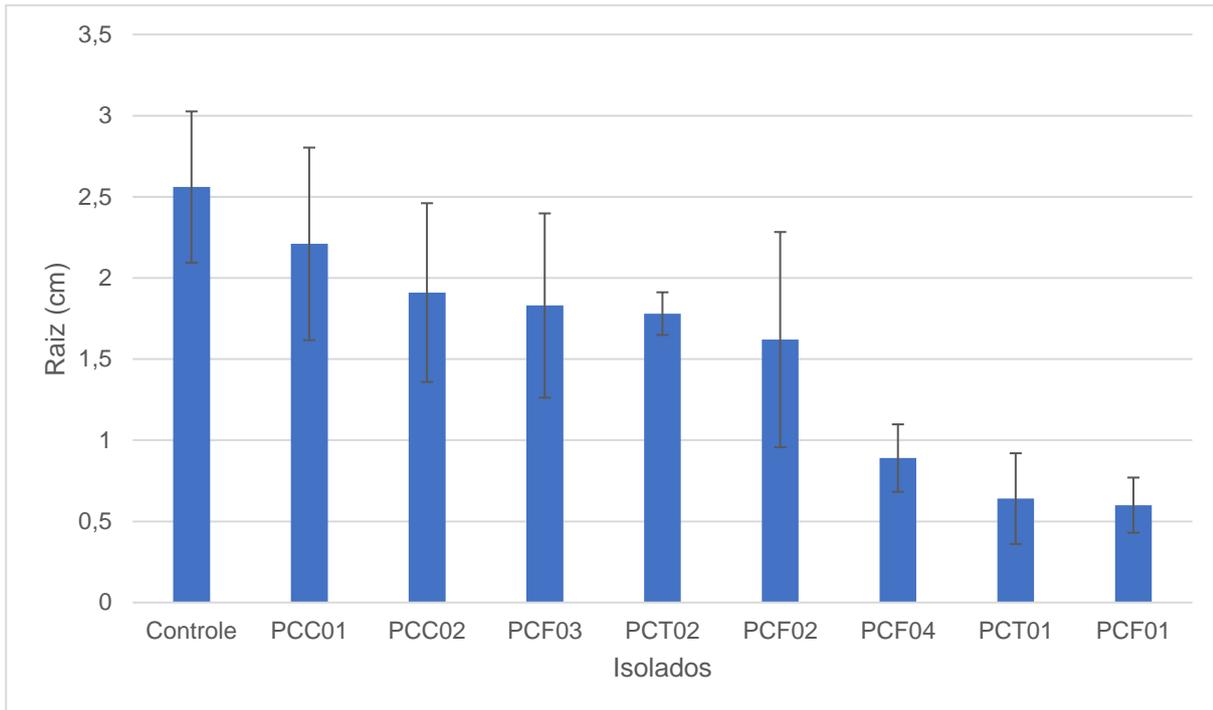


Figura 21. Comprimento (em centímetros) da raiz das plântulas de alface após 14 dias de crescimento, para cada um dos isolados testados comparados ao controle.

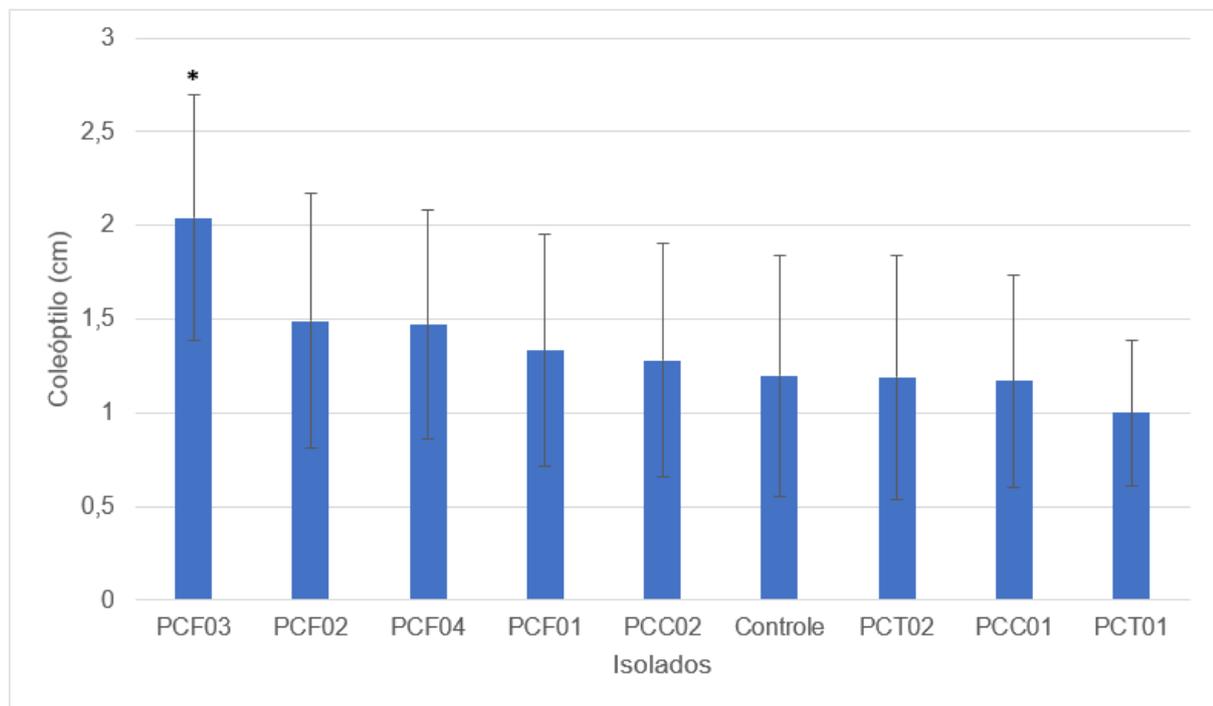


Figura 22. Comprimento (em centímetros) do coleóptilo das plântulas de trigo após 14 dias de crescimento, para cada um dos isolados testados comparados ao controle.

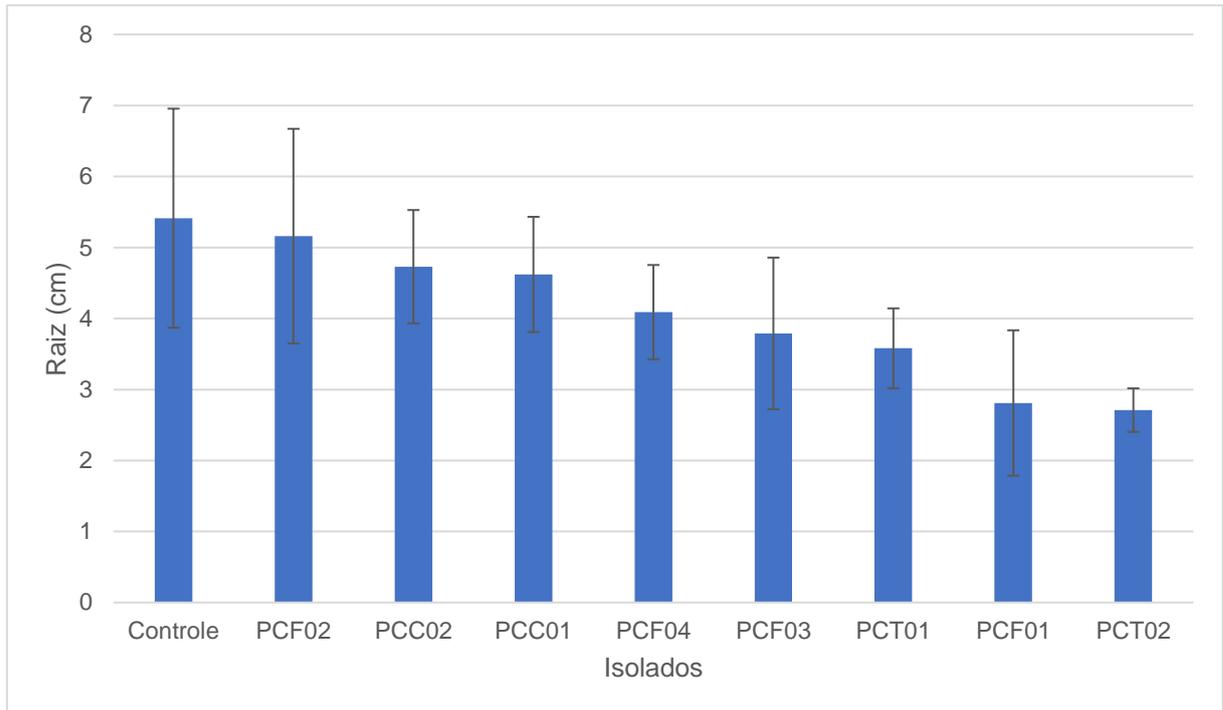


Figura 23. Comprimento (em centímetros) da raiz das plântulas de trigo após 14 dias de crescimento, para cada um dos isolados testados comparados ao controle.

Assim, dos oito isolados avaliados em três diferentes espécies, o único que apresentou resultado significativo no que se refere à produção de COVs com potencial de promoção de crescimento de plantas foi o PCF03 em plântulas de trigo, com valores positivos de comprimento de coleóptilo. Esse isolado foi selecionado anteriormente por apresentar resultado significativo para o parâmetro massa seca de raiz no teste realizado com milho em bandejas.

Algumas pesquisas também apontaram resultados positivos de COVs bacterianos na promoção de crescimento da cultura. Paul et al. (2022) observou que um experimento de inoculação de *B. pseudomycooides* em sementes de trigo gerou aumento no crescimento morfológico, medido pela taxa de germinação, índice de vigor, comprimento e número de raízes e brotos, e peso seco. Devido à inoculação bacteriana, foram observadas mudanças nos níveis bioquímicos, funções e morfologia de *Triticum aestivum*, com elevação considerável no peso seco, volume de água e conteúdo de clorofila.

Outro estudo avaliou o efeito de COVs fúngicos de três cepas de *Trichoderma harzianum* em plantas de trigo, uma cepa selvagem e duas cepas geneticamente modificadas; uma expressando o gene *tri5*, que leva à síntese e emissão do composto volátil tricodieno, e a outra com silenciamento do gene *erg1*, prejudicando

a produção de ergosterol. Como resultado, a cepa selvagem e a com silenciamento do gene *erg1* aumentaram o peso fresco e o comprimento da parte aérea, mas reduziram o peso seco das raízes. Por outro lado, a cepa transformante *tri5* reduziu o crescimento das raízes e da parte aérea em comparação com o grupo de controle e as outras cepas. Não foram observadas diferenças em relação ao rendimento quântico da fluorescência da clorofila e ao conteúdo de clorofila foliar, sugerindo que os COVs liberados não interferem na fotossíntese (García et al., 2022).

6.6. Seleção das fontes de carbono promissoras

Os valores foram submetidos ao teste estatístico de Tukey a 95%, comparando os meios de cultivo, para cada isolado. Para *R. solani*, a capacidade de inibição dos isolados por ação dos COVs se mostrou a mesma para os diferentes meios, assim como quando comparados ao TSA, com exceção de um único isolado (RT18) que apresentou desempenho significativamente inferior no meio BH com adição de sorbitol, com micélio de 3,55 cm e inibição de 40,8%, comparado à 2,75 cm e 54,2% de inibição em TSA, conforme exibido na Tabela 11.

Tabela 11. Potencial de inibição de *Rhizoctonia solani*, por medição do diâmetro médio do micélio do fungo, com a adição de diferentes fontes de carbono ao meio de cultivo.

Código	Diâmetro médio do micélio (cm)						
	TSA	Glicose	Sacarose	Lactose	Galactose	Manitol	Sorbitol
RF01	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
RC11	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
RF02	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
RF03	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
RF05	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
RF06	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
RC15	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
RF07	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
RFT01	0,75 ^a	0,80 ^a	0,70 ^a	0,75 ^a	0,75 ^a	0,80 ^a	0,75 ^a
RT18	2,75 ^b	2,75 ^b	2,80 ^b	2,80 ^b	2,70 ^b	2,75 ^b	3,55^a
RF08	3,00 ^a	3,00 ^a	3,05 ^a	2,95 ^a	3,05 ^a	3,10 ^a	3,00 ^a
RT22	3,10 ^a	3,05 ^a	3,10 ^a	3,15 ^a	3,10 ^a	3,10 ^a	3,05 ^a
Controle	6,00 ^a	6,00 ^a	6,00 ^a	6,00 ^a	6,00 ^a	6,00 ^a	6,00 ^a

Comparação de médias por meio do teste de Tukey 95% (considerando-se o valor de p significativo quando menor do que 0,05), valores médios seguidos da mesma letra, na linha, não diferem entre si.

Para os testes envolvendo o patógeno *F. oxysporum*, os resultados obtidos foram similares ao meio TSA, com diferenças significativas sendo vistas apenas nos isolados FF12 que apresentou micélio de 4,10 cm e uma capacidade inibitória de 31,7% com glicose (7,5% a mais do que TSA) e FC24 com 4,50 cm de micélio com manitol como fonte de C (25,0% de inibição, 9,2% a mais do que no meio TSA) (Tabela 12).

Tabela 12. Potencial de inibição de *Fusarium oxysporum*, por medição do diâmetro médio do micélio do fungo, com a adição de diferentes fontes de carbono ao meio de cultivo.

Diâmetro médio do micélio (cm)							
Código	TSA	Glicose	Sacarose	Lactose	Galactose	Manitol	Sorbitol
FF09	4,20 ^a	4,25 ^a	4,20 ^a	4,15 ^a	4,20 ^a	4,25 ^a	4,20 ^a
FF12	4,55 ^a	4,10^b	4,55 ^a	4,60 ^a	4,50 ^a	4,55 ^a	4,50 ^a
FC24	5,05 ^a	5,10 ^a	5,00 ^a	5,05 ^a	5,10 ^a	4,50^b	5,05 ^a
RFT01	5,20 ^a	5,15 ^a	5,25 ^a	5,20 ^a	5,20 ^a	5,15 ^a	5,15 ^a
Controle	6,0 ^a	6,0 ^a	6,0 ^a	6,0 ^a	6,0 ^a	6,0 ^a	6,0 ^a

Comparação de médias por meio do teste de Tukey 95% (considerando-se o valor de p significativo quando menor do que 0,05), valores médios seguidos da mesma letra, na linha, não diferem entre si.

Para o isolado com potencial de promotor de crescimento (PCF03), não foram observadas diferenças significativas para os parâmetros coleóptilo e raiz, conforme visto na Tabela 13.

Tabela 13. Potencial de promoção de crescimento, por medição do comprimento médio do coleóptilo e raiz das plântulas de trigo, com a adição de diferentes fontes de carbono ao meio de cultivo.

Código	TSA	Glicose	Sacarose	Lactose	Galactose	Manitol	Sorbitol
Comprimento médio do coleóptilo (cm)							
PCF03	2,04 ^a	2,10 ^a	2,12 ^a	2,01 ^a	2,07 ^a	2,13 ^a	2,00 ^a
Controle	1,19 ^a	1,15 ^a	1,19 ^a	1,22 ^a	1,25 ^a	1,14 ^a	1,16 ^a
Comprimento médio da raiz (cm)							
PCF03	3,79 ^a	3,77 ^a	3,70 ^a	3,68 ^a	3,85 ^a	3,91 ^a	3,64 ^a
Controle	5,41 ^a	5,36 ^a	5,52 ^a	5,35 ^a	5,49 ^a	5,50 ^a	5,41 ^a

Comparação de médias por meio do teste de Tukey 95% (considerando-se o valor de p significativo quando menor do que 0,05), valores médios seguidos da mesma letra, na linha, não diferem entre si.

6.7. Identificação dos isolados componentes da coleção

Para essa etapa, foram selecionados 16 isolados no total com potencial de produção de COVs de interesse: 11 com capacidade inibitória de *Rhizoctonia solani*, 3 para *Fusarium oxysporum*, 1 inibindo ambos os fungos patogênicos e 1 como promotor de crescimento de plantas. Os resultados obtidos com o sequenciamento, após comparação com o banco de dados disponíveis no GenBank estão descritos na Figura 24, a seguir. As sequências mais similares às obtidas a partir dos isolados foram então utilizadas para gerar inferências filogenéticas dos organismos que compõem a coleção microbiana sugerida neste projeto, permitindo uma estimativa da biodiversidade contida na coleção.

Todas as sequências obtidas foram ancoradas com espécies tipo (nomeadas como “type”), com publicação completa em banco de dados. A espécie *Escherichia coli* foi utilizada como grupo externo (outgroup).

A construção da árvore filogenética gerou apenas um grupo, as sequências correspondentes de todos os isolados foram relacionadas à família Bacillaceae, com enfoque para o gênero *Bacillus*.

Bacillus spp. são microrganismos conhecidos por serem seguros para aplicação na agricultura, possuindo habilidades incríveis para sintetizar uma ampla variedade de metabólitos benéficos para as plantas (Lateef et al., 2015; Prakash e Arora, 2019), além da sua capacidade de produzir uma grande variedade de compostos antifúngicos para suprimir ou matar patógenos fúngicos (Chaurasia et al., 2005). Numerosos voláteis identificados liberados por *Bacillus* demonstraram inibir o crescimento fúngico, incluindo dimetil dissulfeto, 1-undeceno, benzaldeído, benzotiazol, dimetil trissulfeto, ciclo-hexanol, decanal, 2-etil-1-hexanol (Kai et al., 2009), com efeitos antagonistas de voláteis contra uma ampla variedade de patógenos, como *Alternaria alternata*, *A. solani*, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium oxysporum*, *Fusarium oxysporum*, *Moniliophthora perniciosa*, *P. variotii* e o oomiceto *Pythium afertile* (Chaurasia et al., 2005; Yuan et al., 2012; López et al., 2015; Gao et al., 2017).

Conforme exibido na árvore, 6 grupos de espécies foram identificados: *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus safensis*, *Lysinibacillus sphaericus*, *Bacillus thuringiensis* e *Priestia megaterium*. Para todas as espécies

citadas, uma variedade de trabalhos é encontrada na literatura, destacando o potencial de COVs produzidos pelas mesmas, com diversas funções descritas.

O grupo mais significativo foi o dos isolados RF02, RF03, RF05, RC15, RT22 (inibidores de *R. solani*) e PCF03 (promotor de crescimento em plântulas de trigo), que foram identificados como espécies de *Bacillus subtilis*.

Zhang et. al (2020), demonstrou que COVs produzidos pela cepa de *Bacillus subtilis* - ZD01, podem reduzir o tamanho da colônia e a penetração micelial, além de causar sérias alterações morfológicas em *Alternaria solani*. Além de inibir a germinação de conídios e reduzir significativamente as áreas de lesão e o número de *A. solani in vivo*. Dos 29 COVs produzidos pela cepa ZD01, 9 mostraram atividades completas de inibição do crescimento contra o patógeno em questão.

Além do potencial antifúngico, trabalhos relatam a capacidade de cepas da espécie em estimular a biossíntese de osmoprotetores (colina e glicina betaína) na planta, melhorando seu crescimento sob condições de restrição de água e tratamentos osmóticos (Zhang et al., 2010). *B. subtilis* GB03 e seu principal composto volátil, acetoina, aumentaram a tolerância da hortelã-pimenta ao estresse salino, estimulando a biossíntese do ácido salicílico e reduzindo o ABA (Cappellari e Banchio, 2020) e COVs dessa mesma cepa mostraram-se capazes de aumentar a produção de óleos essenciais no Manjeriço doce (Banchio et al., 2009).

Em seguida, quatro isolados: RF01, RF07, RF08, RC11 (inibidores de *R. solani*), apresentaram-se como espécies de *Bacillus amyloliquefaciens*.

Diversos trabalhos trazem o potencial de COVs produzidos por representantes dessa espécie. A exposição aos voláteis de *Bacillus amyloliquefaciens* GB03 desencadeou a promoção de crescimento dependente de auxina (Zhang et al., 2007) e atuaram no aumento da absorção de ferro em *Arabidopsis thaliana* por meio de três mecanismos diferentes (Zhang et al., 2009). Os COVs produzidos pela linhagem NJN-6 reduziram o crescimento micelial e a germinação de esporos de *F. oxysporum*, com inibição de cerca de 30% a 40% (Yuan et al., 2012).

Os isolados RFT01 (inibidor de *R. solani* e *F. oxysporum*) e RT18 (inibidor de *R. solani*) foram agrupados juntamente com espécies de *Bacillus safensis*.

Em estudos, *Bacillus safensis* STJP (NAIMCC-B-02323), proveniente do solo rizosférico de *Stevia rebaudiana*, mostrou forte atividade de biocontrole contra o

fitopatígeno *Alternaria alternata*, dos 25 COVs totais identificados, 5 inibiram o crescimento do micélio, controlando a formação de esporos e a germinação de conídios (Prakash e Arora, 2021).

In vitro, *Bacillus safensis* SJ4, cepa isolada do solo rizosférico de plantas saudáveis de tomate cultivadas em estufas não aquecidas na Argélia, inibiu significativamente o crescimento do micélio de cepas do fungo *Botrytis cinerea*, tanto por meio de confrontação direta em ensaios de cultura dupla (inibição de 12-69%) quanto pela produção de compostos voláteis (inibição de 36-46%) (Foughalia et. al, 2022).

Os compostos voláteis da cepa *B. safensis* RGM 2450 causaram uma redução de 79(±23)% no crescimento micelial de *B. cinérea*, todavia, não observou-se redução no crescimento micelial em outros fungos avaliados (*Colletotrichum acutatum*, *Fusarium oxysporum* e *Phytophthora cinnamomi*), as mudas de tomate inoculadas com a cepa apresentaram um aumento de 55% em peso úmido e 45% em peso seco após 21 dias de incubação (Altimira et. al, 2022).

O isolado RF06 (inibidor de *R. solani*) apresentou-se como pertencente ao grupo das espécies de *Lysinibacillus sphaericus*. Anteriormente conhecido como *Bacillus sphaericus*, a espécie foi definida como possuindo uma espóra terminal esférica e por sua incapacidade de fermentar açúcares (White e Lotay, 1980). Foi reclassificado para o novo gênero *Lysinibacillus* com base em características fenotípicas, incluindo o fato de que os membros desse novo gênero diferiam de outros *Bacillus* por produzirem peptidoglicanos contendo lisina e ácido aspártico (Ahmed et al., 2007). Muitas cepas de *L. sphaericus* produzem bacteriocinas, antibióticos proteicos que são eficazes contra outras cepas da mesma espécie (Cokmus e Yousten, 1993), e essas podem ser consideradas toxinas antibacterianas, além disso, estudos têm mostrado que *L. sphaericus* é eficaz como patógeno de insetos, especialmente contra mosquitos (Berry, 2012).

Seu potencial de supressão de doenças e inibição da germinação de escleródios de *Rhizoctonia solani*, por meio da produção do metabólito antifúngico ácido 1,2-benzenodicarboxílico butil 2-etilhexil é comprovado *in vitro* e *in vivo* (Shabanamol et al., 2021).

L. sphaericus endofítico isolado da cultura do arroz mostrou inibição de crescimento de 100% do patógeno *Rhizoctonia solani*, causador da queima da bainha do arroz, por meio da produção de compostos orgânicos voláteis. Em

condições de estufa, a aplicação foliar e no solo de *L. sphaericus* diminuiu significativamente a porcentagem de incidência da doença. Todos os tratamentos bacterizados foram superiores ao tratamento com fungicida químico. A aplicação de *L. sphaericus* em tratamentos individuais e combinados induziu resistência sistêmica, como evidenciado pelo acúmulo significativo de enzimas de defesa, como peróxidos, polifenol oxidases e fenilalanina amônia, além do aumento de compostos fenólicos (Shabanamol et al., 2017).

Prosseguindo com a análise da árvore filogenética, dois isolados caracterizados pelo potencial de inibição de *F.oxysporum*, FC24 e FF12, apresentaram sequencias semelhantes à *Bacillus thuringiensis*, sendo alocados juntamente com os representantes dessa espécie.

Um trabalho avaliando o efeito de COVs produzidos por uma cepa de *B. thuringiensis* - BCN10, em cinco patógenos de pós-colheita isolados de frutas de nêspera demonstrou um efeito antifúngico contra *Botryosphaeria sp.*, *Penicillium expansum*, *Trichoderma atroviride* e *Colletotrichum gloeosporioides* e sem efeito em *Fusarium oxysporum*. A inibição do crescimento micelial de BCN10 contra *Botryosphaeria sp.* foi de 47%, *P. expansum* e *T. atroviride* foram cerca de 10% a 20%, respectivamente, e contra *C. gloeosporioides* foi inferior a 10%, mas ainda acima de zero. Mesmo após 5 dias, os diâmetros reduzidos da doença em *T. atroviride* e *C. gloeosporioides* com o tratamento de BCN10 foram extremamente significativos (He et. al, 2020).

O ensaio realizado por Lucon (2010) para determinar o possível efeito dos compostos voláteis produzidos por 3 isolados de *B. thuringiensis* no controle da doença da mancha preta na cultura da laranja mostrou um número médio significativamente menor de lesões nas frutas tratadas com Bt-HD-567 (16,2), Bt-Dimy (18,9) e BtDiPel (15,4), em comparação com o controle (53,2). As porcentagens de redução em relação ao controle no número de lesões de mancha preta em frutas de laranja doce pós-colheita pelos isolados Bt-HD-567, Bt-Dimy e BtDiPel foram de 70%, 65% e 71%, respectivamente.

Por fim, o último isolado identificado no presente trabalho (FFO9 – inibidor de *F. oxysporum*) foi relacionado ao grupo de representantes de *Priestia Megaterium*. Essa espécie era anteriormente conhecida como *Bacillus megaterium*, todavia, foi proposta a criação de um novo gênero, já que é possível uma distinção de forma

confiável de todas as outras espécies de Bacillaceae devido a presença de duas CSIs (conserved signature indel - inserção ou deleção conservada em uma sequência genética) na oligoribonuclease NrnB, exclusivamente compartilhadas por todos os membros desse gênero (Gupta et al. 2020).

Para *P. megaterium* o efeito positivo dos compostos voláteis 2-pentilfurano (Zou et al. 2010) e acetoína (Ryu et al. 2003) na promoção do crescimento de *A. thaliana* foi observado. Assim também, observou-se propriedades antifúngicas de *P. megaterium* mediada por COVs contra o *Aspergillus flavus* produtor de aflatoxina encontrado em grãos de arroz (Mannaa et al. 2017). Outro exemplo refere-se a cepa B388, que foi isolada do solo da rizosfera de pinheiro em Uttarakhand, na Índia, que inibiu o crescimento de fitopatógenos como *A. alternata* e *F. oxysporum* ao produzir compostos voláteis e difusíveis (Triverdi e Pandey, 2008).

As pesquisas citadas são apenas alguns exemplares da vasta literatura existente avaliando o potencial de COVs produzidos especificamente por membros da família Bacillaceae, com efeitos positivos tanto no biocontrole de fitopatógenos como na promoção de crescimento de diversas culturas agrícolas, mostrando a relevância desse grupo de bactérias na busca de melhorias em eficiência agronômica.

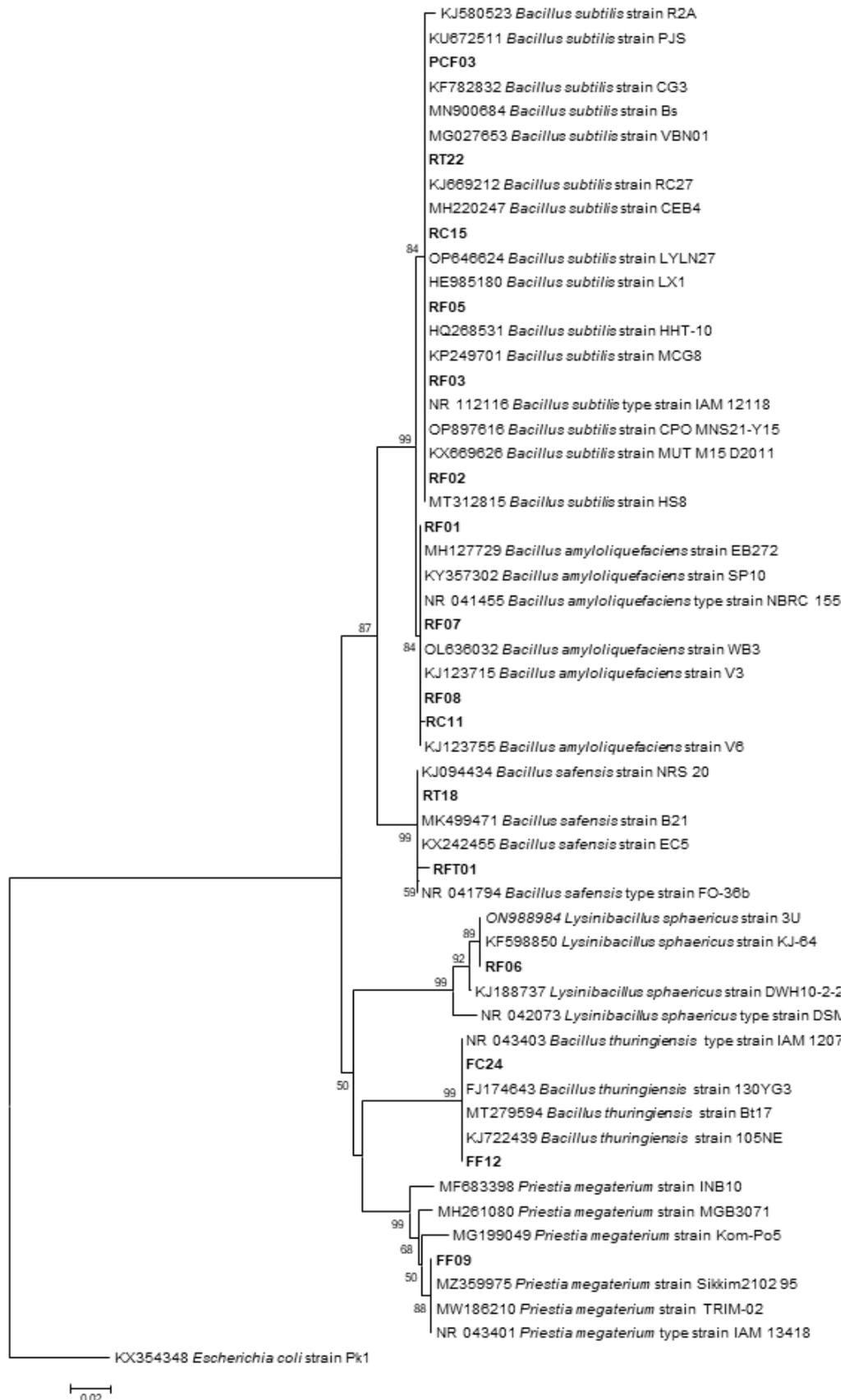


Figura 24 Árvore filogenética dos isolados de interesse, por alinhamento das sequências do gene 16S DNAr com as sequências bacterianas mais próximas da busca BLAST.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para as condições apresentadas neste estudo, as bactérias rizosféricas isoladas de plantas de feijão, trigo e cana-de-açúcar geraram os melhores resultados na avaliação do potencial de inibição do fungo fitopatogênico *R. solani*, quando comparado as outras características de interesse avaliadas. Foram selecionados 12 isolados com essa função, sendo 8 deles com inibição completa (100%), já para *F. oxysporum*, apenas 4 isolados apresentaram capacidade de inibição parcial (30-13%) e somente 1 isolado demonstrou-se como possível promotor de crescimento, com resultado positivo para o parâmetro comprimento do coleóptilo (cm) de plântulas de trigo, em contraste, para as culturas de milho e alface não obteve-se respostas significativas estatisticamente.

Ao avaliar a representatividade de cada cultura, observamos que 9 dos isolados identificados, cerca de 56%, são originados da rizosfera de feijão. Algumas razões para isso são o fato da etapa inicial de obtenção de isolados para a realização dos testes gerar uma coleção maior de feijão, seguido de cana-de-açúcar e trigo, além disso, a área de coleta de solo nessa região apresentava o sistema de plantio direto, em contraste com as outras duas, em sistema convencional, esse fator pode contribuir para que o ambiente solo-planta dessa cultura apresente maior diversidade microbiana e funcional, permitindo a seleção de mais microrganismos com o potencial desejado em questão. Por fim, doenças ocasionadas pelo fungo *Rhizoctonia solani*, como a Podridão Radicular e pelo *Fusarium oxysporum* (Murcha de *Fusarium*), possuem maior representatividade e importância para o feijão quando comparado as duas culturas, assim, a probabilidade de encontrarmos microrganismos com esse potencial inibitório em solos rizosféricos dessa cultura é maior em relação às outras

É possível inferir que a produção de COVs com essas características específicas não é amplamente distribuída dentro da comunidade rizosférica, já que das 147 bactérias previamente isoladas e testadas, obteve-se na etapa final uma coleção com 16 microrganismos potenciais (cerca de 11% do total). A identificação dos isolados por meio do sequenciamento do gene 16S DNAr, trouxe destaque para os *Bacillus*, reforçando a importância desse grupo como organismos benéficos com uma ampla gama de aplicações na agricultura, incluindo seu potencial de produção de COVs de interesse.

Assim como no presente trabalho, grande parte do conhecimento atual sobre o potencial de voláteis microbianos baseia-se em estudos *in vitro* em condições ricas em nutrientes, muito diferente das condições limitadas com as quais os microrganismos lidam na maioria dos ambientes naturais. (Weisskopf et al., 2021). Além disso, muitos estudos têm se concentrado em compostos isolados em uma concentração e organismo-alvo, os efeitos de misturas complexas de COVs são menos abordados (Groenhagen et al., 2013; Garbeva et al., 2014 a,b).

Com isso, surgem algumas questões: As taxas de produção e persistência de COVs sustentam um papel na competição bacteriana e eliciação de respostas das plantas em condições de campo? Quais as interações entre os COVs em misturas complexas? As relações entre COVs podem transmitir informações específicas? Quais as interações entre COVs e parâmetros ambientais (oxigênio, umidade, etc)? Esses pontos devem ser melhor explorados em pesquisas para avanços significativos na área.

Outro campo desafiador é a identificação correta das moléculas voláteis, que é um pré-requisito para o entendimento de suas funções biológicas, todavia, identificar precisamente o grande número de voláteis microbianos geralmente detectados em misturas complexas não é uma tarefa fácil, as funções biológicas da grande maioria dos voláteis microbianos ainda são desconhecidas, muitos ainda precisam ser descobertos e caracterizados quimicamente e, especificamente em comunidades com múltiplas espécies, é difícil reconhecer quem emite os sinais, quem os recebe e interpretar as mensagens transmitidas (Weisskopf et al., 2021). No entanto, os avanços recentes na química analítica e as poderosas ferramentas da biologia molecular moderna vêm permitindo cada vez mais uma detecção sensível, confiável e robusta, sendo de grande ajuda na obtenção de uma visão mais abrangente da comunicação química mediada por voláteis num futuro próximo (Cellini et al., 2021).

Dentro do contexto abordado, levanta-se a importância da identificação futura dos compostos voláteis produzidos pelos 16 isolados selecionados nesse estudo, utilizando, por exemplo a detecção por meio do espectrômetro de massas associado à cromatografia gasosa (GC-MS), integrando a capacidade de separação da cromatografia com a identificação e separação dos compostos da espectrometria,

indicando a presença de compostos na fase gasosa com massas moleculares variadas.

Por fim, pensando na realização de testes *in vivo* dos isolados selecionados e identificados para confirmar sua capacidade em desempenhar as funções de interesse, deve-se destacar que o estabelecimento de populações estáveis de bactérias benéficas que liberam COVs é um requisito para aplicações agrícolas bem-sucedidas. Além disso, tratando-se de consórcios bacterianos, pesquisas sobre a formulação de produtos bioestimulantes e melhoramento de plantas para a capacidade de formar relações simbióticas mostram-se relevantes para facilitar a colonização e a resiliência de bactérias benéficas.

REFERÊNCIAS

- Abis, L. et al. (2020). Reduced microbial diversity induces larger volatile organic compound emissions from soils. **Sci. Rep.** 10, 6104–6104.
- Ahmed, I.; Yokota, A.; Yamazoe, A.; Fujiwara, T. (2007). Proposal of *Lysinibacillus boronitolerans* gen. nov. sp. nov., and transfer of *Bacillus fusiformis* to *Lysinibacillus fusiformis* comb. nov. and *Bacillus sphaericus* to *Lysinibacillus sphaericus* comb. nov. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 57, 1117–1125.
- van Agtmaal, M. et al. (2015). Legacy effects of anaerobic soil disinfestation on soil bacterial community composition and production of pathogen-suppressing volatiles. **Front. Microbiol.** <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00701>.
- Altimira, F., et al. (2022). Genomic and Experimental Analysis of the Biostimulant and Antagonistic Properties of Phytopathogens of *Bacillus safensis* and *Bacillus siamensis*. **Microorganisms** 10, 670.
- Altinok, H. H. (2013). *Fusarium* Species Isolated from Common Weeds in Eggplant Fields and Symptomless Hosts of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae* in Turkey. **Journal of Phytopathology** 161(5), 335–340.
- Altschul S.F.; Madden T.L.; Schaffer A.A.; Zhang J.H.; Zhang Z.; Miller W. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res** 25:3389-3402.
- Anees, M.; Edel-Hermann, V.; Steinberg, C. (2010). Build up of patches caused by *Rhizoctonia solani*. **Soil Biology and Biochemistry**, 42(10), 1661–1672.
- Arrebola, E. et al. (2010). Effect of volatile compounds produced by *Bacillus* strains on postharvest decay in *citrus*. **Biol. Control** 53, 122–128.
- Audrain, B.; Farag, M.A.; Ryu, C.M.; Ghigo, J.M. (2015). Role of bacterial volatile compounds in bacterial biology. **FEMS Microbiol. Rev.** 39, 222–233.
- Avalos, M.; van Wezell, G. P.; Raaijmakers, J. M.; Garbeva, P. (2018). Healthy scents: microbial volatiles as new frontier in antibiotic research? **Curr. Opin. Microbiol.** 45, 84–91.
- Bailly, A. et al. (2014). The inter- kingdom volatile signal indole promotes root development by interfering with auxin signalling. **Plant J.** 80, 758–771.
- Bailly, A.; Weisskopf, L. (2017). Mining the volatilomes of plant-associated microbiota for new biocontrol solutions. **Front. Microbiol.** 8, 1638.
- Balali, G.R.; Neate, S.M.; Scott, E.S.; Whisson, D.L.; Wicks, T.J. (1995). Anastomosis group and pathogenicity of isolates of *Rhizoctonia solani* from potato crops in South Australia. **Plant Pathology** 44, 1050-1057.

Banchio, E. et al. (2009). Soil bacteria elevate essential oil accumulation and emissions in sweet basil. **J. Agric. Food Chem.** 57, 653–657.

Beitelshees, M.; Hill, A.; Jones, C. H.; Pfeife, B. A. (2018). Phenotypic Variation during Biofilm Formation: Implications for Anti-Biofilm Therapeutic Design. **Materials**, 11(7):1086.

Bernardes, F.S.; Patrício, F.R.A.; Santos, A.S.; Freitas, S.S. (2010). Indução de resistência sistêmica por rizobactérias em cultivos hidropônicos. **Summa Phytopathologica**, v.36, n.2, p.115-121.

Berry, C. (2012). The bacterium, *Lysinibacillus sphaericus*, as an insect pathogen. **Journal of Invertebrate Pathology**, 109(1), 1–10.

Bhattacharyya, D. et al. (2015). Volatile indole produced by rhizobacterium *Proteus vulgaris* jbls202 stimulates growth of *Arabidopsis thaliana* through auxin, cytokinin, and brassinosteroid pathways. **J. Plant Growth Regul.** 34, 158–168.

Bitas, V.; Kim H.S.; Bennett, J.W.; Kang, S. (2013). Sniffing on Microbes: diverse roles of microbial volatile organic compounds in plant health. **Mol Plant Microbe Interact** 26: 835–843.

Bitas, V.; McCartney, N.; Li, N.; Demers, J., Kim, J-E., Kim, H-S; Brown, K.M.; Kang S. (2015). *Fusarium oxysporum* volatiles enhance plant growth via affecting auxin transport and signaling. **Front. Microbiol.** 6, 1248.

Blom, D. et al. (2011). Production of plant growth modulating volatiles is widespread among rhizosphere bacteria and strongly depends on culture conditions. **Environ. Microbiol.** 13, 3047–3058.

Bolkan, H.A.; Ribeiro, W.R.C. (1985). Anastomosis groups and pathogenicity of *Rhizoctonia solani* isolates from Brazil. **Plant Disease** 69, 599-601.

Boukaew, S. et al. (2018). Fumigant activity of volatile compounds of *Streptomyces philanthi* RM-1-138 and pure chemicals (acetophenone and phenylethyl alcohol) against anthracnose pathogen in postharvest chili fruit. **Crop Prot.** 103, 1–8.

Brackman, G.; Coenye, T. (2015). Quorum sensing inhibitors as anti-biofilm agents. **Curr. Pharm. Des.**,21, 5–11.

Briard, B., Heddergott, C.; Latge, J.P. (2016). Volatile compounds emitted by *Pseudomonas aeruginosa* stimulate growth of the fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. **Mbio**.

Brown, R.W. et al. (2021). Volatile organic compounds (VOCs) allow sensitive differentiation of biological soil quality. **Soil Biology and Biochemistry** 156, 108187.

Busby, P.E. et al. (2017). Research priorities for harnessing plant microbiomes in sustainable agriculture. **PLoS Biol.** 15.

Bushnell, C.D., Haas, H.I. (1941). The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. **J. Bacteriol.**, 41:654-673.

Cappellari, L.d.R.; Banchio, E. (2020). Microbial volatile organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens* GB03 ameliorate the effects of salt stress in *Mentha piperita* principally through acetoin emission. **J. Plant Growth Regul.** 39, 764–775.

Cattelan, A.J. (1999). Métodos quantitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras do crescimento vegetal. **Embrapa Soja**. ISSN 1516-781X. Documentos, 139, 36p.

Cellini, A.; Spinelli, F.; Donati, I.; Ryu, C-M.; Kloepper, J.W. (2021). Bacterial volatile compound-based tools for crop management and quality. **Trends in Plant Science**, Volume 26, Issue 9, Pages 968-983, ISSN 1360-1385.

Chaurasia, B.; Pandey, A.; Palni, L.M.S.; Trivedi, P.; Kumar, B.; Colvin, N. (2005). Diffusible and volatile compounds produced by an antagonistic *Bacillus subtilis* strain cause structural deformations in pathogenic fungi in vitro. **Microbiol. Res.** 160 75–81.

Chen, Y.; Gozzi, K.; Yan, F.; Chai, Y. (2015). Acetic acid acts as a volatile signal to stimulate bacterial biofilm formation. **Mbio.** 00392-15.

Chernin, L.; Toklikishvili N.; Ovadis, M.; Kim, S.; Ben-Ari, J.; Khmel, I.; et al. (2011). Quorum-sensing quenching by rhizobacterial volatiles. **Environ Microbiol Rep** 3:698–704.

Cho, S.M. et al. (2008). 2R,3R- Butanediol, a bacterial volatile produced by *Pseudomonas chlororaphis* O6, is involved in induction of systemic tolerance to drought in *Arabidopsis thaliana*. **Mol. Plant Microbe Interact.** 21, 1067–1075.

Chung, G.F. (2012). Effect of Pests and Diseases on Oil Palm Yield. **Palm Oil** 163-210.

Cofer, T.M. et al. (2018). From acetoin to (Z)-3-hexen-1-ol: the diversity of volatile organic compounds that induce plant responses. **J. Agric. Food Chem.** 66, 11197–11208.

Cokmus, C.; Yousten, A.A. (1993). Bacteriocin production by *Bacillus sphaericus*. **J. Invertebr. Pathol.** 61, 323–325.

Corley R.H.V.; Tinker, P.B. (2003). Selection and breeding. The oil palm. 4th ed. Oxford: **Blackwell Science Ltd Blackwell Publishing**, 133-200.

D'Alessandro, M. et al. (2014). Volatiles produced by soil-borne endophytic bacteria increase plant pathogen resistance and affect tritrophic interactions. **Plant Cell Environ.** 37, 813–826.

Dandurishvili, N.; Toklikishvili, N.; Ovadis, M.; Eliashvili, P.; Giorgobiani, N.; Keshelava, R.; et al. (2011). Broad-range antagonistic rhizobacteria *Pseudomonas fluorescens* and *Serratia plymuthica* suppress *Agrobacterium* crown gall tumours on tomato plants. **J Appl Microbiol** 110: 341–352.

Dane, J. H.; Clarke Topp, G. (2002). Methods of Soil Analysis. **SSSA Book Series**. 10.2136/sssabookser5.4.

Davis, T.S. et al. (2013). Microbial volatile emissions as insect semiochemicals. **J. Chem. Ecol.** 39, 840–859.

Demirci, E. (1998). *Rhizoctonia* species and anastomosis groups isolated from barley and wheat in Erzurum, Turkey. **Plant Pathology** 47, 10.

Ditengou, F. A. et al. (2015). Volatile signalling by sesquiterpenes from ectomycorrhizal fungi reprogrammes root architecture. **Nat. Commun.**

Dixon, E.; et al. (2011). Solid-Phase Microextraction and the Human Fecal VOC Metabolome. **Plos One**, Vol. 6, pp. 1-9.

Dong, Y.-H.; Gusti, A.R.; Zhang, Q.; Xu, J.-L.; Zhang, L.-H. (2002). Identification of quorum-quenching N-acylhomoserine lactonases from *Bacillus* species. **Appl. Environ. Microbiol.**, 68, 1754–1759.

Effmert, U.; Kalderas, J.; Warnke, R.; Piechulla, B. (2012). Volatile mediated interactions between bacteria and fungi in the soil. **J Chem Ecol** 38: 665–703.

Farag, M. et al. (2013). Dynamic chemical communication between plants and bacteria through airborne signals: induced resistance by bacterial volatiles. **J. Chem. Ecol.** 38, 1007–1018.

Farine, J.-P. et al. (2017). Maternally-transmitted microbiota affects odor emission and preference in *Drosophila* larva. **Sci. Rep.** 7, 6062.

Fernando, W.G.D. et al. (2005). Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. **Soil Biol. Biochem.** 37, 955–964.

Filippi, M.C.C.; Silva, G.B.; Silva-Lobo, V.L.; Côrtes, M.V.C.B.; Moraes, A.J.G.; Prabhu, A.S. (2011). Leaf blast (*Magnaporthe oryzae*) suppression and growth promotion by rhizobacteria on aerobic rice in Brazil. **Biological Control**, v.58, p.160–166.

Fincheira, P.; Quiroz, A. (2018). Microbial volatiles as plant growth inducers. **Microbiol. Res.** 208, 63–75.

Flood, J. (2006). A review of Fusarium wilt of oil palm caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *elaeidis*. **Phytopathology** 96(6):660-662.

Foughalia, A. et al. (2022). *Acinetobacter calcoaceticus* SJ19 and *Bacillus safensis* SJ4, two Algerian rhizobacteria protecting tomato plants against *Botrytis cinerea* and promoting their growth. **Egypt J Biol Pest Control** 32, 12.

Gabriel, K.T. et al. (2018). Biomimicry of volatile-based microbial control for managing emerging fungal pathogens. **J. Appl. Microbiol.** 124, 1024–1031.

Gamliel-Atinsky, E. et al. (2009). Inoculum availability and conidial dispersal patterns of *Fusarium mangiferae*, the causal agent of mango malformation disease. **Phytopathology** 99(2):160-166.

Gao, Z.; Zhang, B.; Liu, H.; Han, J.; Zhang, Y. (2017) Identification of endophytic *Bacillus velezensis* ZSY-1 strain and antifungal activity of its volatile compounds against *Alternaria solani* and *Botrytis cinerea*. **Biol. Control.** 105, pp. 27-39.

Garbeva, P.; Hol, W.H.G.; Termorshuizen, A.J.; Kowalchuk, G.A.; de Boer, W. (2011). Fungistasis and general soil biostasis – a new synthesis. **Soil Biol Biochem.** 43: 469–477.

Garbeva P.; Hordijk C.; Gerards S.; De Boer W. (2014a). Volatile-mediated interactions between phylogenetically different soil bacteria. **Front Microbiol** 5: 285–290.

Garbeva P.; Hordijk C.; Gerards S.; De Boer W. (2014b). Volatiles produced by the mycophagous soil bacterium *Collimonas*. **FEMS Microbiol Ecol** 87: 639–649.

Garbeva, P.; Weisskopf, L. (2020). Airborne medicine: bacterial volatiles and their influence on plant health. **New Phytol.** 226, 32–43.

García, S.A.; Robles, A.M.; Encina, A.; Gutiérrez, S.; Casquero, P.A. (2022). Novel culture chamber to evaluate in vitro plant-microbe volatile interactions: Effects of *Trichoderma harzianum* volatiles on wheat plantlets. **Plant Science**, Volume 320, 111286, ISSN 0168-9452.

Garcia, V.G.; Onco, M.A.P.; Susan, V.R. (2006). Review. Biology and systematics of the form genus *Rhizoctonia*. **Spanish Journal of Agricultural Research** 4, 55-79.

Gordon, T.R. (2017). *Fusarium oxysporum* and the Fusarium wilt syndrome. **Annual review of phytopathology** 55:23-39.

Gotor-Vila, A. et al. (2017). Antifungal effect of volatile organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens* CPA-8 against fruit pathogen decays of cherry. **Food Microbiol.** 64, 219–225.

Groenhagen, U.; Baumgartner, R.; Bailly, A.; Gardiner, A.; Eberl, L.; Schulz, S. et al. (2013). Production of bioactive volatiles by different *Burkholderia ambifaria* strains. **J Chem Ecol** 39: 892–906.

Guendouze, A.; Plener, L.; Bzdrenga, J.; Jacquet, P.; Rémy, B.; Elias, M.; Lavigne, J.-P.; Daudé, D.; Chabrière, E. (2017). Effect of quorum quenching lactonase in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and comparison with quorum sensing inhibitors. **Front. Microbiol.**, 8, 227.

Gupta, R.S.; Patel, S.; Saini, N.; Chen, S. (2020). Robust demarcation of 17 distinct *Bacillus* species clades, proposed as novel Bacillaceae genera, by phylogenomics and comparative genomic analyses: description of *Robertmurraya kyonggiensis* sp. nov. and proposal for an emended genus *Bacillus* limiting it only to the members of the *subtilis* and *cereus* clades of species. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 70:5753–5798.

Gutiérrez-Luna, F.M. et al. (2010). Plant growth-promoting rhizobacteria modulate root-system architecture in *Arabidopsis thaliana* through volatile organic compound emission. **Symbiosis** 51, 75–83.

Han, S.H. et al. (2006). GacS- dependent production of 2R,3R- butanediol by *Pseudomonas chlororaphis* O6 is a major determinant for eliciting systemic resistance against *Erwinia carotovora* but not against *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* in tobacco. **Mol. Plant Microbe Interact.** 19, 924–930.

Hassani, M.A. et al. (2018). Microbial interactions within the plant holobiont. **Microbiome** 6, 58.

He, C.N.; Ye, W.Q.; Zhu, Y.Y.; Zhou, W.W. (2020). Antifungal Activity of Volatile Organic Compounds Produced by *Bacillus methylotrophicus* and *Bacillus thuringiensis* against Five Common Spoilage Fungi on Loquats. **Molecules**, 25, 3360.

Heil, M.; Karban, R. (2010). Explaining evolution of plant communication by airborne signals. **Trends Ecol. Evol.** 25, 137–144

Helman, Y.; Chernin, L. (2015). Silencing the mob: disrupting quorum sensing as a means to fight plant disease. **Mol. Plant Pathol.** 16, 316–329.

Hernández-Calderón, E. et al. (2018). Volatile compounds from beneficial or pathogenic bacteria differentially regulate root exudation, transcription of iron transporters, and defense signaling pathways in *Sorghum bicolor*. **Plant Mol. Biol.** 96, 291–304.

Hietala, A.M.; Mehli, L.; Nagy, N.E.; Kvaalen, H.; La Porta, N. (2005). *Rhizoctonia solani* AG 2-1 as a causative agent of cotyledon rot on European beech (*Fagus sylvatica*). **Forest Pathology** 35, 397-410.

Hol, W. H. G. et al. (2015). Non-random species loss in bacterial communities reduces antifungal volatile production. **Ecology** 96, 2042–2048.

Hornby, J.M.; Jensen, E.C.; Lisec, A.D.; Tasto, J.J.; Jahnke, B.; Shoemaker, R.; et al. (2001). Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. **Appl Environ Microbiol** 67: 2982–2992.

Huang, C.J. et al. (2012). Dimethyl disulfide is an induced systemic resistance elicitor produced by *Bacillus cereus* C1L. **Pest Manag. Sci.** 68, 1306–1310.

Hunziker, L.; Boenisch, D.; Groenhagen, U.; Bailly, A.; Schulz, S.; Weisskopf, L. (2015). *Pseudomonas* strains naturally associated with potato plants produce volatiles with high potential for inhibition of *Phytophthora infestans*. **Appl Environ Microbiol** 81: 821–830.

Hyakumachi, M.; Ui, T. (1982). Disease Decline Phenomenon of Sugarbeet Root Rot. **Memoirs of the Faculty of Agriculture**, Hokkaido University, 13, pp. 445-454.

Iqbal, N. et al. (2013) Current understanding on ethylene signaling in plants: the influence of nutrient availability. **Plant Physiol. Biochem.** 73, 128–138.

Jiang, C.H. et al. (2019). Volatile organic compounds emitted by *Bacillus* sp. JC03 promote plant growth through the action of auxin and strigolactone. **J. Plant Growth Regul.** 87, 317–328.

Joshi, R. (2018). A review of *Fusarium oxysporum* on its plant interaction and industrial use. **Journal of Medicinal Plants Studies** 6(3): 112-115.

Kai, M.; Effmert, U.; Berg, G.; Piechulla, B. (2007). Volatiles of bacterial antagonists inhibit mycelial growth of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*. **Arch Microbiol.** 187 (5):351-60.

Kai, M.; Haustein, M.; Molina, F.; Petri, A.; Scholz, B.; Piechulla, B. (2009). Bacterial volatiles and their action potential. **Appl Microbiol Biotechnol** 81:1001–1012.

Kai, M.; Piechulla, B. (2009). Plant growth promotion due to rhizobacterial volatiles — an effect of CO₂? **FEBS Lett.** 583, 3473–3477.

Kanchiswamy, C.N. et al. (2015a). Bioprospecting bacterial and fungal volatiles for sustainable agriculture. **Trends Plant Sci.** 20, 206–211.

Kanchiswamy, C.N.; Malnoy, M.; Maffei, M.E. (2015b). Chemical diversity of microbial volatiles and their potential for plant growth and productivity. **Front. Plant Sci.**, 6.

Kim, K.S.; Lee, S.; Ryu, C.M. (2013). Interspecific bacterial sensing through airborne signals modulates locomotion and drug resistance. **Nat. Commun.** 4:1809.

Kimura M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **J Mol Evol.** 16:111-120.

Kinsbursky, R.S.; Weinhold, A.R. (1988). Influence of soil on inoculum density disease incidence relationships of *Rhizoctonia solani*. **Phytopathology** 78, 127-130.

Kong, H.G. et al. (2018). Stereoisomers of the bacterial volatile compound 2,3-butanediol differently elicit systemic defense responses of pepper against multiple viruses in the field. **Front. Plant Sci.** 9, 90.

Kviatkovski, I. et al. (2015). *Pseudomonas aeruginosa* activates the quorum sensing LuxR response regulator through secretion of 2-aminoacetophenone. **Chem. Commun.** 51, 3258–3261.

Lantz, A.T. et al. (2019). Isoprene: new insights into the control of emission and mediation of stress tolerance by gene expression. **Plant Cell Environ.** 42, 2808–2826.

Lateef, A.; Adelere, I.A.; Gueguim-Kana, E.B. (2015). The biology and potential biotechnological applications of *Bacillus safensis*. **Biologia** 70:411–429.

Lazazzara, V. et al. (2017). Growth media affect the volatilome and antimicrobial activity against *Phytophthora infestans* in four *Lysobacter* type strains. **Microbiol. Res.** 201, 52–62.

Ledger, T. et al. (2016). Volatile-mediated effects predominate in Paraburkholderia *phytofirmans* growth promotion and salt stress tolerance of *Arabidopsis thaliana*. **Front. Microbiol.** 7, 1838.

Lemfack, M.C.; Nickel, J.; Dunkel, M.; Preissner, R.; Piechulla B. (2014). mVOC: a database of microbial volatiles. **Nucleic Acids Res** 42: D744–D748.

Leroy, P.D. et al. (2011). Microorganisms from aphid honeydew attract and enhance the efficacy of natural enemies. **Nat. Commun.** 2, 348.

Létoffé, S.; Audrain, B.; Bernier, S.P.; Delepierre, M.; Ghigo, J.M. (2014). Aerial exposure to the bacterial volatile compound trimethylamine modifies antibiotic resistance of physically separated bacteria by raising culture medium pH. **MBio** 5: e00944–13.

Li, N. et al. (2018) Volatile compounds emitted by diverse *Verticillium* species enhance plant growth by manipulating auxin signaling. **Mol. Plant Microbe Interact.** 31, 1021–1031.

Li, Q. et al. (2012). Effects of volatile substances of *Streptomyces globisporus* JK-1 on control of *Botrytis cinerea* on tomato fruit. **Biol. Control** 61, 113–120.

Li, X.; de Boer, W.; Zhang, Y.; Ding, C.; Zhang, T.; Wang, X. (2018). Suppression of soil-borne *Fusarium* pathogens of peanut by intercropping with the medicinal herb *Atractylodes lancea*. **Soil Biology and Biochemistry**, 116, 120–130.

Lin, Y.H.; Xu, J.L.; Hu, J.; Wang, L.H.; Ong, S.L.; Leadbetter, J.R.; Zhang, L.H. (2003). Acyl-homoserine lactoneacylase from *Ralstonia* strain XJ12B represents a novel and potent class of quorum-quenching enzymes. **Mol. Microbiol.**, 47, 849–860.

Liu, C. et al. (2018). Antagonistic activities of volatiles produced by two *Bacillus* strains against *Monilinia fructicola* in peach fruit. **J. Sci. Food Agric.** 98, 5756–5763.

de Lillo, A.; Ashley, F.P.; Palmer, R.M.; Munson, M.A.; Kyriacou, L.; Weightman, A.J.; Wade, W.G. (2006) Novel subgingival bacterial phylotypes detected using multiple universal polymerase chain reaction primer sets. **Oral Microbiol Immunol** 21:61–68

López, C.C.; Serio, A.; Gianotti, A.; Sacchetti, G.; Ndagijimana, M.; Ciccarone, C.; Stellarini, A.; Corsetti, A.; Paparella, A. (2015). Diversity of food-borne *Bacillus* volatile compounds and influence on fungal growth **J. Appl. Microbiol.** 119, pp. 487-499.

Lucon, C. M. M.; Guzzo, S. D.; de Jesus, C. O.; Pascholati, S. F.; de Goes, A. (2010). Postharvest harpin or *Bacillus thuringiensis* treatments suppress citrus black spot in “Valencia” oranges. **Crop Protection**, 29(7), 766–772.

Lustosa, M.C.G. (2023). Estudo metabólico e atividades biológicas de extratos produzidos pelos fungos endofíticos *Preussia* sp. e *Phyllosticta* sp. isolados de *Platonia insignis* Mart. **Tese (Doutorado)**, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araraquara, 112p.

Mannaa, M.; Oh, J.Y.; Kim, K.D. (2017). Biocontrol activity of volatile-producing *Bacillus megaterium* and *Pseudomonas protegens* against *Aspergillus flavus* and Aflatoxin production on stored rice grains. **Mycobiology** 45:213–219.

Martins, M.; Henriques, M.; Azeredo, J.; Rocha, S.M.; Coimbra, M.A.; Oliveira, R. (2007). Morphogenesis control in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* through signaling molecules produced by planktonic and biofilm cells. **Eukaryot Cell** 6: 2429–2436.

Marquez-Villavicencio, M.P. et al. (2011). The 3-hydroxy-2- butanone pathway is required for *Pectobacterium carotovorum* pathogenesis. **PLoS ONE** 6, e22974.

Mazzola, M.; Freilich, S. (2017). Prospects for biological soilborne disease control: application of indigenous versus synthetic microbiomes. **Phytopathology** 107, 256–263

McGenity, T.J. et al. (2018). Microbial cycling of isoprene, the most abundantly produced biological volatile organic compound on Earth. **ISME J** 12, 931–941.

MacNish, G.C. (1996). Patch dynamics and bare patch. In: Sneh, B., Jabaji-Hare, S., Neate, S., Dijst, G. (Eds.), *Rhizoctonia* Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control. **Kluwer Academic Publications**, Dordrecht, NL, pp. 217-226.

MacNish, G.C.; Dodman, R.L. (1987). Vertical distribution of root damage caused by *Rhizoctonia solani* in wheat. **Plant Pathology** 36, 328-332.

MacNish, G.C.; McLernon, C.K.; Wood, D.A. (1993). The use of zymogram and anastomosis techniques to follow the expansion and demise of 2 coalescing bare patches caused by *Rhizoctonia solani* AG 8. **Australian Journal of Agricultural Research** 44, 1161-1173.

Meldau, D. G. et al. (2013). Dimethyl disulfide produced by the naturally associated bacterium *Bacillus* sp B55 promotes *Nicotiana attenuata* growth by enhancing sulfur nutrition. **Plant Cell** 25, 2731–2747.

Moisan, K. et al. (2019). Volatiles of pathogenic and nonpathogenic soil-borne fungi affect plant development and resistance to insects. **Oecologia** 190, 589–604.

Molina-Santiago, C.; Daddaoua, A.; Fillet, S.; Duque, E.; Ramos J.L. (2014). Interspecies signalling: *Pseudomonas putida* efflux pump TtgGHI is activated by indole to increase antibiotic resistance. **Environm Microbiol** 16:1267–1281.

Monteiro, M.C.P.; Alves, N.M.; Queiroz, M.V.; Pinho, D.B.; Pereira, O.L.; de Souza, S.M.C.; Cardoso, P.G. (2017). Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos de plantas de café. **Biosci. J.**, Uberlândia, v. 33, n.2.

Moraes, G.K.A.; Ferraz, L.F.; Chapla, V.M. (2020). Compostos Orgânicos Voláteis de Fungos Endofíticos e suas Aplicações Biotecnológicas. **Rev. Virtual Quim.** [Vol 12] [No. 6]

Niu, Q. et al. (2010). A Trojan horse mechanism of bacterial pathogenesis against nematodes. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 107, 16631–16636.

Ogoshi, A. (1987). Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraspecific groups of *Rhizoctonia solani* Kuhn. **Annual Review of Phytopathology** 25, 125-143.

Ogoshi, A. (1996). Introduction the genus *Rhizoctonia*. In: Sneh, B., Jabaji-Hare, S., Neate, S., Dijst, G. (Eds.), *Rhizoctonia* Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control. **Kluwer Academic Publishers**, Dordrecht, NL, pp. 1-9.

Papavizas, G.C. (1970). Colonization and growth of *Rhizoctonia solani* in soil. In: Parmeter Jr., J.R. (Ed.), *Rhizoctonia solani*, **Biology and Pathology**. University of California Press, Berkeley, USA, pp. 108-112.

Pascual, C.B.; Hyakumachi, M. (2000). Distribution of vegetatively compatible populations of *Rhizoctonia solani* AG 1-IA in a field planted with different host species. **Journal of General Plant Pathology** 66, 206-209.

Paul, G.K. et al. (2022). Volatile compounds of *Bacillus pseudomycooides* induce growth and drought tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Sci Rep** 12, 19137.

Paula, T.J.; Rotter, C.; Hau, B. (2008). Effects of inoculum depth on the activity of *Rhizoctonia solani* and on bean root rot development in sterile soil. **Journal of Plant Diseases and Protection** 115, 172-177.

Peñuelas, J.; Asensio, D.; Tholl, D.; Wenke, K.; Rosenkranz, M.; Piechulla, B.; et al. (2014). Biogenic volatile emissions from the soil. **Plant Cell Environ** 37: 1866–1891.

Philippot, L.; Raaijmakers, J.M.; Lemanceau, P.; Putten, W.H. van der. (2013). Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. **Nature Reviews Microbiology** 11: 789-799.

Piechulla, B.; Degenhardt, J. (2014). The emerging importance of microbial volatile organic compounds. **Plant Cell Environ** 37: 811–812.

Piechulla, B. et al. (2017). Effects of discrete bioactive microbial volatiles on plants and fungi. **Plant Cell Environ.** 40, 2042–2067.

Pieterse, C.M.J. et al. (2014). Induced systemic resistance by beneficial microbes. **Annu. Rev. Phytopathol.** 52,347–375.

Pinho, R.S.C.; Pozzebon, B.C.; Calvano, C.C.A.; Vey, R.T.; Hajar, A.S.; Rodrigues, B.M.; Rodrigues, K.R.R. (2019). Bioprospecção de rizobactérias para o controle *in vitro* de *Pyricularia grisea*, tratamento de sementes e promoção de crescimento de plântulas de arroz. **Biotemas**, v.32, n.3, p.23-34.

Plyuta, V.A. et al. (2014). The ability of natural ketones to interact with bacterial quorum sensing systems. **Mol. Genet. Microbiol. Virol.** 29, 167–171.

Popova, A. A. et al. (2014). Inhibitory and toxic effects of volatiles emitted by strains of *Pseudomonas* and *Serratia* on growth and survival of selected microorganisms, *Caenorhabditis elegans*, and *Drosophila melanogaster*. **Biomed. Res. Int.** 2014, 125704

Prakash, J.; Arora, N.K. (2019). Phosphate-solubilizing *Bacillus* sp. enhances growth, phosphorus uptake and oil yield of *Mentha arvensis* L. **3 Biotech** 9(4):115–126.

Prakash, J.; Arora, N.K. (2021). Novel metabolites from *Bacillus safensis* and their antifungal property against *Alternaria alternata*. **Antonie van Leeuwenhoek** 114, 1245–1258.

Promega Brasil. **Wizard® Genomic DNA Purification Kit** – Protocolo. Disponível em

<https://www.promega.com.br/products/nucleic-acid-extraction/genomic-dna/wizard-genomic-dna-purification-kit/?catNum=A1120>. Acesso em 04 de fevereiro de 2023.

Promega Brasil. **Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System** - Protocolo. Disponível em <https://www.promega.com.br/products/nucleic-acid-extraction/clean-up-and-concentration/wizard-sv-gel-and-pcr-clean-up-system/?catNum=A9281>. Acesso em 04 de fevereiro de 2023.

Raij, B. van; Andrade, J.C. de; Cantarella, H.; Quaggio, J.A. (2001). Análise Química para Avaliação da Fertilidade de Solos Tropicais. **Instituto Agrônomo de Campinas**, 285p.

Raza, W. et al. (2016). Volatile organic compounds produced by *Pseudomonas fluorescens* WR-1 restrict the growth and virulence traits of *Ralstonia solanacearum*. **Microbiol Res.** 192, 103–113

Renard, J.L.; Quillec, G. (1983). *Fusarium* and replanting. Elements to be considered when replanting oil palm in a *Fusarium* zone in West Africa [Ivory Coast]. **Oleaginous** 38:421-427.

Romeiro, R.S. (2007). **Controle biológico de doenças de plantas – procedimentos**. Viçosa: Ed. UFV.

Rudrappa, T. et al. (2010). The rhizobacterial elicitor acetoin induces systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. **Commun. Integr. Biol.** 3, 130–138.

Ryder, M.H.; Yan, Z.; Terrace, T.E.; Rovira, A.D.; Tang, W.; Correll, R.L. (1998). Use of strains of *Bacillus* isolated in China to suppress take-all and *Rhizoctonia* root rot, and promote seedling growth of glasshouse-grown wheat in Australian soils. **Soil Biology and Biochemistry** 31, 19-29.

Rybakova, D. et al. (2017). Guerra aérea: um diálogo volátil entre o patógeno vegetal *Verticillium longisporum* e seu antagonista *Paenibacillus polymyxa*. **Frente. Plant Sci.**8

Ryu, C.M.; Faragt, M.A.; Hu, C.H.H.; Reddy, M.S.; Wei, H.X.X.; Paré, P.W.; Kloepper, J.W. (2003). Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 100, 4927–4932.

Ryu, C.M.; Farag, M.A.; Hu, C.H.; Reddy, M.S.; Kloepper, J.W.; Pare, P.W. (2004). Bacterial volatiles induced resistance in *Arabidopsis*. **Plant Physiol.** 2004, 134, 1017–1026.

Saitou, N.; Nei, M. (1987). The Neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol. Evol.** 4:406-425.

Sanchez-Lopez, A. M. et al. (2016). Volatile compounds emitted by diverse phytopathogenic microorganisms promote plant growth and flowering through cytokinin action. **Plant Cell Environ.** 39, 2592–2608.

Sangiorgio, D. et al. (2020). Facing climate change: application of microbial biostimulants to mitigate stress in horticultural crops. **Agronomy** 10, 794.

Santoro, M.V. et al. (2011). Volatile organic compounds from rhizobacteria increase biosynthesis of essential oils and growth parameters in peppermint (*Mentha piperita*). **Plant Physiol. Biochem.** 49, 1177–1182.

Santos, H. G. dos; Jacomine, P. K. T.; Anjos, L. H. C. dos; Oliveira, V. A. de; Lumberras, J. F.; Coelho, M. R.; Almeida, J. A. de; Araujo Filho, J. C. de; Oliveira, J. B. de; Cunha, T. J. F. (2018). Sistema Brasileiro de Classificação de Solos. Brasília, DF: **Embrapa Solos**. ISBN: 978-85-7035-817-2.

Schmidt, R., Cordovez, V., de Boer, W. et al. (2015). Volatile affairs in microbial interactions. **ISME J** 9, 2329–2335.

Schmidt, R. et al. (2017). Fungal volatile compounds induce production of the secondary metabolite sodorifen in *Serratia plymuthica* PRI-2C. **Sci. Rep.** 7, 862.

Schneider, J.H.M.; Kocks, C.G.; Schilder, M.T. (2001). Possible mechanisms influencing the dynamics of *Rhizoctonia* disease of tulips. **European Journal of Plant Pathology** 107, 723-738.

Schulz-Bohm, K.; et al. (2017a). The prey's scent — volatile organic compound mediated interactions between soil bacteria and their protist predators. **ISME J.** 11, 817–820.

Schulz-Bohm, K.; Martin-Sanchez, L.; Garbeva, P. (2017b). Microbial volatiles: small molecules with an important role in intra- and inter- kingdom interactions. **Front. Microbiol.** 8, 02484.

Schulz, S.; Dickschat, J.S.; Kunze, B.; Wagner-Dobler, I.; Diestel, R.; Sasse, F. (2010). Biological activity of volatiles from marine and terrestrial bacteria. **Mar Drugs** 8: 2976–2987.

Shabanamol, S., et al. (2021). Characterization of the major antifungal extrolite from rice endophyte *Lysinibacillus sphaericus* against *Rhizoctonia solani*. *Arch Microbiol* 203, 2605–2613.

Shabanamol, S.; Sreekumar, J.; Jisha, M.S. (2017). Bioprospecting endophytic diazotrophic *Lysinibacillus sphaericus* as biocontrol agents of rice sheath blight disease. **3 Biotech** 7(5):337.

Sharifi, R.; Ryu, C.M. (2016). Are bacterial volatile compounds poisonous odors to a fungal pathogen *Botrytis cinerea*, alarm signals to *Arabidopsis* seedlings for eliciting induced resistance, or both? **Front. Microbiol.** 7, 1–10.

Silva, D.B.H.; Jung, S.H.; Castro, O.J.V.; Ryu, C.M. (2021). C4 Bacterial Volatiles Improve Plant Health. **Pathogens.** May 31;10(6):682.

Sohrabi, M., et al. (2014). Volatile organic compounds as novel markers for the detection of bacterial infections. **Clinical Microbiology.** Vol. 3, pp. 1-6.

Solano, C.; Echeverez, M.; Lasa, I. (2014). Biofilm dispersion and quorum sensing. **Curr. Opin. Microbiol.**,18,96–104.

Song, G.C. et al. (2019). Plant growth- promoting archaea trigger induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* against *Pectobacterium carotovorum* and *Pseudomonas syringae*. **Environ. Microbiol.** 21, 940–948.

Sotero-Martins, A.; Carvajal, E.; Santo, J.A.A.; Moura, P.G.M.; Handam, N.B.; Kotowski-Filho, N.P.; Jardim, R. (2021). Eventos atrelados a geosmina e 2-metilisoborneol (2-MIB) em Manancial de Abastecimento do Estado do Rio de Janeiro, **Brasil**: estudo de caso.

Spinelli, F. et al. (2012). Emission of volatile compounds by *Erwinia amylovora*: biological activity in vitro and possible exploitation for bacterial identification. **Trees**, 26, 141–152.

Spraker, J.E. et al. (2014). Uma relação volátil: traçando um diálogo inter-reinos entre dois fitopatógenos, *Ralstonia solanacearum* e *Aspergillus flavus*. **J. Chem. Ecol.** 40, 502–513.

Stierlin, É., Nicolè, F., Fernandez, X., & Michel, T. (2019). Development of a Headspace Solid-Phase Microextraction Gas Chromatography-Mass Spectrometry Method to Study Volatile Organic Compounds (VOCs) Emitted by Lavender Roots. **Chemistry & Biodiversity**, 16, e190028.

Strobel, G.A.; Dirkse, E.; Sears, J.; Markworth, C. (2001). Volatile antimicrobials from *Muscodora albus*, a novel endophytic fungus. **Microbiology** 147: 2943–2950.

Sumner, D.R. (1996). Sclerotia formation by *Rhizoctonia* species and their survival. In: Sneh, B., Jabaji-Hare, S., Neate, S., Dijst, G. (Eds.), *Rhizoctonia* Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control. **Kluwer Academic Publications**, Dordrecht, NL, pp. 207-215.

Tahir, H.A.S. et al. (2017). Plant growth promotion by volatile organic compounds produced by *Bacillus subtilis* SYST2. **Front. Microbiol.** 8, 171.

Tamura K.; Stecher G.; Peterson D.; Filipski A.; Kumar S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution** 30: 2725-2729.

Trivedi, P.; Pandey, A. (2008). Plant growth promotion abilities and formulation of *Bacillus megaterium* strain B 388 (MTCC6521) isolated from a temperate Himalayan location. **Indian J. Microbiol.** 48(3), 342–347.

Truscott, J.E.; Gilligan, C.A. (2001). The effect of cultivation on the size, shape, and persistence of disease patches in fields. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 98, 7128-7133.

Tyc, O.; Zweers, H.; de Boer, W.; Garbeva, P. (2015). Volatiles in inter-specific bacterial interactions. **Front. Microbiol.** 6

Vaishnav, A. et al. (2016). PGPR-mediated expression of salt tolerance gene in soybean through volatiles under sodium nitroprusside. **J. Basic Microbiol.** 56, 1274–1288.

Vaishnav, A., Kumari, S., Jain, S., Varma, A. & Choudhary, D. K. (2015). Putative bacterial volatile-mediated growth in soybean (*Glycine max* L. Merrill) and expression of induced proteins under salt stress. **J. Appl. Microbiol.** 119, 539–551.

- Velázquez-Becerra, C. et al. (2011). A volatile organic compound analysis from *Arthrobacter agilis* identifies dimethylhexadecylamine, an amino-containing lipid modulating bacterial growth and *Medicago sativa* morphogenesis in vitro. **Plant Soil** 339, 329–340.
- Velázquez-Becerra, C. et al. (2013). The rhizobacterium *Arthrobacter agilis* produces dimethylhexadecylamine, a compound that inhibits growth of phytopathogenic fungi in vitro. **Protoplasma** 250, 1251–1262.
- de Vrieze, M. et al. (2015). Volatile organic compounds from native potato-associated *Pseudomonas* as potential antioomycete agents. **Front. Microbiol.** 6, 1–15.
- Venturi, V. et al. (2010). Locality versus globality in bacterial signalling: can local communication stabilize bacterial communities? **Biol. Direct** 5, 30.
- Wang, J.F. et al. (2017) Enhanced iron and selenium uptake in plants by volatile emissions of *Bacillus amyloliquefaciens* (BF06). **Appl. Sci.** 7, 85
- Verginer, M. et al. (2010). Production of volatile metabolites by grape-associated microorganisms. **J. Agric. Food Chem.** 58, 8344–8350.
- Wang, Z. et al. (2013). Fumigant activity of volatiles from *Streptomyces alboflavus* TD-1 against *Fusarium moniliforme* Sheldon. **J. Microbiol.** 51, 477–483
- Weisskopf, L.; Schulz, S.; Garbeva, P. (2021). Microbial volatile organic compounds in intra-kingdom and inter-kingdom interactions. **Nat Rev Microbiol** 19, 391–404.
- Wenke, K. et al. (2012). Volatiles of two growth-inhibiting rhizobacteria commonly engage AtWRKY18 function. **Plant J.** 70, 445–459.
- White, P.J.; Lotay, H.K. (1980). Minimal nutritional requirements of *Bacillus sphaericus* NCTC9602 and 26 other strains of this species: the majority grow and sporulate with acetate as sole major source of carbon. **J. Gen. Microbiol.** 118, 13–19.
- Wrather, J.A.; Anderson, T.R.; Arsyad, D.M.; Gai, J.; Ploper, L.D.; Porta-Puglia, A.; Ram, H.H.; Yorinori, J.T. (1997). Soybean disease loss estimates for the top 10 soybean producing countries in 1994. **Plant Disease** 81, 107-110.
- Xu, Y.Y. et al. (2015). Effect of volatile organic compounds from bacteria on nematodes. **Chem. Biodivers.** 12, 1415–1421.
- Xue, J.; Ahring, B.K. (2011). Enhancing isoprene production by genetic modification of the 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway in *Bacillus subtilis*. **Appl. Environ. Microbiol.** 77, 2399–2405.
- Yuan, J.; Raza, W.; Shen, Q.; Huang, Q. (2012). Antifungal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 volatile compounds against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. **Appl. Environ. Microbiol.** 78, pp. 5942-5944

Zhang, H. et al. (2007). Rhizobacterial volatile emissions regulate auxin homeostasis and cell expansion in *Arabidopsis*. **Planta** 226, 839–851.

Zhang, H. et al. (2009). A soil bacterium regulates plant acquisition of iron via deficiency- inducible mechanisms. **Plant J.** 58, 568–577.

Zhang, H. et al. (2008a). Soil bacteria augment *Arabidopsis* photosynthesis by decreasing glucose sensing and abscisic acid levels in planta. **Plant J.** 56, 264–273.

Zhang, H. et al. (2008b). Soil bacteria confer plant salt tolerance by tissue-specific regulation of the sodium transporter HKT1. **Mol. Plant-Microbe Interact.** 21, 737–744.

Zhang, H. et al. (2010). Choline and osmotic-stress tolerance induced in *Arabidopsis* by the soil microbe *Bacillus subtilis* (GB03). **Mol. Plant Microbe Interact.** 23, 1097–1104.

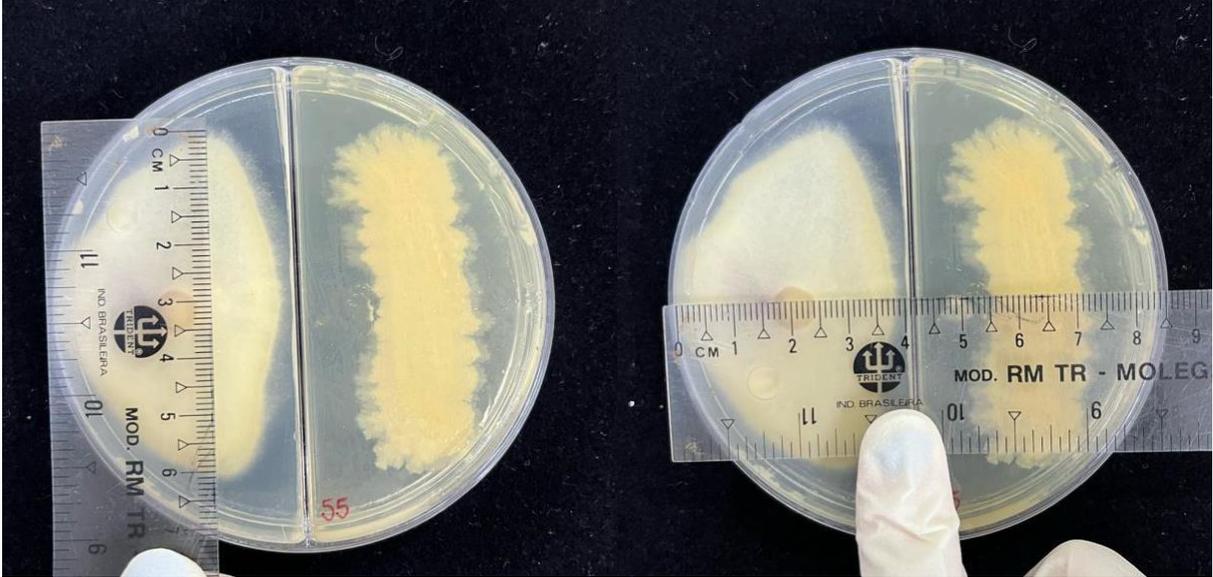
Zhang, D.; Yu, S.; Yang, Y.; Zhang, J.; Zhao, D.; Pan, Y.; Fan, S.; Yang, Z.; Zhu, J. (2020). Antifungal Effects of Volatiles Produced by *Bacillus subtilis* Against *Alternaria solani* in Potato. **Front Microbiol.** 11:1196.

Zhou, J.Y. et al. (2016). Volatiles released by endophytic *Pseudomonas fluorescens* promoting the growth and volatile oil accumulation in *Atractylodes lancea*. **Plant Physiol. Biochem.** 101, 132–140.

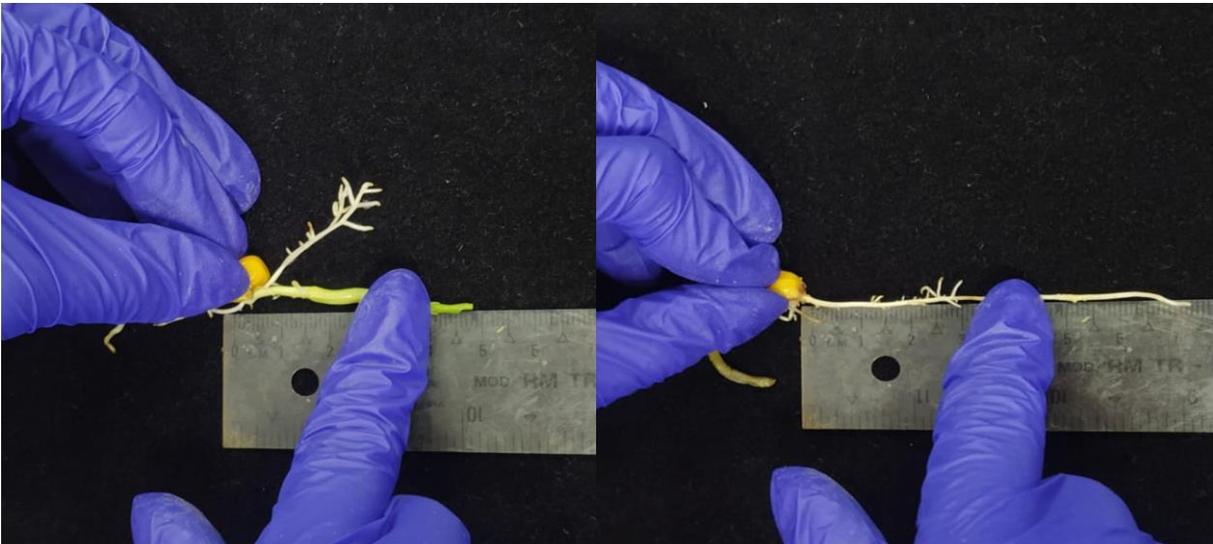
Zou, C.; Li, Z.; Yu, D. (2010). *Bacillus megaterium* strain XTBG34 promotes plant growth by producing 2-pentylfuran. **J Microbiol** 48:460–466.

APÊNDICES

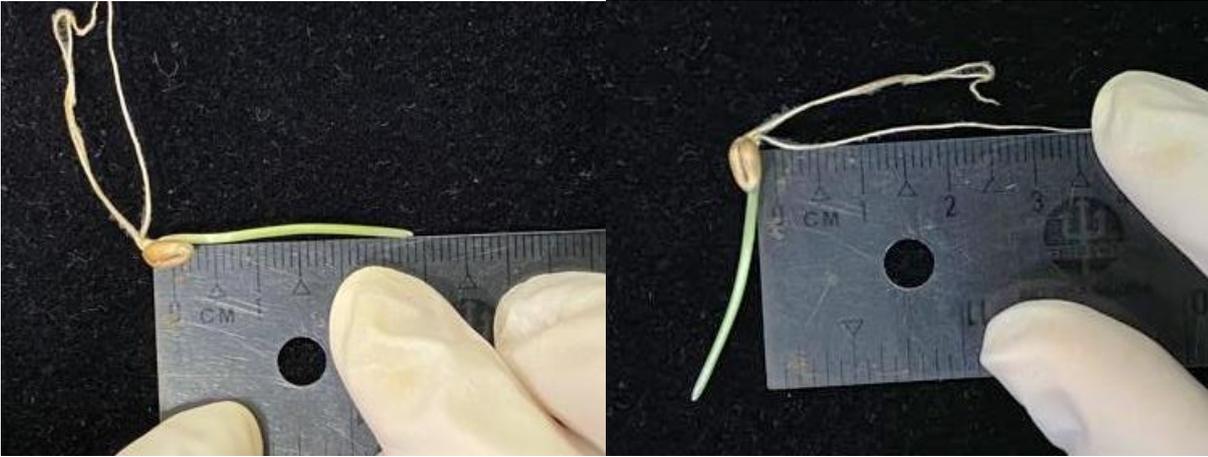
Apêndice A - Medição do crescimento do micélio de *Rhizoctonia solani* (cm) nos sentidos vertical e horizontal. Fonte: Do próprio autor (2022).



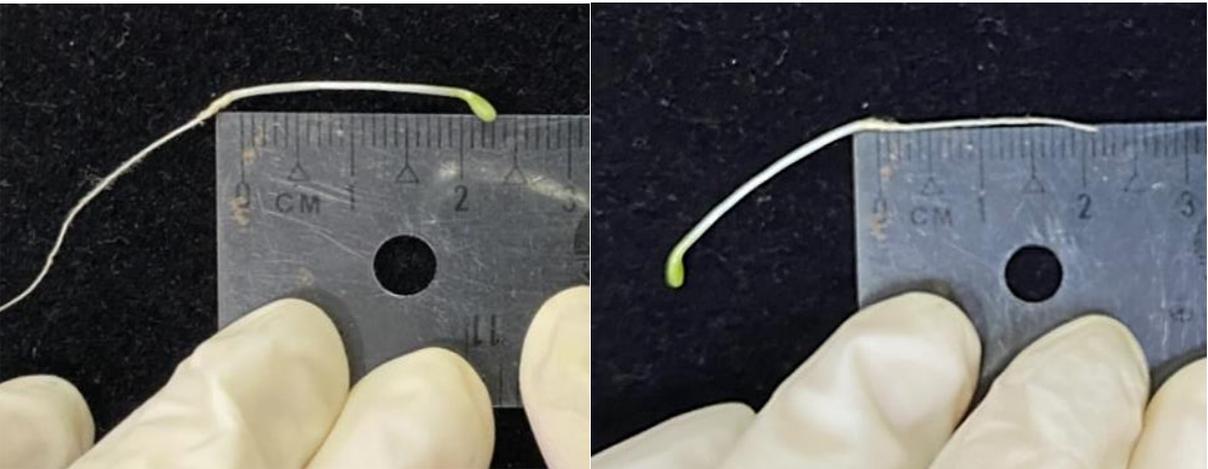
Apêndice B - Medição do comprimento de coleótilo e raiz das plântulas de milho, após 7 dias de crescimento. Fonte: Do próprio autor (2022).



Apêndice C - Medição do comprimento de coleótilo e raiz das plântulas de trigo, após 14 dias de crescimento. Fonte: Do próprio autor (2022).



Apêndice D - Medição do comprimento de hipocótilo e raiz das plântulas de alface, após 14 dias de crescimento. Fonte: Do próprio autor (2022).



Apêndice E - Resultados do parâmetro altura das plantas (em centímetros), após a desmontagem do ensaio em casa de vegetação, em ordem decrescente.

Cód. Isolado	Repetição 1	Repetição 2	Repetição 3	Média (cm)	Desvio padrão
7	9,10	9,00	8,00	8,70	0,61
26	8,00	9,30	8,20	8,50	0,70
97	10,00	7,00	7,90	8,30	1,54
114	8,50	9,90	6,50	8,30	1,71
30	7,40	8,60	8,70	8,20	0,72
69	7,50	8,90	8,30	8,20	0,70
8	8,40	8,20	8,00	8,20	0,20
31	8,50	9,10	7,00	8,20	1,08
9	8,40	8,00	8,20	8,20	0,20
5	7,70	9,00	7,70	8,10	0,75
2	9,00	8,00	7,00	8,00	1,00
52	7,40	7,70	8,90	8,00	0,79
22	7,20	8,90	7,80	8,00	0,86
137	9,00	7,30	7,40	7,90	0,95
127	8,60	8,10	7,00	7,90	0,82
10	7,40	8,50	7,70	7,90	0,57
15	7,20	8,50	7,90	7,90	0,65
3	7,90	8,00	7,60	7,80	0,21
48	7,30	9,50	6,70	7,80	1,47
67	7,00	8,10	8,40	7,80	0,74
27	7,20	7,90	8,20	7,80	0,51
33	7,50	7,80	8,00	7,80	0,25
146	7,80	8,00	7,50	7,80	0,25
29	8,70	7,60	7,00	7,80	0,86
96	8,70	6,50	8,00	7,70	1,12
51	7,50	8,40	7,20	7,70	0,62
56	8,40	6,90	7,70	7,70	0,75
71	7,90	7,00	8,00	7,60	0,55
87	7,40	7,50	8,00	7,60	0,32
11	7,60	7,20	8,00	7,60	0,40
109	7,50	8,30	7,00	7,60	0,66
129	8,00	7,80	7,00	7,60	0,53

4	8,10	6,20	8,40	7,60	1,19
122	8,30	7,90	6,50	7,60	0,95
6	7,50	7,50	7,60	7,50	0,06
46	7,50	8,00	7,10	7,50	0,45
54	8,50	7,40	6,70	7,50	0,91
116	8,50	7,70	6,40	7,50	1,06
89	6,20	8,30	8,00	7,50	1,14
95	9,00	6,40	7,10	7,50	1,35
98	7,00	8,30	7,20	7,50	0,70
120	7,40	8,70	6,30	7,50	1,20
128	7,00	7,00	8,40	7,50	0,81
32	7,70	7,45	7,20	7,50	0,25
60	7,80	7,50	7,00	7,40	0,40
66	8,30	6,00	8,00	7,40	1,25
117	6,80	8,00	7,50	7,40	0,60
106	7,20	7,50	7,50	7,40	0,17
131	8,30	6,70	7,20	7,40	0,82
13	7,20	7,20	7,70	7,40	0,29
125	7,80	7,30	7,00	7,40	0,40
73	7,90	8,00	6,10	7,30	1,07
75	7,00	7,50	7,50	7,30	0,29
18	7,40	7,30	7,20	7,30	0,10
36	6,50	7,60	7,80	7,30	0,70
91	6,70	6,70	8,40	7,30	0,98
115	6,40	6,30	9,10	7,30	1,59
134	8,30	7,00	6,40	7,20	0,97
142	7,70	7,20	6,80	7,20	0,45
12	7,40	7,00	7,20	7,20	0,20
14	8,20	6,00	7,40	7,20	1,11
68	8,30	6,80	6,50	7,20	0,96
130	6,40	7,70	7,50	7,20	0,70
132	7,20	8,00	6,40	7,20	0,80
88	7,50	7,00	6,90	7,10	0,32
135	6,40	7,50	7,50	7,10	0,64
84	7,40	7,50	6,40	7,10	0,61

94	7,00	6,80	7,50	7,10	0,36
101	7,40	7,20	6,70	7,10	0,36
112	6,90	8,00	6,40	7,10	0,82
143	6,40	7,40	7,50	7,10	0,61
25	7,30	7,90	6,00	7,10	0,97
47	6,40	7,00	7,80	7,10	0,70
74	7,70	6,50	7,00	7,10	0,60
53	7,00	6,60	7,50	7,00	0,45
64	6,00	8,60	6,50	7,00	1,38
110	6,00	6,90	8,20	7,00	1,11
86	8,40	5,70	6,80	7,00	1,36
39	8,00	6,40	6,50	7,00	0,90
41	6,50	7,20	7,20	7,00	0,40
99	7,00	6,90	7,00	7,00	0,06
111	8,00	7,30	5,50	6,90	1,29
144	7,30	5,50	7,90	6,90	1,25
Controle	8,00	7,00	5,30	6,90	1,37
20	6,50	7,70	6,50	6,90	0,69
40	7,00	7,00	6,70	6,90	0,17
21	7,00	6,20	7,40	6,90	0,61
50	6,20	7,30	7,10	6,90	0,59
139	7,70	6,40	6,50	6,90	0,72
141	6,00	7,70	6,90	6,90	0,85
147	5,80	6,90	7,90	6,90	1,05
35	6,50	7,30	6,70	6,80	0,42
65	6,80	6,00	7,70	6,80	0,85
38	7,00	6,30	7,00	6,80	0,40
83	5,50	7,40	7,30	6,70	1,07
85	6,70	6,50	7,00	6,70	0,25
124	7,20	6,70	6,30	6,70	0,45
45	6,80	6,70	6,60	6,70	0,10
79	6,40	7,00	6,70	6,70	0,30
136	6,40	6,70	7,00	6,70	0,30
113	7,50	5,50	7,00	6,70	1,04
59	6,20	6,70	7,00	6,60	0,40

133	5,70	7,00	7,00	6,60	0,75
76	6,00	7,10	6,55	6,60	0,55
61	6,50	7,00	6,00	6,50	0,50
77	7,00	5,80	6,70	6,50	0,62
121	6,20	6,00	7,30	6,50	0,70
57	6,45	6,00	6,90	6,50	0,45
62	5,50	7,30	6,40	6,40	0,90
70	6,20	6,50	6,40	6,40	0,15
82	5,80	6,50	6,80	6,40	0,51
37	6,80	5,70	6,50	6,30	0,57
108	6,00	6,50	6,50	6,30	0,29
119	5,70	6,90	6,30	6,30	0,60
17	6,50	5,00	7,40	6,30	1,21
63	6,50	6,00	6,40	6,30	0,26
16	6,40	6,00	6,20	6,20	0,20
78	6,30	6,40	5,80	6,20	0,32
138	5,30	6,20	6,90	6,10	0,80
103	6,80	5,90	5,60	6,10	0,62
19	5,50	6,30	6,40	6,10	0,49
1	5,50	4,50	8,00	6,00	1,80
126	6,50	6,00	5,50	6,00	0,50
140	5,50	6,30	6,00	5,90	0,40
123	5,80	6,00	5,90	5,90	0,10
102	5,50	4,90	7,00	5,80	1,08

Apêndice F - Resultados do parâmetro massa seca de parte aérea (em gramas), após a desmontagem do ensaio em casa de vegetação, em ordem decrescente.

Cód. Isolado	Repetição 1	Repetição 2	Repetição 3	Média (g)	Desvio padrão
113	0,650	0,400	0,760	0,603	0,184
89	0,330	0,470	0,870	0,557	0,280
78	0,420	0,680	0,530	0,543	0,131
114	0,570	0,450	0,390	0,470	0,092
82	0,370	0,650	0,370	0,463	0,162
88	0,510	0,530	0,340	0,460	0,104
69	0,370	0,360	0,430	0,387	0,038
53	0,360	0,290	0,500	0,383	0,107
29	0,300	0,460	0,380	0,380	0,080
67	0,290	0,410	0,440	0,380	0,079
31	0,370	0,300	0,440	0,370	0,070
83	0,420	0,360	0,320	0,367	0,050
129	0,320	0,440	0,330	0,363	0,067
37	0,390	0,320	0,350	0,353	0,035
87	0,360	0,300	0,400	0,353	0,050
20	0,370	0,420	0,260	0,350	0,082
15	0,320	0,330	0,380	0,343	0,032
61	0,410	0,290	0,330	0,343	0,061
66	0,300	0,440	0,290	0,343	0,084
68	0,340	0,400	0,290	0,343	0,055
112	0,320	0,230	0,480	0,343	0,127
123	0,250	0,330	0,440	0,340	0,095
101	0,360	0,330	0,320	0,337	0,021
40	0,440	0,240	0,320	0,333	0,101
62	0,260	0,440	0,300	0,333	0,095
71	0,360	0,290	0,350	0,333	0,038
60	0,340	0,440	0,210	0,330	0,115
33	0,430	0,320	0,230	0,327	0,100
142	0,380	0,320	0,280	0,327	0,050
57	0,300	0,340	0,320	0,320	0,020
65	0,450	0,210	0,300	0,320	0,121
111	0,310	0,470	0,180	0,320	0,145

124	0,260	0,340	0,360	0,320	0,053
Controle	0,270	0,320	0,360	0,282	0,045
8	0,320	0,310	0,320	0,317	0,006
36	0,310	0,320	0,320	0,317	0,006
26	0,250	0,290	0,390	0,310	0,072
122	0,340	0,360	0,230	0,310	0,070
56	0,330	0,270	0,310	0,303	0,031
59	0,270	0,270	0,370	0,303	0,058
14	0,400	0,220	0,290	0,303	0,091
79	0,290	0,270	0,340	0,300	0,036
17	0,320	0,320	0,260	0,300	0,035
5	0,260	0,310	0,320	0,297	0,032
18	0,250	0,340	0,300	0,297	0,045
116	0,370	0,290	0,230	0,297	0,070
54	0,360	0,250	0,270	0,293	0,059
51	0,250	0,300	0,320	0,290	0,036
143	0,300	0,230	0,340	0,290	0,056
16	0,320	0,290	0,260	0,290	0,030
95	0,370	0,240	0,260	0,290	0,070
99	0,290	0,310	0,270	0,290	0,020
125	0,270	0,360	0,240	0,290	0,062
10	0,300	0,290	0,270	0,287	0,015
11	0,280	0,290	0,290	0,287	0,006
91	0,330	0,270	0,260	0,287	0,038
106	0,250	0,270	0,340	0,287	0,047
137	0,330	0,220	0,310	0,287	0,059
94	0,330	0,250	0,270	0,283	0,042
126	0,330	0,270	0,250	0,283	0,042
144	0,320	0,230	0,300	0,283	0,047
98	0,290	0,320	0,240	0,283	0,040
39	0,230	0,300	0,300	0,277	0,040
110	0,200	0,310	0,320	0,277	0,067
115	0,230	0,230	0,370	0,277	0,081
4	0,260	0,270	0,290	0,273	0,015
12	0,270	0,260	0,290	0,273	0,015

46	0,280	0,280	0,260	0,273	0,012
138	0,230	0,310	0,280	0,273	0,040
6	0,290	0,290	0,240	0,273	0,029
47	0,250	0,350	0,220	0,273	0,068
45	0,270	0,310	0,230	0,270	0,040
48	0,270	0,240	0,300	0,270	0,030
52	0,290	0,250	0,270	0,270	0,020
77	0,280	0,300	0,230	0,270	0,036
103	0,310	0,250	0,250	0,270	0,035
21	0,240	0,270	0,290	0,267	0,025
50	0,300	0,230	0,270	0,267	0,035
86	0,230	0,300	0,270	0,267	0,035
97	0,280	0,290	0,230	0,267	0,032
140	0,270	0,280	0,250	0,267	0,015
141	0,270	0,280	0,250	0,267	0,015
27	0,260	0,230	0,300	0,263	0,035
127	0,270	0,280	0,240	0,263	0,021
128	0,230	0,260	0,300	0,263	0,035
146	0,270	0,250	0,270	0,263	0,012
2	0,270	0,220	0,290	0,260	0,036
76	0,280	0,250	0,250	0,260	0,017
102	0,280	0,280	0,220	0,260	0,035
117	0,250	0,240	0,290	0,260	0,026
130	0,270	0,240	0,270	0,260	0,017
22	0,270	0,210	0,290	0,257	0,042
35	0,230	0,300	0,240	0,257	0,038
121	0,220	0,270	0,280	0,257	0,032
74	0,270	0,260	0,230	0,253	0,021
75	0,270	0,230	0,260	0,253	0,021
139	0,250	0,250	0,260	0,253	0,006
13	0,200	0,280	0,270	0,250	0,044
96	0,280	0,220	0,250	0,250	0,030
119	0,250	0,250	0,250	0,250	0,000
134	0,250	0,270	0,230	0,250	0,020
3	0,240	0,260	0,240	0,247	0,012

7	0,230	0,250	0,260	0,247	0,015
9	0,220	0,260	0,260	0,247	0,023
70	0,240	0,230	0,270	0,247	0,021
73	0,230	0,280	0,230	0,247	0,029
131	0,270	0,200	0,270	0,247	0,040
85	0,260	0,220	0,250	0,243	0,021
108	0,270	0,200	0,260	0,243	0,038
136	0,250	0,240	0,240	0,243	0,006
132	0,270	0,210	0,240	0,240	0,030
30	0,270	0,250	0,190	0,237	0,042
64	0,220	0,230	0,250	0,233	0,015
84	0,220	0,220	0,260	0,233	0,023
147	0,230	0,210	0,260	0,233	0,025
32	0,270	0,190	0,230	0,230	0,040
38	0,250	0,230	0,210	0,230	0,020
135	0,220	0,180	0,290	0,230	0,056
63	0,220	0,210	0,250	0,227	0,021
109	0,240	0,190	0,240	0,223	0,029
25	0,240	0,150	0,270	0,220	0,062
41	0,220	0,200	0,240	0,220	0,020
120	0,190	0,230	0,240	0,220	0,026
133	0,180	0,240	0,200	0,207	0,031
19	0,210	0,190	0,210	0,203	0,012
1	0,110	0,140	0,180	0,143	0,035

Apêndice G - Resultados do parâmetro massa seca de raiz (em gramas), após a desmontagem do ensaio em casa de vegetação, em ordem decrescente.

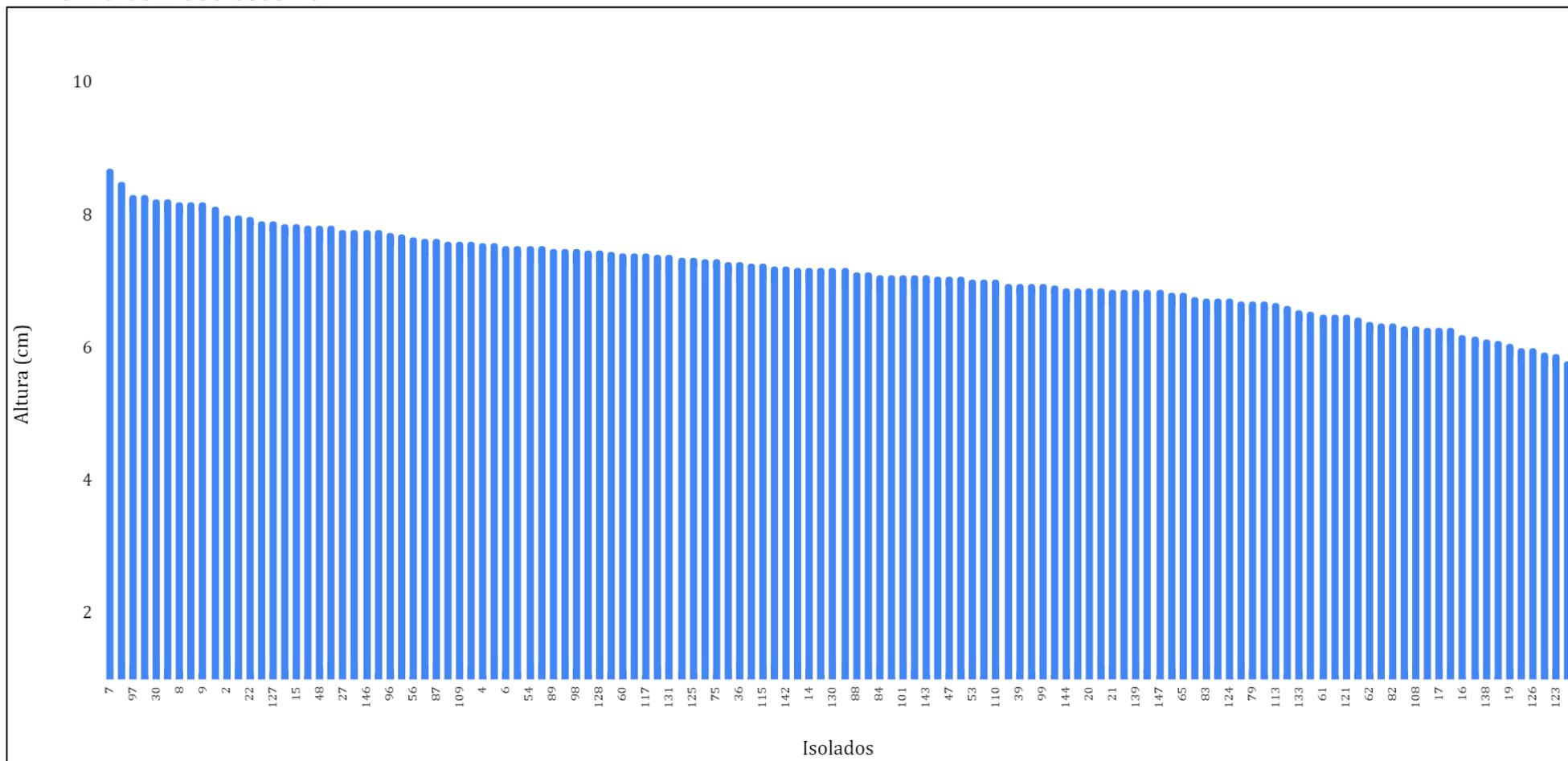
Cód. Isolado	Repetição 1	Repetição 2	Repetição 3	Média (g)	Desvio padrão
43	0,494	0,780	0,759	0,680	0,159
35	0,393	0,666	0,515	0,520	0,137
61	0,570	0,420	0,530	0,510	0,078
62	0,480	0,530	0,510	0,510	0,025
63	0,530	0,580	0,410	0,510	0,087
64	0,490	0,420	0,570	0,490	0,075
65	0,580	0,430	0,470	0,490	0,078
66	0,410	0,590	0,470	0,490	0,092
39	0,389	0,668	0,400	0,490	0,158
67	0,440	0,530	0,470	0,480	0,046
68	0,570	0,460	0,400	0,480	0,086
69	0,530	0,400	0,490	0,470	0,067
70	0,460	0,400	0,540	0,470	0,070
71	0,570	0,330	0,460	0,450	0,120
72	0,470	0,430	0,450	0,450	0,020
73	0,720	0,250	0,370	0,450	0,244
74	0,400	0,470	0,460	0,440	0,038
75	0,430	0,540	0,350	0,440	0,095
41	0,377	0,438	0,499	0,440	0,061
76	0,400	0,440	0,460	0,430	0,031
77	0,480	0,390	0,420	0,430	0,046
78	0,320	0,450	0,520	0,430	0,101
79	0,420	0,460	0,400	0,430	0,031
80	0,420	0,440	0,410	0,420	0,015
81	0,380	0,400	0,490	0,420	0,059
82	0,460	0,390	0,410	0,420	0,036
83	0,430	0,540	0,280	0,420	0,131
84	0,460	0,420	0,360	0,410	0,050
85	0,510	0,390	0,320	0,410	0,096
86	0,400	0,480	0,340	0,410	0,070
87	0,440	0,480	0,290	0,400	0,100
88	0,470	0,330	0,400	0,400	0,070

89	0,390	0,510	0,300	0,400	0,105
90	0,270	0,440	0,460	0,390	0,104
46	0,409	0,400	0,359	0,390	0,027
91	0,310	0,230	0,610	0,380	0,200
19	0,293	0,439	0,410	0,380	0,077
92	0,360	0,430	0,350	0,380	0,044
93	0,490	0,270	0,380	0,380	0,110
94	0,380	0,320	0,430	0,380	0,055
58	0,389	0,290	0,447	0,380	0,079
95	0,320	0,460	0,330	0,370	0,078
36	0,309	0,432	0,368	0,370	0,062
96	0,320	0,340	0,440	0,370	0,064
97	0,270	0,260	0,550	0,360	0,165
37	0,512	0,352	0,215	0,360	0,149
98	0,390	0,370	0,300	0,350	0,047
99	0,440	0,270	0,350	0,350	0,085
100	0,400	0,300	0,360	0,350	0,050
33	0,383	0,317	0,350	0,350	0,033
32	0,373	0,456	0,211	0,350	0,125
101	0,410	0,280	0,340	0,340	0,065
102	0,390	0,300	0,340	0,340	0,045
103	0,280	0,310	0,420	0,340	0,074
104	0,320	0,380	0,310	0,340	0,038
17	0,410	0,282	0,304	0,330	0,068
31	0,220	0,320	0,452	0,330	0,116
56	0,268	0,331	0,393	0,330	0,063
42	0,224	0,437	0,330	0,330	0,107
105	0,290	0,360	0,340	0,330	0,036
106	0,250	0,320	0,400	0,320	0,075
107	0,320	0,350	0,300	0,320	0,025
20	0,343	0,324	0,300	0,320	0,022
59	0,293	0,400	0,259	0,320	0,074
55	0,255	0,298	0,398	0,320	0,073
108	0,250	0,360	0,340	0,320	0,059
109	0,320	0,330	0,300	0,320	0,015

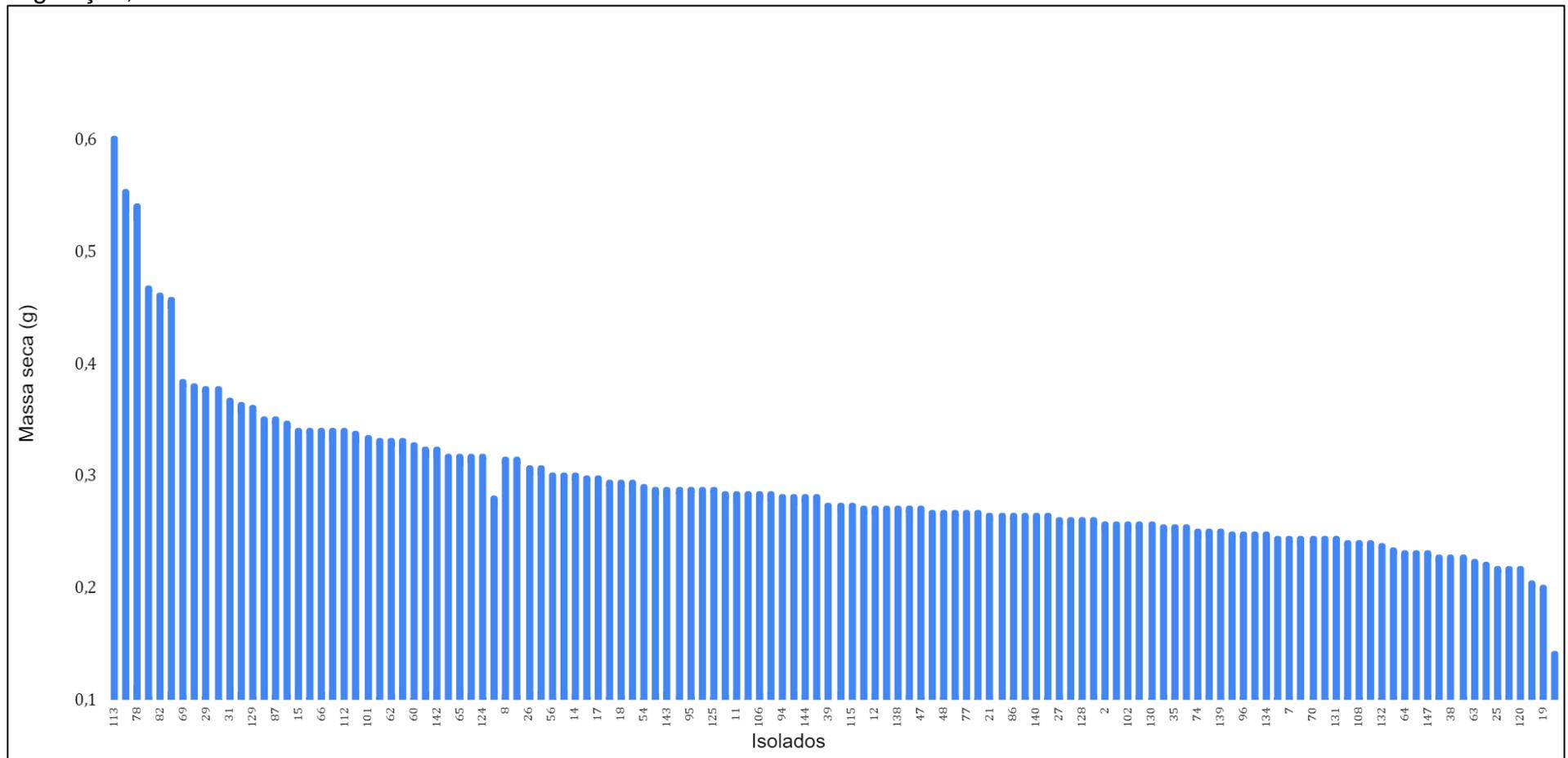
48	0,329	0,315	0,303	0,320	0,013
34	0,306	0,310	0,315	0,310	0,005
110	0,340	0,340	0,250	0,310	0,052
111	0,260	0,420	0,250	0,310	0,095
9	0,348	0,278	0,298	0,310	0,036
38	0,204	0,369	0,343	0,310	0,089
45	0,365	0,302	0,240	0,300	0,063
4	0,288	0,263	0,345	0,300	0,042
54	0,390	0,207	0,299	0,300	0,092
24	0,304	0,294	0,284	0,290	0,010
3	0,307	0,256	0,318	0,290	0,033
27	0,286	0,353	0,236	0,290	0,059
1	0,446	0,163	0,262	0,290	0,144
44	0,169	0,290	0,410	0,290	0,121
Controle	0,348	0,314	0,204	0,290	0,075
112	0,260	0,270	0,330	0,290	0,038
5	0,263	0,300	0,297	0,290	0,021
113	0,270	0,300	0,280	0,280	0,015
114	0,340	0,270	0,240	0,280	0,051
16	0,267	0,261	0,321	0,280	0,033
10	0,322	0,255	0,266	0,280	0,036
29	0,310	0,334	0,199	0,280	0,072
2	0,236	0,324	0,280	0,280	0,044
115	0,210	0,320	0,310	0,280	0,061
116	0,200	0,290	0,350	0,280	0,075
14	0,338	0,224	0,277	0,280	0,057
8	0,332	0,246	0,256	0,280	0,047
60	0,299	0,279	0,256	0,280	0,022
117	0,240	0,230	0,360	0,280	0,072
118	0,280	0,270	0,270	0,270	0,006
40	0,136	0,406	0,270	0,270	0,135
119	0,270	0,330	0,210	0,270	0,060
120	0,340	0,200	0,270	0,270	0,070
51	0,323	0,208	0,267	0,270	0,058
7	0,348	0,230	0,220	0,270	0,071

15	0,268	0,270	0,256	0,260	0,008
52	0,229	0,291	0,274	0,260	0,032
30	0,250	0,264	0,274	0,260	0,012
47	0,213	0,244	0,331	0,260	0,061
22	0,218	0,182	0,382	0,260	0,107
53	0,249	0,138	0,393	0,260	0,128
121	0,230	0,230	0,320	0,260	0,052
49	0,321	0,200	0,256	0,260	0,061
23	0,180	0,339	0,255	0,260	0,080
122	0,210	0,340	0,210	0,250	0,075
12	0,205	0,310	0,224	0,250	0,056
123	0,340	0,110	0,280	0,240	0,119
6	0,117	0,248	0,359	0,240	0,121
124	0,240	0,210	0,260	0,240	0,025
13	0,215	0,135	0,359	0,240	0,114
26	0,262	0,220	0,223	0,240	0,023
28	0,187	0,249	0,257	0,230	0,038
50	0,158	0,288	0,223	0,220	0,065
57	0,122	0,217	0,321	0,220	0,100
18	0,178	0,262	0,212	0,220	0,042
25	0,140	0,215	0,290	0,220	0,075
11	0,249	0,209	0,170	0,210	0,040
125	0,190	0,210	0,220	0,210	0,015
21	0,181	0,208	0,194	0,190	0,014

Apêndice H - Resultados do parâmetro altura de plantas (em centímetros), após a desmontagem do ensaio em casa de vegetação, em ordem decrescente.



Apêndice I - Resultados do parâmetro massa seca de parte aérea (em gramas), após a desmontagem do ensaio em casa de vegetação, em ordem decrescente.



Apêndice J - Resultados do parâmetro massa seca de raiz (em gramas), após a desmontagem do ensaio em casa de vegetação, em ordem decrescente.

