

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA**

Gisele de Fátima Dias Diniz

**BIOCONTROLE DE *FUSARIUM VERTICILLIOIDES* E PROMOÇÃO DE  
CRESCIMENTO DE MILHO POR BACTÉRIAS ISOLADAS DE MILHO E SORGO**

Belo Horizonte  
2022

Gisele de Fátima Dias Diniz

**BIOCONTROLE DE *FUSARIUM VERTICILLIOIDES* E PROMOÇÃO DE  
CRESCIMENTO DE MILHO POR BACTÉRIAS ISOLADAS DE MILHO E SORGO**

**Versão final**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dra. Vera Lúcia dos Santos

Coorientadora: Dra. Christiane Abreu O. Paiva

Belo Horizonte  
2022

043

Diniz, Gisele de Fátima Dias.

Biocontrole de *Fusarium verticillioides* e promoção de crescimento de milho por bactérias isoladas de milho e sorgo [manuscrito] / Gisele de Fátima Dias Diniz. – 2022.

165 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dra. Vera Lúcia dos Santos. Coorientadora: Dra. Christiane Abreu O. Paiva.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Bacillus. 3. Pseudomonas. 4. Paenibacillus. 5. Produtos Biológicos. 6. Fusariose. 7. Zea mays. I. Santos, Vera Lúcia dos. II. Paiva, Christiane Abreu Oliveira. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

#### ATA DE DEFESA DE TESE

#### ATA DA DEFESA DE TESE DE GISELE DE FÁTIMA DIAS DINIZ

Nº REGISTRO: **2018714494**

Às 13:30 horas do dia **19 de dezembro de 2022**, reuniu-se, por via remota, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Nalu Teixeira de Aguiar Peres (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG), Maria Aparecida de Resende Stoianoff (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG), Dagma Dónisia da Silva (Embrapa Milho e Sorgo), Dr. Frederick Mendes Aguiar (Embrapa Milho e Sorgo), Profa. Dra. Vera Lúcia dos Santos (Orientadora) e a Dra. Christiane Abreu Oliveira Paiva (Coorientadora), para julgar o trabalho final **“Biocontrole de *Fusarium verticillioides* e promoção de crescimento de milho por bactérias isoladas de milho e sorgo”** da aluna **Gisele de Fátima Dias Diniz**, requisito final para a obtenção do Grau de **DOCTORA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Dra. Vera Lúcia dos Santos, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. A candidata tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da tese ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Belo Horizonte, 19 de dezembro de 2022

Membros da Banca:

Profa. Dra. Nalu Teixeira de Aguiar Peres

Profa. Dra. Maria Aparecida de Resende Stoianoff

Profa. Dra. Dagma Dónisia da Silva

Prof. Dr. Frederick Mendes Aguiar

De acordo:

Profa. Dra. Vera Lúcia dos Santos

(Orientadora)

Dra. Christiane Abreu Oliveira Paiva

(Coorientadora)

Profa. Dra. Daniele da Glória de Souza

(*Coordenadora do Programa de Pós-graduação  
em Microbiologia*)



Documento assinado eletronicamente por **Dagma Dionísia da Silva, Usuário Externo**, em 20/12/2022, às 12:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Nalu Teixeira de Aguiar Peres, Professora do Magistério Superior**, em 20/12/2022, às 12:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vera Lucia dos Santos, Servidor(a)**, em 20/12/2022, às 13:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniele da Glória de Souza, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 21/12/2022, às 10:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria Aparecida de Resende Stoianoff, Professora Magistério Superior - Voluntária**, em 03/01/2023, às 14:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Christiane Abreu de Oliveira Paiva, Usuária Externa**, em 10/03/2023, às 14:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Frederick Mendes Aguiar, Usuário Externo**, em 04/04/2023, às 11:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1915537** e o código CRC **ABE641C4**.

## AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Vera e coorientadora Christiane por acreditarem em mim e me acolherem tão bem. Agradeço imensamente pelos conhecimentos transmitidos durante à execução desse trabalho. Sou muito grata a vocês por essa oportunidade e por terem contribuído tanto para o meu crescimento profissional e pessoal.

À Universidade Federal de Minas Gerais e a todos os professores que contribuíram para minha formação acadêmica com qualidade e excelência de ensino.

Aos meus pais Maria e Paulo pelos cuidados e amor em todos os momentos.

À Embrapa Milho e Sorgo e a Universidade Federal de Minas Gerais por me concederem o suporte necessário para o desenvolvimento desse trabalho.

A todos os amigos do Laboratório de Microbiologia dos Solos: Vitória, Talles, Victor, Felipe, Mikaely, Fernanda, Denise, Fabi, Renata, Carol, Daniel, Micaele, Thais, Ibrahim e Gui. Agradeço por toda ajuda e por estarem sempre ao meu lado me apoiando ao longo de todo esse trabalho. Vocês foram essenciais para tornar todo o processo mais leve e divertido.

Ao Ubiraci Lana, a Sylvia Morais e aos estudantes do Núcleo de Biologia Molecular pela grande ajuda com os trabalhos de sequenciamento e análise do genoma.

A Maria Lúcia, ao Kirley e a Sheila pela colaboração e ajuda com os trabalhos de cromatografia.

Ao José Edson e ao Ivanildo pelos ensinamentos e trocas que foram essenciais para esse trabalho.

A todos do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Milho e Sorgo: Dr. Luciano, Dra. Dagma e ao Felipe pelo auxílio e pelas valiosas sugestões.

Aos técnicos de campo Reinaldo e Dênio pelo apoio na condução dos trabalhos de casa de vegetação e campo.

Ao CNPq pela concessão da bolsa e à Simbiose pelo apoio financeiro.

À banca examinadora Dra. Maria Aparecida, Dra. Dagma Dionísia, Dra. Nalu Teixeira e ao Dr. Fred por aceitarem o convite e por cederem seu tempo na contribuição do meu trabalho.

A todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho e para o meu crescimento profissional e pessoal.

A Deus por sempre estar presente me indicando a direção correta para que fosse possível essa realização. Agradeço a Ele por colocar todas essas pessoas ao longo do meu caminho.

Muito obrigada.

## Resumo

Nos últimos anos, mudanças nos sistemas de cultivo para melhorar a produção agrícola, favoreceram o aumento na ocorrência e severidade de doenças e o uso intensivo de fungicidas para o controle de fitopatógenos. Contudo, o uso indiscriminado de fungicidas pode afetar negativamente o meio ambiente e aumentar a resistência dos patógenos. Além disso, para alguns casos, como *Fusarium verticillioides*, não existem fungicidas químicos eficazes para o controle do fungo. *Fusarium verticillioides* é considerado um dos principais patógenos do milho. Este patógeno pode causar perdas de sementes, morte de plântulas, podridão do colmo, podridão de raiz e espiga e danos aos grãos armazenados. Além disso, *F. verticillioides* produz fumonisinas e micotoxinas nocivas a humanos e animais, que são obstáculos ao comércio internacional. A dificuldade do controle fúngico tem estimulado pesquisas envolvendo o manejo integrado de doenças, sendo o controle biológico uma estratégia viável com potencial de aproveitamento e sustentável. Além disso, algumas bactérias antagonistas de fungos também podem desempenhar funções como promotores de crescimento de plantas. Assim, esses organismos são candidatos ideais para o desenvolvimento de bioprodutos. Neste estudo, três bactérias isoladas de milho e duas isoladas do sorgo foram avaliadas como candidatas para o controle biológico de fungos patogênicos do milho e promotoras de crescimento vegetal. Testes preliminares de seleção *in vitro* mostraram a atividade antagônica dessas bactérias contra importantes fitopatógenos da cultura do milho. O sequenciamento genômico revelou que as cepas bacterianas pertencem às espécies *Bacillus velezensis* (LIS05, IM14 e CT02), *Paenibacillus ottowii* (LIS04) e *Pseudomonas aeruginosa* (IPR45). A análise dos filtrados bacterianos por UPLC-MS e a análise genômica revelaram que diferentes metabólitos antifúngicos inibiram o crescimento de *Fusarium verticillioides*, sendo eles, iturina, fengicina e surfactina (*B. velezensis*), quinolona e ramnolipídio (*P. aeruginosa*) e polimixina (*P. ottowii*). Além disso, a análise do genoma dos cinco isolados revelou outros genes envolvidos na síntese de metabólitos bioativos. O potencial dessas linhagens como agentes de biocontrole e promotoras de crescimento vegetal foi validado por experimentos em casa de vegetação e em campo. Sob condições controladas, utilizando isolados individualmente ou em combinação com outras bactérias ou fungicidas químicos, os tratamentos favoreceram a melhoria da germinação de sementes, altura de planta, diâmetro de caule, matéria seca de planta e matéria seca de raiz. Nas avaliações de campo, todos os isolados, individualmente ou em combinação, foram eficientes na redução da podridão do colmo causada por *F. verticillioides*. Os tratamentos

com duas bactérias ou bactérias mais fungicidas preveniram eficientemente as perdas de produtividade das plantas inoculadas com *F. verticillioides*. Além disso, essas bactérias selecionadas apresentaram características *in vitro* para promoção do crescimento vegetal, que foram confirmadas por testes em casa de vegetação. A combinação de dois isolados de *B. velezensis* (CT02 + IM14) promoveu aumentos de 18,1% na altura da planta, 15,1% no diâmetro do caule, 44% na massa seca da parte aérea MSPA, 72,4% na massa seca das raízes MSR e 46,8% na massa seca total. Este trabalho apresenta resultados sobre como os microrganismos selecionados controlam os fitopatógenos e a proporção do efeito protetor da bactéria antagonista no controle de *F. verticillioides*. Além disso, os resultados abrem novas perspectivas para o uso dessas bactérias no desenvolvimento de biofungicidas multifuncionais.

**Palavras-chave:** *Bacillus* sp. *Pseudomonas* sp. *Paenibacillus* sp. Bioprodutos. Fusariose. Milho.



## Abstract

In recent years, changes in cropping systems to improve agricultural production have favored an increase in the occurrence and severity of diseases and the intensive use of fungicides to control phytopathogens. However, the indiscriminate use of fungicides can negatively affect the environment and increase pathogen resistance. Furthermore, in some cases, such as *Fusarium verticillioides*, there are no effective chemical fungicides to control the fungus. *Fusarium verticillioides* is considered one of the primary pathogens of maize. This pathogen can cause seed losses, seedling death, stem rot, root and ear rot, and damages to stored grains. In addition, *F. verticillioides* produces fumonisins and mycotoxins harmful to humans and animals, which are obstacles to international trade. The difficulty of fungal control has stimulated research involving integrated disease management, with biological control being a feasible strategy with the potential for advantageous and sustainable use. Furthermore, some fungi-antagonistic bacteria may also perform functions like plant growth promoters. Thus, these organisms are ideal candidates for developing bioproducts. In this study, three bacteria isolated from maize and two isolated from sorghum were evaluated as candidates for biological control of maize pathogenic fungi and plant growth promoters. Preliminary tests *in vitro* showed the antagonistic activity of these bacteria against important pathogenic fungi of maize crops. Genomic sequencing revealed that the bacterial strains belong to the *Bacillus velezensis* species (LIS05, IM14, and CT02), *Paenibacillus ottowii* (LIS04), and *Pseudomonas aeruginosa* (IPR45). Analysis of bacterial filtrates by UPLC-MS and genomic analysis revealed that different antifungal metabolites inhibited the growth of *Fusarium verticillioides*, namely, iturin, fengycin, and surfactin (*B. velezensis*), quinolone and rhamnolipid (*P. aeruginosa*) and polymyxin (*P. ottowii*). Furthermore, the five isolates' genome analysis revealed other genes involved in synthesizing bioactive metabolites. The potential of these strains as biocontrol agents and plant growth promoters was validated by greenhouse and field experiments. Under controlled conditions, using isolates, individually or in combination with other bacteria or chemical fungicides, the treatments favored the improvement of seed germination, plant height, stalk diameter, plant dry matter, and root dry matter. In field evaluations, all isolates, individually or in combination, were efficient in reducing the stalk rot caused by *F. verticillioides*. The treatments using two bacteria or bacteria plus fungicides efficiently prevented yield losses by plants inoculated with *F. verticillioides*. Furthermore, these selected bacteria showed *in vitro* characteristics for plant growth promotion, which were confirmed by

greenhouse tests. The combination of two *B. velezensis* isolates (CT02 + IM14) promoted increases of 18.1% in plant height, 15.1% in stem diameter, 44% in shoot dry mass MSPA, 72, 4% in the dry mass of MSR roots, and 46.8% in the total dry mass. This work presents results concerning how the selected microorganisms control phytopathogens and the proportion of the plant-protective effect of the antagonistic bacteria in controlling *F. verticillioides*. In addition, the results open new perspectives for using these bacteria to develop multifunctional biofungicides.

**Keywords:** *Bacillus* sp. *Pseudomonas* sp. *Paenibacillus* sp. Bioproducts. Fusariosis. Maize.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Sementes de sorgo coletadas em plantas de cerrado, com diferentes graus de infecção de bactérias ou fungos filamentosos .....	29
Figura 2 - Efeito dos isolados antagonistas na produção de pigmentos escuros pelos fitopatógenos .....	46
Figura 3 - A) Porcentagem de variância explicada pelas cinco PCs. A linha azul mostra a variância explicada por cada PC individualmente, enquanto a linha verde mostra a variância acumulada. B) PC1 x PC2 escores da análise quimiométrica de bactérias isoladas de sementes de sorgo. As áreas sombreadas indicam as regiões de confiança de 95% .....	58
Figura 4 - HCA-Heat map da análise quimiométrica de bactérias isoladas de sementes de sorgo.....	60
Figura 5 - Escores 3D de PLS-DA. A discriminação foi caracterizada por 72,4% para LV1, 10,8% para LV2 e 8% para LV3.....	61
Figura 6 - Gráfico de validação cruzada pelo método <i>leave-one-out cross-validation</i> (LOOCV) aplicado em dados de análise discriminante de mínimos quadrados parciais (PLS-DA) .....	61
Figura 7 - VIP escores dos compostos discriminantes entre os extratos bacterianos .....	62
Figura 8 - Classificação funcional de genes dos isolados do gênero <i>Bacillus</i> LIS05, IM14, CT02, de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (IPR45) e de <i>Paenibacillus</i> sp. (LIS04).....	64
Figura 9 - Árvore filogenética do genoma completo de isolados do gênero <i>Bacillus</i> CT02, IM14 e LIS05 .....	72
Figura 10 - Árvore filogenética <i>Paenibacillus ottowii</i> LIS04.....	72
Figura 11 - Árvore filogenética <i>Pseudomonas aeruginosa</i> IPR45 .....	73
Figura 12 - Teste <i>in vitro</i> de compatibilidade entre os isolados pertencentes as espécies <i>Paenibacillus ottowii</i> LIS04, <i>Bacillus velezensis</i> IM14, CT02 e LIS05 e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> IPR45.. ..	74
Figura 13 - Teste <i>in vitro</i> de compatibilidade entre os isolados e o fungicida Fludioxonil + Metalaxyl-M.....	75
Figura 14 - Efeito da inoculação dos isolados na redução da podridão-do-colmo causada por <i>Fusarium verticillioides</i> em milho. ....	86
Figura 15 - Exemplos de detecção <i>in vitro</i> dos parâmetros de promoção de crescimento de plantas pelos isolados. ....	88
Figura 16 - Avaliação da promoção de crescimento do milho pelos isolados em casa de vegetação.....	93

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais metabólitos solúveis produzidos por bactérias do gênero <i>Bacillus</i> sp., de <i>Paenibacillus polymyxa</i> e de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> envolvidos no controle de doenças de plantas causadas por fungos .....	21
Tabela 2 - Principais compostos orgânicos voláteis produzidos por bactérias do gênero <i>Bacillus</i> sp., de <i>Paenibacillus polymyxa</i> e de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> envolvidos no controle de doenças de plantas causadas por fungos.....	22
Tabela 3 - Bactérias isoladas de estigma de milho depositadas na Coleção de Microrganismos da Embrapa Milho e Sorgo (CMMF).....	28
Tabela 4 - Cepas bacterianas utilizadas para a análise filogenética.....	35
Tabela 5 - Zona de inibição (ZI%) do crescimento <i>in vitro</i> de cinco fitopatógenos pelas bactérias antagonistas em comparação ao crescimento na placa controle (placas contendo somente o fitopatógeno) .....	45
Tabela 6 - Percentual de inibição de <i>Fusarium verticillioides</i> por diferentes concentrações dos extratos brutos dos isolados bacterianos crescidos em meios TSB, BD, LB+G e Landy.....	48
Tabela 7 - Menores concentrações dos extratos brutos bacterianos necessárias para reduzir pelo menos 50% do crescimento de <i>Fusarium verticillioides</i> no teste de microdiluição em placa..	49
Tabela 8 - Identificação química dos lipopeptídeos de <i>Bacillus velezensis</i> IM14 em meio Landy por UPLC-qTOF-MS. Classes identificadas: iturinas, fengicinas e surfactinas .....	52
Tabela 9 - Identificação química dos lipopeptídeos de <i>Bacillus</i> sp. LIS05 em meio Landy por UPLC-qTOF-MS. Classes identificadas: iturina, fengicinas e surfactinas.. .....	53
Tabela 10 - Identificação química dos lipopeptídeos de <i>Bacillus velezensis</i> CT02 em meio TSB por UPLC-qTOF-MS. Classes identificadas: fengicinas e surfactinas.....	54
Tabela 11 - Identificação química dos lipopeptídeos de <i>Paenibacillus</i> sp. LIS04 em meio TSB por UPLC-qTOF-MS. Classe identificada: ciclopeptídeos.....	55
Tabela 12 - Identificação química dos lipopeptídeos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> IPR45 em meio Landy por UPLC-qTOF-MS. Classes identificadas: quinolonas e ramnolipídeos.....	55
Tabela 13 - Tabela síntese utilizada na análise quimiométrica dos dados obtidos a partir do HPLC-MS dos compostos caracterizados no extrato bruto das bactérias e o tempo de retenção.....	57
Tabela 14 - Compostos discriminados na análise de VIP.....	63
Tabela 15 - Características gerais dos genomas dos isolados do gênero <i>Bacillus</i> CT02, IM14 e LIS05, de <i>Paenibacillus</i> sp. LIS04 e de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> IPR45.. .....	63

Tabela 16 - Lista de genes envolvidos na síntese de metabólitos biotivos encontrados no genoma de isolados do gênero <i>Bacillus</i> IM14, CT02 e LIS05.....	66
Tabela 17 - Lista de genes envolvidos na síntese de metabólitos biotivos encontrados no genoma de <i>Paenibacillus</i> sp. LIS04..	68
Tabela 18 - Lista de genes envolvidos na síntese de metabólitos bioativos encontrados no genoma de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> IPR45.....	69
Tabela 19 - Compatibilidade <i>in vitro</i> dos isolados bacterianos com o fungicida Fludioxonil + Metalaxyl-M em três diferentes concentrações, evidenciada pela densidade ótica medida pelo crescimento em meio de cultura líquido..	76
Tabela 20 - Parâmetros de germinação de sementes e de crescimento de plantas de milho obtidas a partir de sementes infectadas com <i>Fusarium verticillioides</i> e tratadas com as bactérias individuais ou em combinação.....	78
Tabela 21 - Parâmetros de germinação e de crescimento de plantas de milho após 30 dias de tratamento das sementes com os isolados individuais ou em combinação com o fungicida Fludioxonil + Metalaxyl-M.....	80
Tabela 22 - Produtividade de milho híbrido BRS Caimbé inoculado com os agentes antagonistas de forma individual, combinados entre si ou em associação com fungicida químico nas sementes após 180 dias de cultivo em condições de campo.....	84
Tabela 23 - Efeito do tratamento de sementes com os isolados bacterianos na redução da severidade da podridão-do-colmo após a inoculação de <i>Fusarium verticillioides</i> em campo..	85
Tabela 24 - Caracterização dos isolados quanto aos parâmetros relacionados à promoção de crescimento de plantas.....	88
Tabela 25 - Dados de promoção de crescimento de milho obtidos após tratamento das sementes com os isolados bacterianos individuais ou em combinação.....	93

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	15
1.1 A cultura do milho	15
1.2 Incidência de doenças no milho e <i>Fusarium verticillioides</i>	16
1.3 Fumonisinas	17
1.4 Microrganismos no controle biológico e na promoção de crescimento vegetal	19
1.5 Produção de compostos bioativos	20
1.6 Uso de ferramentas moleculares na prospecção de compostos bioativos	22
1.7 Combinação de cepas microbianas no controle biológico	24
1.8 Integração entre controle químico e biológico	24
<b>2. JUSTIFICATIVA</b>	26
<b>3. OBJETIVOS</b>	27
3.1 Objetivo geral	27
3.2 Objetivos específicos	27
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>	28
4.1 Microrganismos e condições de cultivo	28
4.2 Atividade antagonica <i>in vitro</i> das bactérias isoladas de sementes de sorgo contra <i>Fusarium verticillioides</i>	29
4.3 Teste de antagonismo das bactérias isoladas de milho e sorgo contra diferentes fitopatógenos do milho	30
4.4 Avaliação de bactérias produtoras de metabólitos secundários com atividade antifúngica	30
4.4.1 Obtenção dos metabólitos secundários	30
4.4.2 Teste de microdiluição do extrato bacteriano em microplaca contendo esporos de <i>Fusarium verticillioides</i>	31
4.5 Identificação dos metabólitos secundários produzidos pelas bactérias	32
4.5.1 Extração dos metabólitos secundários	32
4.5.2 Análise cromatográfica por UPLC-MS	32
4.5.3 Análise quimiométrica dos metabólitos secundários bacterianos	33
4.6 Sequenciamento e análise do genoma completo das bactérias antagonistas	34
4.6.1 Análise filogenética das estirpes bacterianas	34
4.7 Utilização de bactérias antagonistas em mistura e combinadas com fungicida químico para suprimir <i>Fusarium verticillioides in vivo</i>	35
4.7.1 Testes de compatibilidade	35

4.7.1.1 Testes de compatibilidade entre as bactérias antagonistas.....	35
4.7.1.2 Testes de compatibilidade das bactérias antagonistas com fungicida químico...	35
4.7.2 Preparo das suspensões bacterianas e de esporos de <i>Fusarium verticillioides</i> para os testes <i>in vivo</i> .....	36
4.7.3 Testes de inibição de <i>Fusarium verticillioides</i> em casa de vegetação .....	37
4.7.3.1 Inoculação dos isolados bacterianos e <i>Fusarium verticillioides</i> nas sementes...	37
4.7.3.2 Delineamento experimental.....	38
4.7.3.3 Avaliação da doença.....	38
4.7.4 Testes de inibição de <i>Fusarium verticillioides</i> em campo.....	39
4.7.4.1 Inoculação dos antagonistas e de <i>Fusarium verticillioides</i> nas sementes .....	39
4.7.4.2 Inoculação dos antagonistas e de <i>Fusarium verticillioides</i> no colmo do milho..	39
4.8 Testes de promoção de crescimento vegetal pelas bactérias antagonistas.....	40
4.8.1 Caracterização dos isolados quanto a produção de fatores de promoção de crescimento vegetal <i>in vitro</i> .....	40
4.8.1.1 Produção de hormônio ácido indolacético.....	40
4.8.1.2 Fixação de nitrogênio.....	41
4.8.1.3 Solubilização e mineralização de fosfatos.....	41
4.8.1.4 Produção de amônia.....	41
4.8.1.5 Formação de biofilme.....	42
4.8.1.6 Produção de exopolissacarídeos (EPS) .....	42
4.8.2 Testes de promoção de crescimento de milho em casa de vegetação.....	43
4.9 Análises estatísticas.....	44
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>44</b>
5.1 Identificação das bactérias isoladas de sementes de sorgo e atividade antifúngica contra <i>Fusarium verticillioides</i> .....	44
5.2 Teste de antagonismo contra diferentes fitopatógenos do milho.....	44
5.3 Atividade antifúngica dos metabólitos secundários pelo método de microdiluição .....	46
5.4 Identificação dos metabólitos secundários por UPLC-MS .....	49
5.5 Análise quimiométrica dos extratos bacterianos.....	57
5.6 Análise do genoma completo das bactérias antagonistas.....	63
5.7 Análise filogenética.....	70
5.8 Testes de combinação entre bactérias antagonistas e combinação de bactérias com fungicida químico.....	73

5.8.1 Compatibilidade entre as bactérias antagonistas.....	73
5.8.2 Compatibilidade das bactérias antagonistas com fungicida químico.....	75
5.9 Controle de <i>Fusarium verticillioides</i> em casa de vegetação.....	77
5.9.1 Combinação entre bactérias.....	77
5.9.2 Combinação entre bactérias e fungicida químico.....	80
5.10 Controle biológico de <i>Fusarium verticillioides</i> em campo .....	82
5.10.1 Avaliação do controle de <i>Fusarium verticillioides</i> a partir da inoculação das bactérias antagonistas e do fitopatógeno nas sementes .....	82
5.10.2 Avaliação do controle de <i>Fusarium verticillioides</i> a partir da inoculação do fitopatógeno no colmo do milho.....	85
5.11 Promoção de crescimento vegetal pelas bactérias antagonistas.....	87
5.11.1 Caracterização dos isolados quanto a produção de fatores de promoção de crescimento vegetal <i>in vitro</i> .....	87
5.11.2 Promoção de crescimento de milho em casa de vegetação.....	91
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>95</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>98</b>
<b>8. APÊNDICES.....</b>	<b>120</b>
<b>9. ANEXO.....</b>	<b>123</b>



## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 A cultura do milho

O milho é a segunda cultura em importância no cenário agrícola do Brasil, sendo superado apenas pela soja, que lidera a produção de grãos no país (CONAB, 2022). O principal destino do grão é a alimentação animal, especialmente, na produção de suínos e aves. O milho é cultivado em praticamente todo o território nacional, sendo que grande parte da produção do país se concentra nas regiões Centro-Oeste (49,64% da área e 56,76% da produção), Sul (20,06% da área e 18,97% da produção) e Sudeste (10,57% da área e 10,66% da produção) (CONAB, 2022).

No cenário mundial, o Brasil ocupa uma posição de destaque como o terceiro maior produtor de milho, ficando atrás apenas da China e dos Estados Unidos. Na safra de 2021/22, segundo o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, 2022), o Brasil produziu 116 milhões de toneladas de milho, enquanto os Estados Unidos, o maior produtor mundial, teve uma produção média de 382 milhões de toneladas, seguido pela China, com uma produção de 272 milhões de toneladas. A estimativa é que a produção brasileira possa atingir 125,8 milhões de toneladas na safra 2022/23. Se confirmado, esse valor corresponde a um incremento de 11,2% em relação ao último ciclo (CONAB, 2022). O aumento da produtividade e expansão do cultivo do milho de segunda safra, que ocorreram em função dos elevados investimentos em máquinas, na adubação e correção do solo, no melhoramento genético e a adaptações dos períodos de plantio, foram alguns dos fatores que possibilitaram o aumento da produção nacional (Sanches e Sales, 2022).

Além de atender a demanda do mercado interno, liderado pelos setores ligados à alimentação humana e animal, o Brasil se destaca mundialmente como grande exportador de milho, garantindo o fornecimento principalmente durante o período de entressafra dos Estados Unidos, sendo o Japão, a Espanha, o Egito, o Irã, e a Coreia do Sul os principais países importadores do cereal no último ano (MAPA, 2022). O volume acumulado das exportações no intervalo de janeiro a novembro de 2022 atingiu 37,19 milhões de toneladas contra 17,02 milhões, em igual período do ano passado, representando aumento de 20,17 milhões de toneladas e crescimento de 118,5%, no comparativo. O forte crescimento das exportações brasileiras foi impulsionado pela alta dos preços internacionais, bem como pela queda na produção mundial do cereal (CONAB, 2022).

## 1.2 Incidência de doenças no milho e *Fusarium verticillioides*

Embora o Brasil seja um dos maiores produtores mundiais de milho, sua produtividade média ainda é menor que a dos principais países concorrentes (ABIMILHO, 2020). Isto tem sido atribuído a diferentes fatores que podem afetar o rendimento do milho, entre eles o tipo de solo, o estresse hídrico, a época de semeadura, o potencial produtivo do híbrido, a competição por plantas daninhas, o ataque de insetos e as doenças provocadas por microrganismos (Barroso et al., 2017). Dentre esses fatores, a ocorrência de doenças tem gerado preocupações por parte dos produtores e técnicos, em razão dos danos que causam à cultura (Lanza et al., 2012), pois afetam a quantidade e a qualidade dos grãos produzidos (Nguyen et al., 2017).

As doenças representam a segunda maior causa de deterioração dos grãos, perdendo apenas para o ataque de insetos. A contaminação dos grãos de milho pelos fungos pode ocorrer em qualquer etapa da cadeia produtiva e ser influenciada, principalmente, por fatores como condição física e sanitária dos grãos, condições de armazenamento, presença de insetos e ácaros, condições climáticas, disponibilidade de água, composição química dos grãos, práticas agrícolas, entre outros (Silva et al., 2017).

Os fungos que atacam a cultura do milho podem causar as podridões das espigas com a formação de grãos ardidos (Stefanello et al., 2012). Atualmente, isto constitui um dos principais problemas na produção de milho, pois resultam na desvalorização do produto no mercado, uma vez que é descontado no valor de venda um percentual referente a presença desses grãos (Silva et al., 2015). Além disso, os grãos ardidos apresentam elevada redução do seu valor nutricional e são mais leves do que os sadios o que acarreta na redução da quantidade produzida (Costa et al., 2011).

As plantas de milho são atacadas por várias espécies de *Fusarium* responsáveis por doenças como podridão das raízes, podridão dos colmos, podridão das sementes e podridão das espigas, sendo *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg relatado como o patógeno mais difundido do milho em todo mundo, incluindo o Brasil (Almeida, 2000; Lanza et al., 2014). Essa espécie é distribuída mundialmente, mas predomina em regiões tropicais e subtropicais (Chavarri et al., 2017). Os sintomas causados por *F. verticillioides* em plantas de milho incluem alteração da coloração externa da base do colmo, sendo que as plantas infectadas apresentam a medula de cor branco-rosada a rosa-salmão. Em casos mais severos de infecção, pode ocorrer esporulação do patógeno na parte externa do tecido afetado, sendo possível observar a presença de esporos de cor rosa-salmão. O apodrecimento pode afetar as raízes, levar a quebra do colmo e a maturação prematura (Reis et al., 2004).

*Fusarium verticillioides* também produz micotoxinas, metabólitos tóxicos prejudiciais para seres humanos e animais que consomem os grãos contaminados (Deepa & Sreenivasa, 2017; Blacutt et al., 2018) sendo as fumonisinas as mais comuns (Lanza et al., 2014; Pitt, 2014; Blacutt et al., 2018). A contaminação de grãos por micotoxinas pode constituir um obstáculo ao comércio internacional devido a barreiras fitossanitárias impostas pelos países consumidores, onde há rígido controle dos limites máximos permitidos de micotoxinas nos produtos importados (Mulunda et al., 2013).

Na associação com o milho, *F. verticillioides* é um exemplo de endofítico facultativo, existindo tanto na forma biotrófica, quando utilizando o hospedeiro para sua sobrevivência, quanto na forma saprofítica, obtendo nutrientes de restos vegetais em decomposição no solo (Samsudin e Magan, 2015). Na fase saprofítica, *F. verticillioides* sobrevive e se multiplica nos restos da cultura de milho, sendo essa a principal fonte de inóculo (Pinto, 2005). Os esporos do fungo podem ser disseminados pelo ar, por insetos, pela água de irrigação ou pelo uso de implements agrícolas contaminados (Vincelli et al., 2002; Davis et al., 2006). As principais portas de entrada de *F. verticillioides* são as sementes, ferimentos na planta adulta ou através do cabelo do milho (Munkvold et al. 1997), sendo esta última a forma mais eficiente de infecção, causando o rompimento da semente e maior severidade na podridão da espiga (Warfield & Davis, 1996).

As estratégias de controle de *F. verticillioides* incluem a utilização de cultivares de milho resistentes e a adoção de práticas culturais, como rotação de culturas e práticas de plantio, visando reduzir o potencial de inóculo (Olowe et al., 2018). A utilização de fungicidas químicos constitui a principal medida de controle contra *F. verticillioides* no entanto, o uso excessivo e inadequado dos fungicidas pode trazer inúmeros riscos tanto para o meio ambiente quanto para a saúde humana (Xu e Kim, 2014), podendo ainda promover o aumento da resistência dos fitopatógenos e eliminar microrganismos que são essenciais ao ambiente, por exemplo, os que degradam matéria orgânica e aqueles que são utilizados em programas de biocontrole (Spadotto et al., 2004). Além disso, o uso de fungicidas químicos em alguns casos não tem apresentado resultados efetivos, conforme relatado por Lanza e colaboradores (2016), onde a aplicação de fungicidas foi ineficiente na redução da incidência de patógenos fúngicos, de grãos ardidos e dos teores de fumonisinas totais em grãos de milho.

### **1.3 Fumonisin**

As fumonisinas são um grupo de micotoxinas originalmente isoladas de *F. verticillioides*. A frequente ocorrência de fungos toxigênicos, aliada ao clima tropical do país favorece a síntese dessas micotoxinas em milho (Midio e Martins, 2000). Em um trabalho de Lanza e colaboradores (2014), foi analisada a frequência de espécies de *Fusarium* associadas com grãos de milho nas principais regiões produtoras no Brasil e o potencial desses fungos na produção de fumonisinas. *Fusarium verticillioides* foi encontrada em 99% das amostras e todos os isolados testados produziram a micotoxina nos grãos.

A contaminação dos grãos por fumonisinas pode ocorrer tanto no campo, quando as condições são favoráveis ao desenvolvimento dos fungos, quanto em situações de armazenamento. O alto teor de umidade nos grãos conservados (18-23%) favorece a proliferação dos microrganismos e pode aumentar consideravelmente os teores de fumonisinas (Figueira et al., 2003).

As micotoxinas podem entrar na cadeia alimentar por via direta ou indireta. Na via direta, os fungos toxigênicos primeiramente contaminam o produto, o alimento ou a ração e posteriormente sintetizam a micotoxina. Por outro lado, a contaminação indireta ocorre quando um ingrediente qualquer foi previamente contaminado por um fungo toxigênico, e mesmo que o fungo tenha sido eliminado durante o processo industrial, as micotoxinas ainda permanecem no produto final (Freire et al, 2007).

A contaminação de rações por fumonisinas causa efeitos na produção agrícola e na saúde humana e animal. Estudos tem demonstrado a relação do consumo de rações contaminadas com fumonisinas com casos de leucoencefalomalácea (LEM) em equinos (Marasas et al., 1988; Echenique et al., 2019), além de doenças em suínos recém-desmamados ou adultos, caracterizadas por edema pulmonar e hidrotórax (Mostrom, 2022). Em aves, as fumonisinas causam diminuição do consumo de ração e ganho de peso corporal, aumento dos pesos relativos do fígado e dos rins e necrose hepática (Tessari et al., 2010). Para humanos, o consumo de grãos contaminados com essa micotoxina está associado com doenças como o câncer esofágico, com alta incidência principalmente em regiões onde o milho é a base da dieta da população (Sydenham et al., 1990; Kamle et al., 2019).

Os prejuízos econômicos causados pelas micotoxinas afetam toda a cadeia de produção, desde a produção primária, passando por todas as etapas de produção e podendo chegar até o produto final. Segundo a Organização Mundial para Alimentação e Agricultura (FAO) aproximadamente 25% dos alimentos produzidos no mundo estão contaminados com micotoxinas, gerando perdas anuais de um bilhão de dólares (FAO, 2020).

#### 1.4 Microrganismos no controle biológico e na promoção de crescimento vegetal

As doenças causadas por fungos na cultura do milho tem sido um problema no mundo, e diferentes estratégias têm sido propostas para controlar esses patógenos (Khan et al., 2017). Devido a demanda crescente por técnicas ecologicamente corretas na agricultura, houve um aumento na busca por métodos alternativos de controle de doenças (Bhattacharyya et al., 2017). Diante disso, um dos maiores desafios a ser enfrentado será o desenvolvimento de métodos alternativos para reduzir o uso de pesticidas químicos para o controle das doenças.

O controle biológico tem se apresentado como uma alternativa promissora nesse caso (Rahman, 2018). Essa estratégia apresenta as vantagens de ser segura ao meio ambiente e de baixo custo quando comparada com métodos convencionais de tratamento (Brito et al., 2013). Dentre os principais gêneros bacterianos utilizados como agentes de controle biológico destacam-se *Bacillus*, *Paenibacillus* e *Pseudomonas* (O'Brien, 2017; Padda et al., 2017; Bonaterra et al., 2022). Essas bactérias apresentam características próprias que lhes oferecem vantagens como agentes de controle biológico e serem capazes de produzir metabólitos secundários bioativos com atividade antagonica sobre fungos e bactérias patogênicas (Saharan e Nehra, 2011).

A atividade de controle da doença exercida pelos microrganismos antagonistas é complexa e inclui vários mecanismos (Santoyo et al., 2012), como a produção de compostos antimicrobianos solúveis e voláteis; competição por locais de colonização e nutrientes; competição por minerais, por exemplo ferro, através da produção de sideróforos; parasitismo que pode envolver a produção de enzimas extracelulares degradadoras da parede celular e indução da resistência sistêmica das plantas (Ahanger et al., 2014). O conhecimento de como os antagonistas atuam é de grande importância para a seleção adequada das estirpes que serão utilizadas no biocontrole para doenças de plantas (O'Brien, 2017). Essas informações ajudam a otimizar a forma e o tempo de aplicação das formulações em campo, aumentando a eficiência do tratamento (Massart et al., 2015).

Além de sua atividade de biocontrole, representantes dos gêneros *Bacillus*, *Paenibacillus* e *Pseudomonas* também promovem diretamente o crescimento e a saúde das plantas por meio de características fitoestimulatórias e biofertilizantes (Kavamura et al., 2013, Abdel-Rahman et al., 2017, Vurukonda et al., 2018). Essa função é resultado da capacidade desses microrganismos de produzirem fitohormônios; fixarem nitrogênio; aumentarem a absorção de nutrientes através da produção de sideróforos e ácidos orgânicos envolvidos na solubilização de fosfato (Graças et al., 2015). Por exemplo, em um trabalho de Islam e

colaboradores (2014), foi mostrado que a inoculação de sementes de trigo com um isolado de *Pseudomonas* sp. favoreceu o crescimento das plantas pela absorção de P e N, aumentando os teores de clorofila foliar, produção total de proteína solúvel e biomassa vegetal.

### 1.5 Produção de compostos bioativos

Os procariotos produzem cerca de 22.000 compostos bioativos, sendo que 75% do total apresenta atividade antibiótica (Salamoni, 2010). A produção desses compostos faz parte do metabolismo secundário dos microrganismos e tem como principal função atuar na proteção contra outros organismos para competição e crescimento no ambiente (Pusztahelyi et al., 2015). A antibiose associada à produção de compostos antimicrobianos tem se revelado como um mecanismo importante na maioria dos trabalhos relacionados ao controle biológico (Arseneault e Fillion, 2017). Alguns antagonistas são capazes de produzir diferentes tipos de metabólitos solúveis e voláteis (Tabela 1 e 2), que podem suprimir um ou mais patógenos, aumentando assim o espectro de doenças controladas com os produtos que os contenham (Arseneault e Fillion, 2017).

Considerando a ampla diversidade de microrganismos existentes, os metabólitos microbianos representam uma fonte potencial de moléculas bioativas que podem ser utilizadas para o desenvolvimento de novos biofungicidas para o uso agrícola. As pesquisas que investigam os compostos produzidos pelos microrganismos são de grande importância pois abrem caminho para a descoberta de novas moléculas devido à diversidade estrutural e funcional relatadas para essas moléculas (Santos e Monteiro, 2016).

Espécies do gênero *Bacillus* apresentam capacidade de produzir muitos compostos antimicrobianos voláteis e não voláteis (Asari et al., 2016; Sarangi e Ramakrishnan, 2016). Esse gênero possui de 4 a 8% de todo seu genoma dedicado à biossíntese de diferentes metabólitos, incluindo os compostos antifúngicos fengicina, a iturina, a surfactina, bacilisina, bacillomicina, micosubtilina, plipastatina, macrolactina (Chung et al., 2008; Zaid et al., 2022). Dentre os principais metabólitos com propriedade antifúngica de *Bacillus*, destacam-se os lipopeptídeos cíclicos (CLPs) como a iturina, fengicina e surfactina, que são uma classe importante de biosurfactantes. Os CLPs de *Bacillus* apresentam uma forte atividade antifúngica contra fungos filamentosos e podem induzir a resistência das plantas (Gong et al., 2015; Kim et al., 2017a). Esses metabólitos atuam na membrana citoplasmática, podendo causar o vazamento de substâncias vitais que acabam levando a célula à morte (Ongena e Jacques, 2008, Fira et al., 2018).

Bactérias do gênero *Pseudomonas* também são bastante investigadas quanto à atividade antagonista por apresentam capacidade de produzir uma ampla gama de compostos que são ativos contra diversos fungos fitopatogênicos (Bhattacharyya e Jha, 2012). Os principais metabólitos produzidos por *Pseudomonas* incluem antifúngicos peptídicos como a viscosinamida; antibióticos, como floroglucinóis, fenazinas, pioluteorina e pirrolnitrila; enzimas; gás hidrocianeto; sideróforos, como o ácido salicílico, a pioeverdina e a pioquelina, responsáveis por quelar o ferro e outros metais, que conferem vantagem competitiva aos agentes de biocontrole pela limitação de minerais essenciais nos habitats naturais (Radzki, 2013). Espécies de *Pseudomonas* também são produtoras de ramnolipídios, compostos com grande potencial para uso na agricultura como biopesticida, pois apresentam atividade inibitória contra diferentes microrganismos causadores de doenças, além de estimular respostas de defesa das plantas (Vatsa et al., 2010).

Espécies de *Paenibacillus polymyxa* são eficientes produtoras de metabólitos secundários principalmente fusaricidinas e polimixinas, que são lipopeptídeos potentes contra patógenos fúngicos e bacterianos (Mülner et al., 2021).

**Tabela 1** - Principais metabólitos solúveis produzidos por bactérias do gênero *Bacillus* sp., de *Paenibacillus polymyxa* e de *Pseudomonas aeruginosa* envolvidos no controle de doenças de plantas causadas por fungos.

Metabólito	Classe	Espécie	Patógeno alvo	Referência
Fengicina	Lipopeptídeo	<i>Bacillus</i> sp.	ISR; Efeito contra fungo	Liu et al. (2019b); Zaid et al., 2022
Surfactina	Lipopeptídeo	<i>Bacillus</i> sp.	ISR; Efeito contra fungo	Liu et al. (2019b); Zaid et al., 2022
Iturina	Lipopeptídeo	<i>Bacillus</i> sp.	Efeito contra fungo	Liu et al. (2019b); Zaid et al., 2022
Micosubtilina	Lipopeptídeo	<i>Bacillus</i> sp.	ISR; Efeito contra fungo	Zaid et al., 2022
Bacillomicina D	Lipopeptídeo	<i>Bacillus</i> sp.	ISR; Efeito contra fungo	Zaid et al., 2022
Plipastatina	Lipopeptídeo	<i>Bacillus</i> sp.	Efeito contra fungo e bactéria	Zaid et al., 2022
Bacilisina	Dipeptídeo	<i>Bacillus</i> sp.	Efeito contra fungo e bactéria	Zaid et al., 2022
Macrolactina	Policetídeo	<i>Bacillus</i> sp.	ISR; Efeito contra fungo e bactéria	Zaid et al., 2022
Fusaricidina	Lipopeptídeo	<i>P. polymyxa</i>	Efeito contra fungo Efeito contra bactéria G+	Luo et al., 2018
Polimixina	Lipopeptídeo	<i>P. polymyxa</i>	Efeito contra fungo Efeito contra bactéria G-	Luo et al., 2018
Paenilarvins	Lipopeptídeo	<i>Paenibacillus</i> sp.	Efeito contra fungo	Luo et al., 2018

fenazina-1-carboxamida (PCN)	Fenazina	<i>P. aeruginosa</i>	Efeito contra fungo	Kumar et al., 2005
fenazina-1-carboxílico (PCA)	Fenazina	<i>P. aeruginosa</i>	Efeito contra fungo	Bedoya et al., 2019
Piocianina	Fenazina	<i>P. aeruginosa</i>	Efeito contra fungo	Mahmoud et al. 2016
Pioverdina	Sideróforo	<i>P. aeruginosa</i>	Efeito contra fungo	Cesa-Luna et al. 2020
Pioquelina	Sideróforo	<i>P. aeruginosa</i>	Efeito contra fungo	Cox et al. 1981

**Tabela 2** - Principais compostos orgânicos voláteis produzidos por bactérias do gênero *Bacillus* sp., de *Paenibacillus polymyxa* e de *Pseudomonas aeruginosa* envolvidos no controle de doenças de plantas causadas por fungos.

Composto Orgânico volátil	Espécie	Patógeno alvo	Referência
benzotiazol, benzaldeído, undecanal, dodecanal, hexadecanal, 2-tridecanona e fenol	<i>P. polymyxa</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	Raza et al. 2015
dimetilsulfóxido, 1 butanol, 3-hidroxi-2-butanona (acetoína)	<i>B. velezensis</i>	Fungos fitopatogênicos	Lim et al. (2017)
éster metílico do ácido hexadecanóico, ácido dodecanóico, éster 2-hidroxi-1-(hidroximetil) etílico do ácido pentadecanóico, ácido 1,2Benzenodicarboxílico, éster dibutílico	<i>B. subtilis</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	Ramyabharathi e Raguchander (2014)
3-hidroxi-5-metoxi benzeno metanol (HMB)	<i>P. aeruginosa</i>	ISR contra <i>Fusarium</i>	Fátima e Anjum, 2017

## 1.6 Uso de ferramentas moleculares na prospecção de compostos bioativos

Diante da possibilidade de utilização dos compostos produzidos por microrganismos no controle de doenças de plantas, há um interesse crescente na descoberta, síntese e exploração dessas moléculas. Conhecer a diversidade dos compostos bioativos produzidos pelos microrganismos e seus mecanismos de ação é crucial para sua aplicação eficiente na agricultura (Gomes et al., 2018). Ao longo de muitos anos, técnicas microscópicas e bioquímicas foram utilizadas para identificar como os antagonistas atuam (Massart et al., 2015), porém, não permitiram que os mecanismos de ação fossem completamente elucidados. Por sua vez, o



desenvolvimento de técnicas moleculares avançadas tem permitido a compreensão detalhada dos mecanismos de biocontrole de diversos microrganismos (O'Brien, 2017). Os números crescentes de estudos utilizando ferramentas moleculares foram integrados a esse campo, permitindo uma identificação mais eficiente de metabólitos ecologicamente importantes (Paterson et al., 2017).

O uso de abordagens denominadas ômicas tem permitido novos estudos de bioprospecção para a busca de novos compostos bioativos. O genoma estuda a molécula de DNA e a informação nela armazenada. A transcriptômica estuda o primeiro passo do fluxo da informação genética, ou seja, a transcrição do DNA para o RNA e quais são os genes estão sendo expressos em um determinado momento da vida de um microrganismo (Silva, 2012). A proteômica estuda a expressão e a identificação das proteínas de um organismo e suas funções (Noordin e Othma, 2013). E a metabolômica analisa quantitativamente e qualitativamente, o conjunto completo de metabólitos e os produtos finais dos diversos processos celulares (Koek et al., 2011). Essa abordagem permite que o microrganismo seja estudado no nível de sistemas, onde os genes e sua expressão não são estudados de forma isolada, mas como integrantes de uma rede complexa. Além de identificar os genes, essas técnicas permitem compreender sua expressão e a inter-relação com os demais genes (Souza et al., 2014).

Para a prospecção de compostos de interesse, várias ferramentas podem ser utilizadas, entre elas a genômica, que fornece dados referentes a sequência completa do material genético de um microrganismo. O sequenciamento comparativo do genoma identifica genes específicos que codificam metabólitos secundários envolvidos na ação de controle dos patógenos (Palazzini et al., 2016). Por exemplo, Martínez-Raudales e colaboradores (2017), analisando o genoma do agente de controle biológico *B. velezensis* 3A-25B, encontraram vários genes envolvidos na biossíntese de compostos com efeitos tóxicos sobre estruturas de fungos, além de genes que induzem a resistência sistêmica nas plantas, o que explica em parte a atividade biológica demonstrada *in vitro* ou *in vivo*.

Além da identificação de genes relacionados à produção de compostos bioativos, a genômica permite avaliar uma possível patogenicidade de um microrganismo, uma vez que todo o genoma é examinado. Com isso, a seleção dos agentes de biocontrole se torna mais eficiente e segura, considerando futuras aplicações desses microrganismos no campo (Paterson et al., 2017). O número de genomas sequenciados e depositados em base de dados encontra-se em constante crescimento, uma vez que as ferramentas moleculares permitiram que muitos genomas fossem sequenciados e depositados nos bancos de dados juntamente com suas informações associadas.

Dessa forma, uma abordagem multidisciplinar com a utilização de ferramentas genômicas, transcriptômicas e proteômicas poderão nos ajudar a compreender a complexidade dos mecanismos de ação dos microrganismos antagonistas e acelerar a descoberta de novos compostos bioativos, pois estas ferramentas direcionam a busca por esses tipos de compostos (Souza et al., 2014; Massart et al., 2015).

### **1.7 Combinação de cepas microbianas no controle biológico**

Uma vantagem da técnica de biocontrole é a possibilidade de uso de mistura de microrganismos com diferentes mecanismos de controle dos patógenos, o que pode prevenir ou, pelo menos, reduzir significativamente o surgimento de populações dos patógenos resistentes aos biofungicidas (Vos et al., 2015). Isto porque diversos estudos têm sugerido que uma das razões para ocorrência do surgimento de patógenos resistentes é o uso contínuo de fungicidas contendo ingrediente ativos com o mesmo modo de ação (Fillinger e Elad, 2016).

A mistura de diferentes agentes biológicos compatíveis pode resultar em melhor colonização do substrato, maior supressão da doença por diferentes mecanismos de controle, proteção contra um maior número de patógenos, além de uma maior eficiência sob diferentes condições ambientais (Ogaz et al., 2015). O efeito sinérgico da utilização de dois ou mais microrganismos foi descrito por Zalila-Kolsi e colaboradores (2016), onde a utilização de inóculo misto de *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis* e *P. polymyxa* foi mais eficaz em reduzir os danos provocados por *Fusarium graminearum* em plantas de trigo do que tratamentos com uma única estirpe. Dunlap e colaboradores (2015), observaram efeito positivo da inoculação conjunta de dois isolados bacterianos no controle de *Fusarium* tanto em ensaios de estufa quanto de campo.

No entanto, nem sempre este efeito benéfico é observado, e em alguns casos, o uso de inóculantes com mais de uma estirpe microbiana reduziu o nível da supressão da doença em relação a atividade individual dos antagonistas (Stockwell et al., 2011; O'Brien, 2017). Esses efeitos ocorrem porque os agentes de controle biológico podem inibir-se mutuamente; portanto, estudos de avaliação de interações antagônicas devem ser conduzidos antes do design e aplicação de formulações contendo consórcios bacterianos.

### **1.8 Integração entre controle químico e biológico**

O controle químico de doenças causadas por patógenos como *F. verticillioides*, que sobrevivem em restos vegetais no solo, não tem tido sucesso satisfatório em muitos casos. Entre as dificuldades, destacam-se a longevidade do inóculo no solo, a habilidade desses patógenos de infectar o hospedeiro durante longos períodos, além da baixa eficiência de fungicidas para erradicar os patógenos nos restos culturais. Além disso, a utilização cada vez maior dos fungicidas na agricultura tem promovido o aumento de resistência do patógeno (Kim et al., 2017a). Diante desses problemas, vários autores têm sugerido a integração de diferentes modalidades de controle, ao considerarem que esta estratégia pode proporcionar maior eficácia quando comparado ao uso de um único método, como resultado do efeito aditivo das diferentes medidas usadas (Khokhar e Gupta, 2014; Paraschivu et al., 2014).

A adoção de uma única técnica pode muitas vezes levar apenas ao controle parcial da doença e não ser suficiente para evitar que perdas na produção aconteçam. Dessa forma, a utilização do controle biológico deve ser associada a outros métodos, como o controle químico, para o desenvolvimento de um programa eficaz de manejo de doenças (Thoudam e Dutta, 2014). Esta integração permite ainda a aplicação de doses relativamente baixas do produto químico, o que pode diminuir o desenvolvimento de resistência dos patógenos, reduzir danos ao meio ambiente e resíduos nos alimentos, além de diminuir os custos de produção (Dubey et al., 2015). A maior efetividade do controle integrado pode ser resultado de dois processos. No primeiro, a utilização dos compostos químicos pode promover o estresse do fitopatógeno e torná-lo mais vulnerável aos microrganismos antagonistas (Bhale e Rajkonda, 2015). No segundo, os microrganismos antagonistas podem produzir metabólitos que causam danos à parede celular ou alteram a permeabilidade da membrana dos fitopatógenos, aumentando a sensibilidade deles aos fungicidas (Kim et al., 2017a). Este último processo foi denominado de quimiosensibilização e foi apresentado como nova estratégia para o aumento da eficácia no controle de doenças, permitindo aumentar a sensibilidade dos fitopatógenos pela utilização simultânea de duas ou mais substâncias fungicidas que teriam pouco ou nenhum efeito se utilizadas individualmente e até mesmo em menores doses, como já mencionado (Kim et al., 2017a).

Para que seja possível a integração dos dois métodos de controle é importante que os microrganismos antagonistas sejam menos afetados pelos fungicidas do que os fitopatógenos, ou que consigam se restabelecer mais rapidamente no solo ou na planta após o tratamento químico. Portanto, testes que avaliam a sensibilidade dos antagonistas aos compostos químicos são de extrema importância para a seleção adequada dos isolados que serão utilizados em um programa de biocontrole (Bardin et al., 2015; Wedajo, 2015).

## 2 JUSTIFICATIVA

A contaminação do milho por *F. verticillioides* representa um sério problema de perda da produtividade e da qualidade dos grãos em todo o mundo. Além disso, é uma ameaça significativa para a saúde animal e segurança alimentar devido ao potencial dessa espécie de produzir micotoxinas como as fumonisinas. O controle de *F. verticillioides* normalmente é feito pela utilização de fungicidas químicos aplicados durante o período de antecessão à doença ou por meio do desenvolvimento de plantas resistentes. No entanto, esses métodos não têm apresentado resultados tão efetivos e têm gerado problemas como a acumulação de resíduos tóxicos nas culturas pela utilização de altas doses e aplicação inadequada dos compostos químicos, além do surgimento de patógenos resistentes.

Diante disso, a demanda por novos agentes antimicrobianos que sejam eficazes no controle de doenças é crescente. Uma agricultura sustentável busca métodos que proporcionem aumento da produção de alimentos sem deteriorar o meio ambiente e a saúde humana e animal. A utilização de métodos como o controle biológico utilizando microrganismos antagonistas ou seus metabólitos pode ser uma alternativa viável para atingir esses objetivos. De fato, o método hoje é um componente importante entre as práticas de manejo de doenças. Esta estratégia pode resolver muitos problemas persistentes na agricultura devido a utilização de fungicidas.

No entanto, alguns problemas identificados nas pesquisas com controle biológico ainda precisam ser solucionados, visando principalmente a obtenção de melhores resultados em campo. Conhecer mais detalhadamente os mecanismos de ação dos antagonistas é de suma importância para aumentar a eficiência do controle biológico. Entender como um agente de biocontrole atua sobre a capacidade do patógeno de causar doença pode ajudar a antecipar um possível desenvolvimento de resistência. Além disso, pode fornecer informações importantes para evitar que outros componentes do ecossistema interfiram na interação que leva ao biocontrole e assim aumentar a eficácia da técnica, além de fornecer informações assertivas na seleção de microrganismos antagonistas mais eficientes.

Para a seleção correta das bactérias candidatas a bioinoculantes algumas etapas são essenciais, que englobam desde o isolamento inicial dos microrganismos, passando pelas etapas de caracterização do microrganismo e desenvolvimento metodológico, seguido de reintrodução das bactérias mais eficientes no sistema solo-planta. Em trabalhos anteriores, isolamos microrganismos com grande potencial para serem utilizados no controle de *F. verticillioides*, que é um dos principais fungos causadores de doenças no milho em todo o mundo. Esses isolados serão caracterizados neste estudo com o objetivo de entender seus

principais mecanismos de ação, visando melhores técnicas de aplicação, como por exemplo a associação ao controle químico e a coinoculação. Além disso, os isolados selecionados anteriormente serão avaliados quanto ao controle da doença na planta de milho, em condições controladas e no campo. Com os resultados deste trabalho espera-se selecionar bactérias para o desenvolvimento de bioformulações e ampliar as estratégias de manejo de *F.verticillioides* e aumento da produtividade na cultura do milho.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial de bactérias isoladas de milho e sorgo no controle biológico de *F. verticillioides* e promoção de crescimento vegetal pela caracterização da produção de compostos antifúngicos e avaliação da eficácia do uso dessas bactérias isoladas e combinadas entre si e com o fungicida químico para aumentar o crescimento das plantas e suprimir *F. verticillioides*.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Selecionar *in vitro* bactérias de estigma do milho e de sementes de sorgo com potencial para o controle biológico de *F. verticillioides* e outros fitopatógenos do milho.
- Avaliar a produção de compostos antifúngicos pelos isolados bacterianos e posteriormente identificá-los por Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas (HPLC-MS).
- Investigar no genoma das bactérias selecionadas a presença de genes envolvidos na produção de compostos antifúngicos
- Testar a compatibilidade de bactérias antagonistas para utilização combinada no controle de *F. verticillioides*.
- Analisar o efeito do fungicida Fludioxonil + Metalaxyl-M no crescimento das bactérias antagonistas para selecionar isolados que serão utilizados combinados com fungicida químico no controle de *F. verticillioides*.
- Avaliar o efeito das bactérias combinadas entre si e combinadas com fungicida químico no controle biológico de *F. verticillioides* em casa de vegetação e campo.
- Avaliar o potencial de promoção de crescimento de plantas pelas bactérias antagonistas selecionadas utilizando testes *in vitro*.

- Testar em casa de vegetação a capacidade dos isolados de promover o crescimento de plantas de milho quando inoculados individualmente ou em combinação nas sementes.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Microrganismos e condições de cultivo

No estudo, foi utilizado o fitopatógeno *F. verticillioides* CML 2778, isolado de sorgo (*Sorghum bicolor*), reconhecido como patógeno do milho (Guimarães, 2016) e pertencente à Coleção Micológica da Universidade Federal de Lavras/MG (CML). Foram utilizadas 3 bactérias isoladas de estigma de milho (*Zea mays*), sendo uma endofítica e duas epifíticas, que foram previamente caracterizadas quanto à capacidade de inibir o crescimento de *F. verticillioides* em testes *in vitro* e casa de vegetação (Diniz et al., 2021). Esses isolados estão depositados na Coleção de Microrganismos da Embrapa Milho e Sorgo (CMMF) a -20 °C e em glicerol 20%. Foi feito o sequenciamento parcial do gene *16S rRNA* e os isolados foram identificados por comparação de sequências no banco de dados do Centro Nacional de Informação Biotecnológica (NCBI) usando o programa BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). As sequências foram depositadas no Genbank e seus códigos de acesso estão informados na Tabela 3. Também foram incluídas duas novas bactérias de sementes de sorgo (*Sorghum bicolor*) que foram isoladas nesse trabalho.

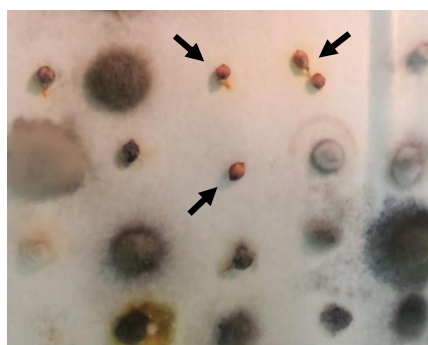
**Tabela 3** - Bactérias isoladas de estigma de milho depositadas na Coleção de Microrganismos da Embrapa Milho e Sorgo (CMMF).

Código CMMF	Isolado	Local de coleta	Identificação	Acesso ao Genbank
IM14	estigma de milho	Sete Lagoas/MG	<i>Bacillus velezensis</i>	MK461831.1
CT02	estigma de milho	Sete Lagoas/MG	<i>Bacillus velezensis</i>	MK461847.1
IPR45	estigma de milho	Sertaneja/PR	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AE004091.2

Sementes de sorgo usadas para o isolamento de bactérias foram coletadas em plantas do Cerrado em Sete Lagoas/MG com diferentes graus de infecção de bactérias ou fungos filamentosos (Figura 1). Para o isolamento, amostras de biomassa bacteriana observada na superfície das sementes de sorgo onde não havia quase crescimento dos fungos (Figura 1), foram coletadas com o auxílio de alças de platina estéril e em seguida inoculadas por meio de estrias compostas na superfície de placas contendo o meio de cultura Agar Triptona de Soja TSA (Kasvi, Brasil) para a obtenção de colônias isoladas. Aquelas com diferentes

características macro morfológicas foram purificadas até a obtenção de culturas puras e estocadas a -20 °C em meio Caldo Triptona Soja TSB (Kasvi, Brasil) com glicerol 20%. Essas bactérias foram testadas quanto à atividade antagonica contra *F. verticillioides in vitro* e identificadas por meio do sequenciamento de regiões do gene do 16S rRNA.

Figura 1 - Sementes de sorgo coletadas em plantas de cerrado, com diferentes graus de infecção de bactérias ou fungos filamentosos.



As setas indicam as sementes infectadas por bactérias usadas para o isolamento de potenciais agentes antagonistas de *Fusarium verticillioides*.

#### 4.2 Atividade antagonica *in vitro* das bactérias isoladas de sementes de sorgo contra *Fusarium verticillioides*

Para a avaliação do antagonismo *in vitro* contra *F. verticillioides* foi realizado um teste de confronto direto das culturas em meio sólido de acordo com a metodologia adaptada de Sagahón et al. (2011). Inicialmente, um disco de 5 mm da borda da cultura pura do patógeno, crescido por sete dias em meio Batata Dextrose Agar (BDA), foi transferido para o centro de uma placa de Petri (90 mm de diâmetro) contendo o mesmo meio. Em quatro pontos equidistantes entre si e do centro foi adicionado 10 µL de suspensão bacteriana na concentração aproximada de 10<sup>8</sup> UFC/mL, crescida por 24 h a 28 °C. O teste foi realizado em triplicata e o controle foi composto de placas contendo apenas o fitopatógeno. A medição do raio da colônia do fitopatógeno foi realizada na presença e ausência dos microrganismos antagonistas quando toda a superfície do meio foi colonizada pelo patógeno no tratamento testemunha, cerca de sete dias após a incubação a 28°C com fotoperíodo de 12 h de luz. A inibição de *F. verticillioides* pelos isolados foi calculada em relação ao crescimento micelial na placa controle, de acordo com a fórmula:

$$ZI(\%) = \frac{(N1 - N2) \times 100}{N1}$$

Sendo: |ZI| = Zona de inibição; N1= raio do micélio encontrado na ausência do antagonista; N2= raio do micélio na presença do antagonista (Campanile et al., 2007).

### **4.3 Teste de antagonismo das bactérias isoladas de milho e sorgo contra diferentes fitopatógenos do milho**

Para esse e os demais testes foram utilizadas as três bactérias de estigmas de milho *B. velezensis* (CT02, IM14) e *Pseudomonas aeruginosa* (IPR45) selecionadas em trabalho anterior (Diniz et al., 2021) e dois novos isolados de sementes de sorgo: *Paenibacillus* sp. (LIS04) e *Bacillus* sp. (LIS05).

Foi avaliada a atividade antagonista das bactérias isoladas em meio sólido (como descrito no item 4.2) contra os patógenos *Macrophomina phaseolina*, *Stenocarpella* sp., *Fusarium graminearum*, *Colletotrichum graminicola* e *Bipolaris* sp. obtidos do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Milho e Sorgo.

### **4.4 Avaliação de bactérias produtoras de metabólitos secundários com atividade antifúngica**

#### **4.4.1 Obtenção dos metabólitos secundários**

Visando aumentar a probabilidade de detecção de metabólitos secundários com atividade antifúngica, a produção de compostos antifúngicos solúveis foi avaliada pelo crescimento dos isolados em quatro meios de cultura: meio Caldo Triptona Soja TSB (Kasvi, Brasil) (peptona de caseína 17 g/L, peptona de soja 3 g/L, glicose 2,5 g/L, cloreto de sódio 5 g/L, fosfato dipotássico 2,5 g/L, pH 7,3); meio caldo de Batata Dextrose (BD) (infusão de batata 200 g/L, glicose 20 g/L, pH 7,0); meio Luria Bertani LB (Kasvi, Brasil) com glicose (glicose 20 g/L, triptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L, NaCl 5 g/L, pH =7,0) e meio Landy (glicose 20 g/L, ácido L-glutâmico 5 g/L, MgSO<sub>4</sub> 0,5 g/L, KCl 0,5 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,0 g/L, Fe<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 0,0012 g/L, MnSO<sub>4</sub> 0,0014 g/L, CuSO<sub>4</sub> 0,0016 g/L, pH 7,6).

Para produzir o pré-inóculo, colônias isoladas das bactérias crescidas em meio Agar Triptona de Soja TSA (Kasvi, Brasil) foram inoculadas em frascos Erlenmeyers contendo 10 mL dos meios caldos triptona de soja, caldo de Batata Dextrose, LB com glicose ou meio Landy que foram incubados a 28°C sob agitação de 160 rpm por 24 h. Para a transferência, 500 µL do pré-inóculo foi adicionado em frascos Erlenmeyers contendo 50 mL de cada meio de cultura



utilizado para a produção de compostos antifúngicos. Após incubação a 28°C a 160 rpm por 72 h, o sobrenadante foi coletado por centrifugação a 12.000 g durante 10 minutos e filtrado em membranas de 0,22 µm.

#### **4.4.2 Teste de microdiluição do extrato bacteriano em microplaca contendo esporos de *Fusarium verticillioides***

Para avaliar a presença de compostos solúveis bioativos nos extratos brutos bacterianos, foi utilizado o método adaptado descrito no documento M38-A, Método de referência para testes de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade a terapia antifúngica dos fungos filamentosos (CLSI, 2002). Para a realização do teste, foi utilizada uma placa microdiluição de 96 poços de fundo em U (Costar). Para as microdiluições foram empregadas concentrações que variaram de 0,3% a 100% do extrato bruto das bactérias.

Na montagem da microplaca, os poços da primeira coluna (controle negativo) receberam 200 µl do mesmo meio de cultura utilizado para crescimento das bactérias antagonistas (TSB, BD, LG + glicose ou Landy) sem adição do inóculo fúngico. Na segunda coluna, foram adicionados 200 µL do filtrado bacteriano, sem diluição, contendo os esporos de *F. verticillioides* na concentração de  $1 \times 10^4$  de esporos/ml. A partir da terceira coluna da microplaca foram adicionados em todos os poços, 100 µL do meio utilizado para o crescimento dos antagonistas. Na coluna três, foi adicionado 200 µl do filtrado dos isolados, de onde foi retirado 100 µL que foi transferido para a próxima coluna e misturado com uma pipeta com os 100 µl do meio líquido e então, 100 µl da mistura foram transferidos para a próxima coluna, sendo feitas diluições em série na placa até a 11ª coluna, a fim de se obter concentrações iniciais de 100% no primeiro poço chegando até concentração final de 0,3% no último poço. Em seguida, começando pela terceira coluna, foram adicionados 100 µl de uma solução de esporos na concentração de  $1 \times 10^4$  de *F. verticillioides* em todos os poços, mantendo todos os poços um volume de 200 µl no total. Na 12ª coluna foi feito o controle positivo, onde foram adicionados 100 µl da suspensão de esporos de *F. verticillioides* juntamente com 100 µl do meio de cultura utilizado para o crescimento dos antagonistas. Cada microplaca foi considerada uma réplica, e o teste foi realizado em triplicata. A microplacas foram incubadas a 28 °C sem agitação, por 96 h. Após esse prazo, foi realizada a leitura da absorbância a 490 nm utilizando um espectrofotômetro digital (Biospectro). Para calcular a porcentagem de inibição foram utilizadas as fórmulas descritas por Pérez et al. (2018):

$$\% \text{ de crescimento} = \frac{A - B}{C} (100)$$

Sendo:

A = absorvância do tratamento B = absorvância do controle negativo C = absorvância do controle positivo. % de inibição = 100 - % de crescimento

#### **4.5 Identificação dos metabólitos secundários produzidos pelas bactérias**

##### **4.5.1 Extração dos metabólitos secundários**

Para a obtenção dos metabólitos, as bactérias isoladas foram crescidas no meio de cultura onde ocorreu a maior produção de compostos antifúngicos por cada isolado, determinado no teste de microdiluição em caldo.

Para produzir o pré-inóculo, colônias isoladas das bactérias crescidas em meio sólido TSA (Kasvi, Brasil) foram inoculadas em Erlenmeyers contendo 10 mL dos meios TSB, BD, LB +glicose ou meio Landy de acordo com o meio ideal para cada isolado. A incubação foi realizada a 28 °C sob agitação a 160 rpm por 24 h. Posteriormente 10 mL do pré-inóculo foi adicionado, em triplicata, em frascos Erlenmeyers contendo 1000 mL de cada respectivo meio de cultura. Após incubação a 28 °C e agitação a 160 rpm por 72 horas, o sobrenadante contendo os compostos liberados foi coletado por centrifugação (2671g por 15 min). A extração dos compostos foi realizada por precipitação ácida adicionando-se HCl 6 M até a redução do pH para 2,0. Em seguida, os sobrenadantes ácidos foram armazenados na geladeira por 24 h. Após esse tempo, a suspensão foi centrifugada (3488g por 30 min) e os pellets contendo os compostos foram liofilizados. As amostras foram preparadas na concentração de 100 mg L<sup>-1</sup> em metanol e filtradas através de membranas de PTFE de 0,22 µm.

##### **4.5.2 Análise cromatográfica por UPLC-MS**

A análise foi realizada em um sistema de Cromatógrafo Líquido de Ultra Eficiência UHPLC acoplado a um sistema de Quadrupolo/Tempo de Voo (UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup>) Xevo System (Waters Corp, Milford, MA, USA) pertencente a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa. As corridas cromatográficas foram realizadas em uma coluna Waters Acquity UPLC BEH (150 x 2,1 milímetros, 1,7 µm), temperatura fixa de 40 °C, fases móveis água com 0,1% de ácido formico (A) e acetonitrila com 0,1% de ácido formico (B), gradiente variando de 2% a 95% B (15 min), fluxo de 0,4 mL/min.

O volume de injeção foi de 5  $\mu$ l. O espectrômetro de massa foi operado no modo centroide MS<sup>E</sup>. O espectro de massa foi registrado no modo ESI+ em uma faixa de massa de 110-1180 Da, temperatura da fonte fixa de 120 °C, temperatura de dessolvatação 350 °C, fluxo do gás dessolvatação de 500 L/h, cone de extração de 0,5 V, e voltagem do capilar de 3,2 kV. Leucina encefalina foi utilizada como lock mass. O instrumento foi controlado pelo software Masslynx 4.1 (Waters Corporation).

#### **4.5.3 Análise quimiométrica dos metabólitos secundários bacterianos**

Inicialmente, os dados adquiridos pelo UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup> (formato.raw) foram convertidos para o formato Analysis Base File (.abf) usando o software Abf Converter (<http://www.reifycs.com/AbfConverter>) e, posteriormente, foram processados usando o fluxo de trabalho metabolômico do software MS-DIAL v. 4.70 (Tsugawa et al., 2015). Os parâmetros de processamento utilizados foram: faixa de massa m/z 50-1180; tolerância MS1 de 0,01 e tolerância MS2 0,05; altura mínima do pico de 50; mass slice width de 0,1 Da; média móvel linear-ponderada como método de suavização, usando nível 3 e largura mínima de pico de 5; sigma window value de 0,5 para deconvolução, e para alinhamento de pico, tolerância de 0,05 min e MS1 de 0,01 Da.

A matriz de dados alinhada para os compostos caracterizados nas amostras dos metabólitos bacterianos foi exportada do MS-DIAL como arquivo .txt, e carregada na plataforma Metaboanalyst 5.0, seguindo protocolo padrão descrito por Chong et al. (2018). Inicialmente, aplicou-se a análise de variância unidirecional (ANOVA) para identificar compostos que diferiram de forma significativa entre as cinco amostras, ajustando o p-valor de acordo com FDR (False Discovery Rate) < 0,05 e teste post-hoc de Fisher's LSD (Least Significant Difference). Adicionalmente, análises quimiométricas não-supervisionadas de PCA (Análise de Componentes Principais) e HCA-Heat map (Análise Hierárquica de Agrupamentos com mapa de calor gerado por ferramentas automáticas que utiliza as cores como referência para facilitar o entendimento das informações) foram realizadas para detectar tendências de separação entre as amostras, baseadas na intensidade relativa dos compostos, separadas por coordenadas mais explicativas da distribuição dos dados (PCA) ou pelo mapa de calor gerado pela intensidade das concentrações das substâncias em cores (Heat map). Para construção do modelo de HCA-Heat map foram utilizados medida de Pearson e o algoritmo de agrupamento Ward. Enquanto a análise supervisionada de PLS-DA (Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais) foi realizada para obter a máxima separação entre os grupos e prever quais

variáveis foram discriminantes para a atividade antifúngica, por meio da análise da Variável de Importância na Projeção (VIP) > 1,0 (Selegado et al., 2022).

#### **4.6 Sequenciamento e análise do genoma completo das bactérias antagonistas**

Para a extração de DNA, as bactérias foram inoculadas em meio Caldo Tripton Soja TSB (Kasvi, Brasil) e incubadas a 28 °C por 24 h. Após centrifugação a 12.000 g por 10 min, o precipitado obtido foi usado na extração de DNA genômico utilizando o Kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante e quantificado no Qubit ® 2.0 fluorometer (Life Technologies). Os genomas dos isolados do gênero *Bacillus* IM14, CT02 e LIS05, *Paenibacillus* sp. LIS04 e *P. aeruginosa* IPR45 foram sequenciados na plataforma Illumina HiSeq 4000 (Illumina, San Diego, CA, EUA) no Beijing Genomics Institute – BGI (Shenzhen, China), usando a estratégia 150-paired end.

As reads sequenciadas foram preparadas para montagem utilizando o programa Trimmomatic para dados Illumina NGS (Galaxy Version 0.38.0). Após a trimagem, a qualidade das reads foi verificada utilizando o software FastQC (Galaxy Version 0.73+galaxy0), eliminando reads com qualidade inferior a 20 no índice de qualidade Phred. As reads foram montadas usando o software SPAdes e as análises de qualidade de montagem e completude gênica do genoma foram realizadas utilizando os programas QUAST (<https://quast.sourceforge.net/quast>) e BUSCO (Benchmarking Universal Single Copy Orthologs - <https://gitlab.com/ezlab/busco>), respectivamente (Noori et al. 2021).

As sequências genômicas pré-montadas foram anotadas usando os softwares PROKKA versão 1.8 (Seemann, 2014) e RAST versão 2.0 (Rapid Annotation using Subsystem Technology) (Aziz et al., 2008).

##### **4.6.1 Análise filogenética das estirpes bacterianas**

A análise filogenética foi realizada com base no genoma completo, utilizando o software Type (Strain) - Genome Server TYGS (Meier-Kolthoff & Göker, 2019). Os contigs do genoma foram reordenados de acordo com genomas de referência (Tabela 4), extraído do banco de dados do NCBI, utilizando o programa MAUVE versão 2.4.0 (Darling et al., 2004).

**Tabela 4** - Cepas bacterianas utilizadas para a análise filogenética

<b>Espécie</b>	<b>Cepa</b>	<b>Genoma referência</b>	<b>Acesso Genbank</b>
<i>Bacillus velezensis</i>	CT02	<i>B. velezensis</i> JS25R	RefSeq GCF_000769555.1
<i>Paenibacillus ottowii</i>	LIS04	<i>P. ottowii</i> MS2379	RefSeq GCF_006874425.1
<i>Bacillus velezensis</i>	IM14	<i>B.velezensis</i> JS25R	RefSeq GCF_000769555.1
<i>Bacillus velezensis</i>	LIS05	<i>B.velezensis</i> JS25R	RefSeq GCF_000769555.1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	IPR45	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	RefSeq GCF_000006765.1

#### **4.7 Utilização de bactérias antagonistas em mistura e combinadas com fungicida químico para suprimir *Fusarium verticillioides* in vivo**

##### **4.7.1 Testes de compatibilidade**

Os isolados de *Bacillus* (IM14, CT02 e LIS05), de *Paenibacillus* sp. LIS04 e *P. aeruginosa* IPR45 foram submetidos ao teste de compatibilidade entre eles e compatibilidade com o fungicida químico Fludioxonil + Metalaxyl-M com objetivo de selecionar microrganismos que pudessem ser utilizados em combinação no tratamento de sementes de milho em casa de vegetação e campo.

##### **4.7.1.1 Testes de compatibilidade entre as bactérias antagonistas**

Para avaliação da compatibilidade entre as bactérias, elas foram crescidas em Caldo Triptona Soja TSB (Kasvi, Brasil), sob agitação por 24 h a 28 °C. Após esse tempo, as suspensões bacterianas foram inoculadas em pares em placas de Petri contendo meio Agar Triptona de Soja TSA (Kasvi, Brasil). Todas as combinações foram testadas, de modo que cada isolado foi emparelhado com todos os outros. Foram avaliadas duas formas de inoculação para cada isolado, a suspensão bacteriana aplicada em forma de gota de 20 µl na superfície do meio ou espalhada na superfície com auxílio de alça de Drigalski. Após incubação a 28 °C por cinco dias, as placas foram inspecionadas quanto a presença de halo de inibição de crescimento em torno dos pontos de cruzamento (*spots*) indicativo de incompatibilidade entre o par em análise.

##### **4.7.1.2 Testes de compatibilidade das bactérias antagonistas com fungicida químico**

Na avaliação da compatibilidade entre os isolados bacterianos com o fungicida Fludioxonil + Metalaxyl-M foram utilizados o método espectrofotométrico *in vitro*

(Chennakesavulu et al., 2013) e o método de disco de papel, também denominado de "técnica de zona de inibição" (Mohidin et al., 2013).

As bactérias foram crescidas em Caldo Triptona Soja TSB (Kasvi, Brasil), sob agitação de 180 rpm por 24 h a 28 °C. Após esse tempo, suspensões bacterianas foram ajustadas para uma densidade ótica a 540 nm de 0,1, de forma a obter uma concentração celular de  $10^8$  UFC/mL.

Para testar a compatibilidade com fungicida utilizando o método espectrofotométrico, suspensões bacterianas ajustadas foram dispensadas em 50 mL de meio TSB contendo diferentes concentrações de fungicidas (50 ppm, 100 ppm, 1000 ppm). Os frascos inoculados foram incubados a 28 °C e a 180 rpm em agitador orbital por 24 h, quando procedeu-se a leitura da absorbância a 540 nm em espectrofotômetro. Cada tratamento foi replicado três vezes.

No teste de disco de papel, foram usadas as mesmas doses do fungicida Fludioxonil + Metalaxyl-M, 50 ppm, 100ppm e 1000 ppm. Placas contendo meio Agar Triptona de Soja TSA (Kasvi, Brasil) foram preparadas e suspensões bacterianas ( $10^8$  UFC/mL) foram espalhadas na superfície do meio utilizando uma alça de Drigalsky. Discos de 5 mm de papel mergulhados nas soluções com diferentes concentrações do fungicida foram colocados em quatro pontos equidistantes da placa; o controle negativo foi feito por disco de papel mergulhado em água destilada. As placas foram incubadas a 28 °C e avaliadas a partir de 96 h quanto a presença de zonas de inibição de crescimento no entorno dos discos. O experimento foi replicado três vezes.

#### **4.7.2 Preparo das suspensões bacterianas e de esporos de *Fusarium verticillioides* para os testes *in vivo***

Para a preparação da suspensão bacteriana, um pré inóculo foi produzido adicionando uma colônia isolada de cada bactéria crescida em meio Agar Triptona de Soja TSA (Kasvi, Brasil) em 50 mL de meio Luria Bertani LB (Kasvi, Brasil) contendo por litro: 10 g de peptona, 5 g de extrato de levedura, 5 g de cloreto de sódio, pH 7,4 a 25°C + sais (composição por litro: 0,02 g de sulfato ferroso heptahidratado  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,3 g de sulfato de magnésio heptahidratado  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,02 g de sulfato de manganês monohidratado  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0,02 g de sulfato de zinco heptahidratado  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), a incubação foi feita a 28 °C por 72 h, sob agitação a 180 rpm. Após esse tempo, o pré inóculo foi transferido para 500 mL do mesmo meio e incubado sob as mesmas condições. Por fim, a cultura foi centrifugada a 12.000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e a massa celular bacteriana foi ressuspendida em

solução 0,8% NaCl (w/v) e ajustada em espectrofotômetro para obter  $10^8$  UFC. mL<sup>-1</sup>. Para a produção do filtrado de *P. aeruginosa* (FPA), foram utilizadas as mesmas condições descritas anteriormente, porém o sobrenadante obtido após o crescimento do isolado foi coletado e filtrado em membrana de 0,22 µm de poro. Após a filtração, o sobrenadante obtido foi plaqueado em meio Agar Triptona de Soja TSA (Kasvi, Brasil) para a confirmação que estava isento de células de *P. aeruginosa*.

Para o preparo da suspensão de esporos de *F. verticillioides*, frascos Erlenmeyers (500 mL) contendo 100 mL de meio caldo de Batata Dextrose (BD) foram inoculados com discos de 6 mm do micélio do fitopatógeno obtidos de culturas monospóricas cultivadas em Agar Batata Dextrose (BDA) por 5 dias. O meio caldo de batata foi incubado a 28 °C por 72 h em um agitador orbital a 180 rpm. Após isso, as suspensões foram filtradas em gaze para remover os micélios e a concentração de esporos foi determinada usando uma câmara de Neubauer. Suspensões foram diluídas em 0,8% NaCl (w/v) para se obter  $10^6$  esporos/mL.

#### **4.7.3 Testes de inibição de *Fusarium verticillioides* em casa de vegetação**

##### **4.7.3.1 Inoculação dos isolados bacterianos e *Fusarium verticillioides* nas sementes**

Para os experimentos em casa de vegetação foram utilizados os isolados do gênero *Bacillus* (IM14, CT02 e LIS05), *Paenibacillus* sp. LIS04, *P. aeruginosa* IPR45 e seu filtrado (FPA).

Sementes de milho BRS Caimbé reconhecidamente suscetível a *F. verticillioides* foram desinfestadas na superfície submergindo-as em hipoclorito de sódio a 3% por 3 minutos e em seguida em etanol a 70% durante 2 minutos. As sementes foram lavadas em água estéril três vezes e colocadas em papéis de filtro estéreis para secar por 30 minutos antes das inoculações com o fitopatógeno e/ou com o agente de controle biológico.

O tratamento biológico das sementes foi realizado de acordo com Cavaglieri et al. (2005) com modificações. As sementes de milho foram colocadas por 2 horas nas misturas das suspensões dos antagonistas e do fitopatógeno em proporções iguais, preparadas conforme descrito anteriormente, sob agitação lenta (80 rpm). Em seguida, o excesso de inóculo foi descartado, as sementes foram misturadas com adesivo para inoculantes Biomafix e secas em câmara de fluxo laminar.

Os controles consistiram nas sementes colocadas em suspensões contendo apenas conídios de *F. verticillioides* ( $1 \times 10^6$  conídios por mL) ou em solução salina 0,8% NaCl (w/w).

Para o tratamento químico das sementes, o fungicida Fludioxonil + Metalaxyl-M foi adicionado nas sementes na concentração de 1000 ppm de acordo com as recomendações do fabricante.

#### **4.7.3.2 Delineamento experimental**

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação da Embrapa Milho e Sorgo, em Sete Lagoas, MG. Foram utilizados vasos de 20 kg de capacidade, preenchidos com solo do tipo Latossolo Vermelho distrófico típico.

No teste de combinação entre bactérias, os tratamentos consistiram na inoculação das sementes com os isolados bacterianos de forma individual e combinações de todas as bactérias compatíveis mais inóculo de *F. verticillioides*. Como controle foi utilizado solução salina 0,8% NaCl (w/w) com adição (CFv) e sem adição de inóculo de *F. verticillioides* (C). Além de um controle adicional contendo o fungicida Fludioxonil + Metalaxyl-M mais inóculo de *F. verticillioides* (MFv). Para esse experimento foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado com treze tratamentos e três repetições.

Para o teste de combinação das bactérias com o fungicida químico, os tratamentos consistiram na inoculação das sementes com os isolados bacterianos mais *F. verticillioides* sem o fungicida Fludioxonil + Metalaxyl-M (SFM) ou combinadas com fungicida Fludioxonil + Metalaxyl-M (CFM). Como controle foi utilizado solução salina 0,8% NaCl (w/w) com inoculação de *F. verticillioides* (Fv) ou sem adição do fitopatógeno (Controle) em combinação com o fungicida Fludioxonil + Metalaxyl-M (CFM) ou sem a presença do fungicida (SFM). Para esse experimento foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado disposto em um arranjo fatorial 7 x 2 (tratamentos x presença ou ausência de fungicida) com 3 repetições.

#### **4.7.3.3 Avaliação da doença**

A capacidade dos isolados de prevenir a podridão de sementes e mortalidade de plântulas jovens foi avaliada 20 dias após o plantio. De acordo com a fórmula: TG (%):  $(NGG / NGP) \times 100\%$ , sendo NGG: o número de grãos germinados e NGP: o número total de grãos plantados por vaso. Após 30 dias foram avaliados os seguintes parâmetros: altura de planta (medida do solo à ponta da última folha totalmente aberta); diâmetro do colmo; massa seca da parte aérea (MSPA), que corresponde a parte aérea das plantas acondicionadas em sacos de papel e colocadas em estufa a 60 °C até peso constante) e massa seca do sistema radicular



(MSR), que corresponde as raízes acondicionadas em sacos de papel e colocadas em estufa a 60 °C até peso constante.

#### **4.7.4 Testes de inibição de *Fusarium verticillioides* em campo**

Os experimentos em campo foram conduzidos na Embrapa Milho e Sorgo, em Sete Lagoas, MG na safra 2021/2022 em um Solo do tipo Latossolo Vermelho distrófico típico. Para o plantio foram utilizadas sementes de milho BRS Caimbé.

Foram realizadas adubações de plantio utilizando 400 kg/ha da formulação 8-28-16 (N-P-K) e adubações de cobertura utilizando 200 kg/ha de uréia aos 23 e 34 dias após o plantio. O delineamento experimental foi o de blocos casualizados com quatro repetições. As parcelas foram compostas por 4 linhas de 5 metros espaçadas em 0,7 metros entre si. Como testemunhas foram mantidas parcelas não inoculadas.

Para avaliar a capacidade dos isolados de controlar *F. verticillioides* em campo foram testadas duas formas de inoculação do fitopatógeno e dos antagonistas na planta, aplicação nas sementes e injeção no colmo.

##### **4.7.4.1 Inoculação dos antagonistas e de *Fusarium verticillioides* nas sementes**

A inoculação dos antagonistas bacterianos e de *F. verticillioides* nas sementes foi feita conforme descrito no teste em casa de vegetação. Como tratamentos foram utilizados os isolados bacterianos ou o filtrado de *P. aeruginosa* (FPA) de forma individual, além das melhores combinações obtidas em casa de vegetação entre bactérias e combinações de bactérias com fungicida Fludioxonil + Metalaxyl-M. Como controles foi utilizada solução salina 0,8% NaCl (w/w) com adição e sem adição de inóculo de *F. verticillioides*, além de um controle adicional contendo o fungicida Fludioxonil + Metalaxyl-M para tratamento das sementes. Ao final do ciclo, cerca de 180 dias após o plantio, foi realizada a colheita dos grãos de toda área útil das parcelas e avaliado o peso de grãos e umidade para o cálculo da produtividade.

##### **4.7.4.2 Inoculação dos antagonistas e de *Fusarium verticillioides* no colmo do milho**

Aos 60 dias após a semeadura foi realizada a inoculação do fitopatógeno *F. verticillioides* e dos agentes antagonistas no colmo das plantas. Suspensões bacterianas e suspensões do fitopatógeno foram preparadas conforme descrito anteriormente (item 2.2) e

misturadas em proporções iguais. Para a inoculação, palitos de dente estéreis foram colocados nas misturas antagonista-patógeno, e em seguida, foram introduzidos no colmo das plantas.

Para esse experimento foram utilizados os isolados bacterianos ou o filtrado de *P. aeruginosa* (FPA) de forma individual e as melhores combinações entre bactérias obtidas na casa de vegetação. Os controles consistiram em injeção no colmo de solução salina 0,8% NaCl (w/w) ou somente de suspensão de esporos de *F. verticillioides*, além de um controle adicional contendo o fungicida Fludioxonil + Metalaxyl-M utilizado para o tratamento de sementes. Após 30 dias da inoculação, a severidade da podridão do colmo foi avaliada segundo escala de notas descrita por Nicoli et al. (2015).

## **4.8 Testes de promoção de crescimento vegetal pelas bactérias antagonistas**

### **4.8.1 Caracterização dos isolados quanto a produção de fatores de promoção de crescimento vegetal *in vitro***

#### **4.8.1.1 Produção de hormônio ácido indolacético (AIA)**

Para a avaliação da produção de AIA pelos isolados foi utilizado a metodologia descrita por Sarwar e Kremer (1995) com algumas modificações. Em microplaca Deep Well estéril foram adicionados 5 µL dos inóculos padronizados ( $10^8$  UFC/mL) em 1 mL de meio Caldo Triptona Soja TSB (Kasvi, Brasil) suplementado com DL-triptofano na concentração de 1,0 mg mL<sup>-1</sup>. A inoculação foi feita em triplicata para cada isolado e mais três poços contendo somente o meio de cultura Caldo Triptona Soja TSB (Kasvi, Brasil) com DL- triptofano foram incluídos no teste como um controle negativo. As amostras foram incubadas no escuro a 30 °C sob agitação por 5 dias. Após o período de incubação, as placas foram centrifugadas a 12.000g por 15 minutos. Com o auxílio de micropipeta, 100 µL do sobrenadante foram transferidos para microplaca de 96 poços e, em seguida, foram adicionados 100 µL do reagente Salkowski (49 mL de ácido perclórico a 35% (v/v) e 1 mL de FeCl<sub>3</sub> 0,5 M), conforme protocolo descrito por Gordon e Weber (1951). As amostras foram incubadas em temperatura ambiente, no escuro por 20 minutos e o resultado positivo foi evidenciado pela formação da coloração rósea. A concentração de AIA foi estimada por meio da leitura da OD a 530 nm em espectrofotômetro UV/VIS (FLUOstar Omega, BMG LABTECH, Alemanha). Uma curva padrão foi feita a partir de AIA comercial nas concentrações 0; 10; 20; 40; 80 e 100 µg mL<sup>-1</sup> para se determinar por comparação a concentração de AIA obtida no meio de cultura. Segundo Kavamura et al. (2013),

a produção de AIA pode ser classificada de acordo com a concentração detectada, sendo: baixa ( $<1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), média (1 a  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), alta ( $11-50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), elevada ( $> 51 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ).

#### 4.8.1.2 Fixação de Nitrogênio

Os isolados foram avaliados quanto à capacidade de fixação de nitrogênio pelo crescimento e formação de película em meio semi-sólido NFb livre de nitrogênio (Kim et al., 2012). O meio é composto por: 5,0 g de ácido málico, 0,6 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,4 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,01 g de  $\text{MnSO}_4$ , 0,05 g de  $\text{MgSO}_4$ , 0,02 g de  $\text{NaCl}$ , 0,002 g de  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ , 2 ml de azul de bromotimol (0,5% em álcool) como indicador, 1,75 g de ágar e pH ajustado para 6,6 - 7,0. Uma alçada contendo culturas bacterianas dos isolados foram inoculadas em triplicada no meio livre de N e dois controles positivos de *Azospirillum* (CP23 e CP34) foram incluídos. Frascos contendo meio estéril e sem inoculação foram usados como controle negativo. Os tubos foram incubados a  $28^\circ\text{C}$  por 7 dias. Mudança de cor no ágar de verde para verde azul ou azulado e formação de película foi registrado como positivo para a atividade de fixação de nitrogênio.

#### 4.8.1.3 Solubilização e mineralização de fosfatos

Alíquotas de  $100 \mu\text{L}$  da cultura dos isolados padronizadas a  $10^8$  UFC/mL foram inoculadas em triplicata nos meios de cultura sólido NIBRIP [10 g de glicose, 5 g de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , 5 g de  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,25 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,2 g de  $\text{KCl}$  e 0,1 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ] (Nautiyal, 1999) e no meio Fitato (Richardson et al., 2001), contendo fonte de P na forma de fosfato tricálcico e fitato de sódio, respectivamente. Os meios inoculados foram incubados a  $28^\circ\text{C}$  durante 10 dias para visualização do halo transparente em torno das colônias, indicativo de solubilização/mineralização de P. Os experimentos foram realizados em triplicata e o controle negativo constituiu-se do meio de cultivo sem inóculo.

O diâmetro do halo de solubilização, percebido como uma área translúcida em torno da colônia, foi medido utilizando-se um paquímetro digital. O resultado obtido foi expresso pelo Índice de Solubilização por meio da fórmula:  $\text{IS} = \phi \text{ Halo (mm)} / \phi \text{ Colônia (mm)}$ . Os isolados foram classificados como estirpes de baixa solubilização  $\text{IS} < 2$ , média  $2 \leq \text{IS} \leq 4$  e alta solubilização  $\text{IS} > 4$  (Berraquero et al., 1976).

#### 4.8.1.4 Produção de amônia

Todos os isolados bacterianos foram testados quanto à produção de amônia em caldo peptona, conforme descrito por Cappuccino e Sherman (1992). Os isolados bacterianos recém crescidos e padronizados a  $10^8$  UFC/mL foram inoculados em 10 mL de água peptonada e incubados por 48 h a 28 °C. Após a incubação, 0,5 mL do reagente de Nessler (solução alcalina de tetraiodomercurato (II) de potássio) foi adicionado em cada tubo. A produção foi detectada qualitativamente pela mudança da cor amarelo claro para marrom escuro. A cor amarela fraca indica uma pequena quantidade de amônia produzida e a cor amarela escura a marrom indica máxima produção de amônia (Dey et al., 2004).

#### **4.8.1.5 Formação de biofilme**

A capacidade de formação de biofilme foi avaliada pelo método de Stepanović et al. (2007) com modificações. Alíquotas de 2  $\mu$ L da cultura dos isolados padronizadas a  $10^8$  UFC/mL foram inoculadas em 200  $\mu$ L de Caldo Triptona Soja TSB (Kasvi, Brasil), preparado com 1% de glicose em uma microplaca de poliestireno em triplicata, com um controle contendo apenas o meio de cultura TSB. A placa foi incubada a 30 °C por 48 h. Após esse tempo, o líquido foi removido por meio de inversão, os poços foram lavados três vezes com água destilada e a placa foi colocada invertida sobre papel toalha para a drenagem completa. Posteriormente, foi adicionado em cada poço 200  $\mu$ L de metanol para fixar o biofilme eventualmente presente. Após 20 minutos, o metanol foi removido e a placa deixada em temperatura ambiente para secagem. Em seguida, foram adicionados 200  $\mu$ L de uma Solução Cristal Violeta 0,5% em cada poço. Após 15 minutos de contato, o corante foi removido por meio de inversão, os poços foram lavados com água destilada e a placa deixada em temperatura ambiente para a secagem. Por fim, foram adicionados 200  $\mu$ L de etanol absoluto e aguardado o tempo de 30 minutos em seguida, foi feita a leitura das placas em um espectrofotômetro UV/VIS (FLUOstar Omega, BMG LABTECH, Alemanha) a 570 nm.

Foram considerados produtores de biofilme os microrganismos capazes de reter a coloração violeta e a classificação foi feita com base nos valores de densidade óptica obtidos. Sendo classificados como: não formadores ( $Doa \leq Docn$ ); fracamente formadores ( $Docn \leq Doa \leq 2x Docn$ ); moderadamente formadores ( $2x Docn < Doa \leq 4x Docn$ ) ou fortemente formadores ( $4x Docn < Doa$ ). Sendo: Doa = Densidade óptica da absorbância e Docn = Densidade óptica do controle negativo.

#### **4.8.1.6 Produção de exopolissacarídeos (EPS)**

A avaliação da capacidade de produção de EPS pelos isolados foi realizada de acordo com a metodologia de Paulo et al. (2012) utilizando o meio de cultura composto por 50 g/L de sacarose, 20 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de MgSO<sub>4</sub>, 0.01 g/L de NaCl, 0.01 g/L de FeSO<sub>4</sub>, 0.01 g/L de Mn SO<sub>4</sub>, 0.02 g/L de CaCl<sub>2</sub> e 20 g/L de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,5 (Guimarães et al., 1999). Discos de 5 mm de diâmetro de papel filtro (Whatman 42) esterilizados foram transferidos para o meio de cultura e inoculados com 5 µL da cultura bacteriana padronizada a 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup> crescida em meio Caldo Triptona Soja TSB (Kasvi, Brasil). As placas foram incubadas a 30 °C por 24 h e a produção de EPS foi avaliada pela ausência ou presença de colônia mucosa ao redor dos discos.

A presença de um material translúcido ou cremoso envolvendo a colônia é um indicativo do potencial de produção de EPS. A confirmação da produção de EPS é realizada por meio da mistura de uma alça de platina impregnada com a colônia em 2 mL de etanol absoluto, sendo considerada a formação de precipitado como resultado positivo e a presença de turbidez como resultado negativo.

#### **4.8.2 Testes de promoção de crescimento de milho em casa de vegetação pelas bactérias antagonistas**

Os isolados de *Bacillus* IM14, CT02 e LIS05, *Paenibacillus* sp. LIS04, *P. aeruginosa* IPR45 e seu filtrado (FPA) foram testados quanto seu potencial em promover o crescimento de plantas de milho em casa de vegetação da Embrapa Milho e Sorgo, em Sete Lagoas, MG.

Sementes de milho BRS Caimbé desinfestadas foram colocadas por 2 horas nas suspensões bacterianas preparadas conforme descrito no ítem 4.7.2, sob agitação lenta (80 rpm). Em seguida, o excesso de inóculo foi descartado, as sementes foram misturadas com adesivo para inoculantes Biomafix e secas em fluxo laminar. Em seguida, foram plantadas em vasos de 20 kg de capacidade, preenchidos com solo do tipo Latossolo Vermelho distrófico típico.

Os tratamentos consistiram na inoculação das sementes com os isolados bacterianos individualmente e com as combinações de todas as bactérias que apresentaram compatibilidade em teste realizado anteriormente. Como controle (C) foi utilizado solução salina 0,8% NaCl (w/w). Para esse experimento foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado com treze tratamentos e três repetições.

Após 30 dias foram avaliados os seguintes parâmetros: altura de planta (medida do solo à ponta da última folha totalmente aberta); diâmetro do colmo; massa seca da parte aérea (MSPA), que corresponde a parte aérea das plantas acondicionadas em sacos de papel e

colocadas em estufa a 60 °C, até peso constante), massa seca do sistema radicular (MSR), que corresponde as raízes acondicionadas em sacos de papel e colocadas em estufa a 60 °C, até peso constante e massa seca total, que corresponde a soma da MSPA e MSR.

#### **4.9 Análises estatísticas**

Os resultados obtidos em todos os testes foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo programa computacional SISVAR versão 5.4 (Ferreira, 2011). A comparação das médias dos tratamentos foi realizada pelo teste de Scott Knott a 5% de significância ( $p < 0,05$ ).

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1 Identificação das bactérias isoladas de sementes de sorgo e atividade antifúngica contra *Fusarium verticillioides***

Oito bactérias foram isoladas de sementes de sorgo e testadas como antagonistas de *F. verticillioides* em condições *in vitro* e apresentaram valores de inibição do crescimento micelial de *F. verticillioides* entre 57,5% e 67,5%. As bactérias isoladas foram identificadas por comparação das sequências no banco de dados do Genbank como pertencentes aos gêneros *Paenibacillus* sp. e *Bacillus* sp., com valores de similaridade acima de 98%.

Diante dos inúmeros relatos sobre o potencial dessas espécies como antagonistas de diferentes fitopatógenos e promotores de crescimento vegetal, um isolado de *Paenibacillus* sp. LIS04 que apresentou 67,5% de inibição de *F. verticillioides* bem como o isolado de *Bacillus* sp. LIS05 que inibiu 57,5% foram escolhidos para serem incluídos nos testes juntamente com as bactérias isoladas de milho CT02, IM14 e IPR45, que foram selecionadas anteriormente pelo seu potencial de inibir *F. verticillioides in vitro* e casa de vegetação (Diniz et al., 2021).

### **5.2 Teste de antagonismo contra diferentes fitopatógenos do milho**

Os isolados antagonistas a *F. verticillioides* também exibiram altos percentuais de inibição de crescimento de cinco principais fungos fitopatógenos do milho: *Bipolaris* sp., *C. graminicola*, *F. graminearum*, *M. phaseolina* e *Stenorcapella* sp., com valores acima de 49% (Tabela 5). Em contraste, nenhuma zona de inibição foi vista na placa de controle, onde micélios

fúngicos cobriram toda a superfície da placa. Em geral, o isolado de *Bacillus* LIS05 apresentou estatisticamente as maiores porcentagens de inibição dos fitopatógenos (média geral de 76,4% de inibição), exceto para *Stenocarpella*, tendo o isolado IM14, inibido em maior proporção este fitopatógeno (Tabela 5). A maior porcentagem de inibição também ocorreu com o isolado (LIS05) contra o fungo *C. graminicola*, causador da antracnose do milho (86,1%).

A maioria dos estudos envolvendo controle biológico começam avaliando a eficácia de um único agente de biocontrole contra um único fitopatógeno (Li et al. 2011; Köberl et al. 2013). Porém, sabe-se que em condições naturais, várias doenças diferentes ocorrem frequentemente na mesma cultura durante seu ciclo. Portanto, a avaliação dos isolados selecionados neste trabalho quanto ao potencial de inibir *F. verticillioides* e outros patógenos do milho, pode contribuir para a seleção de agentes com eficiência multissítio, sendo eficazes contra diferentes patógenos causadores de doenças de plantas. Em etapas visando avaliar a eficiência em campo, esses isolados, especialmente *Bacillus* sp., LIS05 e IM14, devem ser testados em plantas infectadas com estes patógenos.

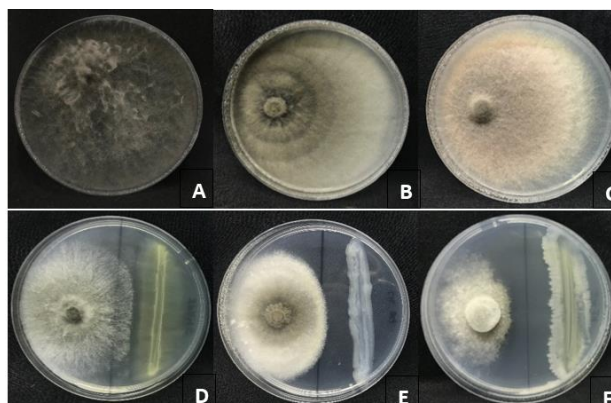
**Tabela 5** - Zona de inibição (ZI%) do crescimento *in vitro* de cinco fitopatógenos pelas bactérias antagonistas em comparação ao crescimento na placa controle (placas contendo somente o fitopatógeno).

Isolado	<i>Bipolaris</i> sp.	<i>Colletotrichum</i> <i>graminicola</i>	<i>Fusarium</i> <i>graminearum</i>	<i>Macrophomina</i> <i>phaseolina</i>	<i>Stenocarpella</i> sp.
ZI* (%)					
LIS04	62,7 cB	69,1dA	49,0 cD	54,5 dC	71,6 dA
LIS05	75,8 aB	86,1 aA	73,9 aB	66,6 aC	78,3 bB
CT02	68,3 bA	71,1 dA	69,6 aA	58,1 cB	66,6 eA
IPR45	64,1 cC	74,4 cA	70,3 aB	57,5 cD	75,0 cA
IM14	69,1 Bb	81,6 bA	63,6 bD	64,8 bC	81,3 aA

\*Zona de inibição calculada pela fórmula  $ZI\% = (N1 - N2) \times 100 / N1$ , sendo: N1= raio do micélio encontrado na ausência do antagonista; N2= raio do micélio na presença do antagonista. Médias seguidas pela mesma letra na coluna ou na linha não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ). LIS04: *Paenibacillus* sp.; LIS05: *Bacillus* sp.; IM14 e CT02: *Bacillus velezensis*; IPR45: *Pseudomonas aeruginosa*.

Um efeito interessante observado foi que alguns isolados também foram ativos em inibir a produção de pigmentos escuros nas hifas dos patógenos *M. phaseolina*, *Bipolaris* sp. e *C. graminicola* (Figura 2). Os isolados *B. velezensis* IM14, *Paenibacillus* sp. LIS04 e *B. velezensis* CT02 apresentaram esse perfil no pareamento com *Bipolaris* sp., o isolado *P. aeruginosa* IPR45, no pareamento com *M. phaseolina* e os isolados *P. aeruginosa* IPR45 e *B. velezensis* IM14 no pareamento com *C. graminicola*.

Figura 2 - Efeito dos isolados antagonistas na produção de pigmentos escuros pelos fitopatógenos.



Crescimento nas placas controle dos fitopatógenos (A) *Macrophomina phaseolina*, (B) *Bipolaris* sp. e (C) *Colletotrichum graminicola*, com a produção de pigmentos escuros. Inibição da produção dos pigmentos escuros de *Macrophomina phaseolina* por *Pseudomonas aeruginosa* IPR45 (D); de *Bipolaris* sp. por *Paenibacillus* sp. LIS04 (E) e de *Colletotrichum graminicola* por *Bacillus velezensis* IM14 (F).

Sabe-se que os pigmentos, como a melanina, são relacionados à patogenicidade dos fungos (Butler et al., 2001), além de lhes conferir vantagens de sobrevivência e/ou adaptação em condições ambientais extremas (Nosanchuk & Casadevall, 2003). Fungos melanizados são mais resistentes à lise causada por enzimas degradantes da parede celular liberadas por outros microrganismos, especialmente no solo. Como foi demonstrado por Butler et al., (1989), a integridade celular de um fungo melanizado foi mantida na presença de altas concentrações de enzimas líticas durante vários dias, enquanto seus mutantes albinos (sem melanina) foram destruídos em questão de minutos. A melanização fúngica apresenta ainda muitas outras funções, incluindo fotoproteção, extinção de radicais livres, proteção contra estresse por calor e frio, quelação de metal e resistência à dessecação (Cordero & Casadevall, 2017). O controle do patógeno pela interferência no seu mecanismo de infecção no hospedeiro é uma estratégia mais interessante do que a intervenção em processos biológicos que são comuns a todos os organismos superiores, pois ocasiona menos efeitos para a planta hospedeira (Jennings et al., 2000). Dessa forma, a inibição da síntese de melanina é um importante mecanismo de controle utilizado pelos isolados nesse trabalho e constitui um alvo favorável para a seleção de antagonistas para o desenvolvimento de novos biofungicidas com vários alvos.

### 5.3 Atividade antifúngica dos metabólitos secundários pelo método de microdiluição

A atividade antifúngica dos extratos brutos das 5 bactérias, pelo método de microdiluição em placa possibilitou estabelecer a menor concentração capaz de inibir o



crescimento de *F. verticillioides* em pelo menos 50% (Tabela 7). No geral, foi observada atividade antifúngica contra *F. verticillioides* dos extratos obtidos a partir do crescimento das 5 bactérias em todos os quatro meios de cultura utilizados. No entanto, os percentuais de inibição nas diferentes concentrações dos extratos brutos variaram com o meio usado em sua obtenção (Tabela 6).

Quando foi utilizado o meio TSB para crescimento dos isolados, o extrato bruto de *B. velezensis* CT02 apresentou a maior porcentagem de inibição (45,3%) na menor concentração utilizada (0,3%). Na concentração máxima do extrato (100%) do meio TSB, o isolado de *P. aeruginosa* IPR45 apresentou maior inibição entre todos os isolados, inibindo o crescimento de *F. verticillioides* em 94,1%.

Todos os isolados produziram extratos brutos com valores de inibição menores que 14% na menor dose testada (0,3%), quando cultivados em meio caldo de Batata Dextrose (BD). Na maior dose do extrato (100%), os isolados da espécie *B. velezensis* IM14 e CT02 foram os que apresentaram os maiores valores de inibição de *F. verticillioides* (97,4% e 81%, respectivamente).

Nos testes utilizando o extrato produzido a partir do cultivo em meio de LB+G, *Bacillus* sp. LIS05 apresentou o maior valor de inibição de *F. verticillioides* na menor dose testada (0,3%) sendo de 26,6%. Utilizando a maior dose do extrato bacteriano (100%), o isolado *P. aeruginosa* IPR45 inibiu 98,4% do crescimento de *F. verticillioides*.

No meio de cultura Landy, utilizando a menor concentração (0,3%) do extrato bruto, os isolados de *Bacillus* LIS05, IM14 e CT02 inibiram o crescimento de *F. verticillioides* com valores acima de 35%. Na concentração de 50%, o extrato bruto dos isolados IM14 e LIS05 inibiram o crescimento de *F. verticillioides* em 100% e 98,7%, respectivamente. Na concentração de 100%, os isolados CT02 e IPR45 também apresentaram altos percentuais de inibição, correspondentes 96,7 e 87%, respectivamente.

**Tabela 6** - Percentual de inibição de *Fusarium verticillioides* por diferentes concentrações dos extratos brutos dos isolados bacterianos crescidos em meios TSB, BD, LB+G e Landy.

Meio	Isolado	Concentrações do extrato bruto bacteriano								
		0,3%	0,7%	1,5%	3,1%	6,2%	12,5%	25%	50%	100%
TSB	LIS04	4,1	4,1	4,3	4,3	4,3	5,1	6,4	15,0	53,9
	LIS05	21,2	35,1	39,5	42,0	43,6	46,6	47,0	50,6	76,8
	CT02	45,3	53,1	53,3	55,4	58,9	60,5	61,4	61,8	84,6
	IM14	27,8	41,4	49,8	51,2	54,3	56,9	57,0	61,0	85,5
	IPR45	10,7	12,7	19,3	21,2	31,1	46,1	74,4	94,0	94,1
BD	LIS04	2,3	2,6	2,6	5,0	9,2	17,6	28,7	48,9	60,0
	LIS05	13,9	18,6	30,6	38,0	41,9	47,4	62,2	64,5	75,7
	CT02	1,0	5,3	10,0	11,7	22,2	33,5	49,0	55,6	81,0
	IM14	0,0	4,6	14,1	21,5	30,7	40,1	43,8	81,7	97,4
	IPR45	3,7	8,1	12,8	19,7	22,6	25,2	31,5	43,3	51,3
LB+G	LIS04	6,2	6,9	8,1	9,4	9,7	11,1	11,3	26,9	62,5
	LIS05	26,6	27,8	36,8	37,3	43,0	43,4	48,4	57,7	63,4
	CT02	14,5	24,0	24,2	25,5	26,3	27,9	39,9	58,6	65,3
	IM14	15,4	17,9	19,4	23,0	23,3	23,3	45,6	63,1	71,5
	IPR45	12,3	13,0	13,7	14,2	23,4	38,7	56,5	83,9	98,4
Landy	LIS04	8,4	9,8	11,2	11,6	11,6	19,9	33,6	44,9	76,1
	LIS05	38,2	44,7	49,9	52,7	59,1	60,4	66,4	98,7	100,0
	CT02	35,5	44,8	50,9	55,7	61,3	67,7	70,2	80,5	96,7
	IM14	36,3	43,5	51,1	57,8	60,6	64,5	76,5	100,0	100,0
	IPR45	22,4	24,0	24,4	39,0	52,9	59,2	73,8	87,0	87,0

LIS04: *Paenibacillus* sp.; LIS05: *Bacillus* sp.; IM14 e CT02: *Bacillus velezensis*; IPR45: *Pseudomonas aeruginosa*. TSB = Caldo Triptona Soja, BD = caldo de Batata Dextrose, LB+G = Luria Bertani com glicose

Na escolha de linhagens produtoras de compostos com atividade biológica, é importante considerar a menor concentração dos compostos capazes de inibir o crescimento do patógeno em estudo, mesmo na etapa de testes usando extrato bruto. O resultado pode servir de base também para seleção do meio a ser usado na produção das moléculas bioativas se o objetivo é fazer uso de moléculas puras e não somente do microrganismo produtor na estratégia de controle biológico. Nesse sentido, foi feita uma comparação das menores concentrações dos extratos brutos necessárias para reduzir pelo menos 50% do crescimento de *F. verticillioides* no teste de microdiluição em placa (Tabela 7). Os valores encontrados variaram, tanto entre os isolados como nos meios de cultura utilizados. Os menores valores foram observados para os extratos de CT02 crescido no meio TSB (0,7%) e pelos isolados IM14 (1,5%), LIS05 (3,1%) e IPR45 (6,2%), crescidos em meio Landy. Para o isolado LIS04, independente do meio de cultura utilizado, a concentração de 100% do extrato foi necessária para inibir pelo menos 50% do crescimento de *F. verticillioides*. Em um trabalho de Zalila-Kolsi e colaboradores, (2016)

foram obtidos valores inibitórios mínimos de cerca de 0,6%, 0,8% e 1,1% dos extratos de *B. amyloliquefaciens* BLB369, *B. subtilis* BLB277 e *P. polymyxa* BLB267 respectivamente, que foram necessários para inibir 50% do crescimento de *F. graminearum*.

**Tabela 7** – Menores concentrações dos extratos brutos bacterianos necessárias para reduzir pelo menos 50% do crescimento de *Fusarium verticillioides* no teste de microdiluição em placa.

Isolado	Concentração inibitória (%)			
	TSB	BD	LB+G	Landy
LIS04 ( <i>Paenibacillus</i> sp.)	100	100	100	100
LIS05 ( <i>Bacillus</i> sp.)	50,0	25,0	50,0	3,1
CT02 ( <i>B. velezensis</i> )	0,7	50,0	50,0	1,5
IM14 ( <i>B. velezensis</i> )	3,1	50,0	50,0	1,5
IPR45 ( <i>P. aeruginosa</i> )	25,0	100,0	25,0	6,2

TSB = Caldo Triptona Soja, BD = caldo de Batata Dextrose, LB+G = Luria Bertani com glicose

Essa atividade diferenciada em função do meio de cultivo usado na produção de metabólitos antimicrobianos já foi descrita (Slininger e Shea-Wilbur, 1995; Slininger et al., 1996; Siddiqui e Shaukat, 2004). Os meios podem conter nutrientes capazes de aumentar ou suprimir a produção dos compostos bioativos. Isso sugere que os meios podem ter resultado na produção de moléculas bioativas distintas ou de mesmas moléculas em concentrações diferentes (Borowicz e Omer, 2000; Peighami-Ashnaei et al., 2009; Khan et al., 2020). Os extratos com maior atividade antifúngica foram produzidos por *B. velezensis* CT02 e IM14 nos meios TSB e Landy. Efeitos semelhantes da influência do meio de cultura foram descritos por Sun e colaboradores (2019), que obtiveram a maior produção de dois lipopeptídeos com propriedades antifúngicas, iturina e surfactina, no cultivo nos meios Landy e caldo de Batata Dextrose (BD), respectivamente. Além de Sawar e colaboradores (2018), analisando extratos brutos de diferentes espécies de *Bacillus* crescidas nos meios de cultivo LB e Landy contra diferentes patógenos fúngicos. Diversos estudos já mostraram que o meio Landy favorece a produção de lipopeptídeos, moléculas recorrentemente descritas entre a gama de moléculas bioativas produzidas pelas bactérias dos gêneros de nosso estudo (Landy et al., 1948; Sarwar et al., 2018).

#### 5.4 Identificação dos metabólitos secundários por UPLC-MS

A espectrometria de massa (MS) juntamente com métodos cromatográficos é amplamente utilizada para caracterizar e classificar compostos produzidos por microrganismos. Nesse trabalho, Cromatografia Líquida acoplado à Espectrometria de Massas (UPLC-MS) foi

utilizada para identificação dos metabólitos presentes nos extratos de maior atividade biológica obtidos de *Bacillus* IM14, CT02 e LIS05, *Paenibacillus* sp. LIS04 e *P. aeruginosa* IPR45.

Nos extratos bacterianos foram identificados diferentes biossurfactantes, que são um grupo estruturalmente diverso de metabólitos ativos de origem microbiana, classificados em glicolipídeos, lipopeptídeos, lipídios neutros, biossurfactantes poliméricos, ácidos graxos e fosfolipídios (Amaral et al., 2010; Cameotra et al., 2010; Pacwa-Płociniczak et al., 2011). Nos extratos de *Bacillus* foram identificadas diferentes isoformas de lipopeptídeos cíclicos (CLPs); sendo iturina, fengicina e surfactina detectados nos isolados IM14 e LIS05 e fengicina e surfactina em CT02 (Tabelas 8, 9 e 10; Apêndices A, B e C). Os CLPs contêm peptídeos hidrofílicos, de 7 aminoácidos para iturina e surfactina ou de 10 aminoácidos para fengicina, que estão ligados a uma cadeia de ácidos graxos. O comprimento da cadeia de ácidos graxos pode variar de C-13 a C-16 para surfactinas, de C-14 a C-17 para iturinas, e de C-14 a C-18 para fengicinas, dando diferentes compostos homólogos e isômeros para cada lipopeptídeo (Delcambe, 1965; Vanittanakom et al., 1986).

De acordo com a revisão realizada por Raaijmakers e colaboradores (2010), a biossíntese de alguns lipopeptídeos, como as iturinas, parece estar limitada a algumas espécies de *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus*), ao passo que a produção da surfactina e fengicina é mais difundida entre as várias espécies do gênero, incluindo *B. coagulans*, *B. pumilus*, *B. licheniformis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mojavensis*, *B. megaterium* e *B. polyfermenticus*. Há um número limitado de relatos de espécies de *Bacillus* spp. co-produtores dos três lipopeptídeos citados (Kim et al., 2010; Plaza et al., 2015). A produção das três classes de LPC também já foi descrita para a espécie *B. velezensis*, incluindo as isoformas C12-C17 (Zerouh et al., 2014; Salvatierra-Martinez et al., 2018; Stoll et al., 2021). As moléculas bioativas mais importantes de *Bacillus* sp. são os CLPs, uma classe importante de biossurfactantes com atividades antifúngicas. Os CLPs de *Bacillus* sp. São conhecidos por terem forte atividade antifúngica em fungos fitopatogênicos, o qual penetram nas membranas celulares, formam canais de poros iônicos e podem causar até mesmo a morte celular (Ongena e Jacques, 2008, Fira et al., 2018). Os isolados de *Bacillus* desse trabalho exibiram um efeito diretamente antagônico contra *F. verticillioides* e outros fitopatógenos, no qual possivelmente os CLPs possivelmente tiveram um papel importante.

Por sua vez, nos extratos de *Paenibacillus* sp. LIS04 foram identificados diferentes polimixinas (Tabela 11; Apêndice D). O efeito benéfico dessa espécie na proteção de plantas contra fungos patogênicos já foi descrito e atribuído a produção de polimixinas e fusaricidinas (Luo et al., 2018; Li & Chen, 2019). Hsu et al., (2017) relataram atividade da polimixina contra

6 espécies de *Fusarium* associados a culturas como banana, tomate, melão, ervilha, trigo e milho, incluindo *F. verticillioides*. Os autores descreveram efeitos negativos da polimixina na germinação de conídios e alterações na integridade da membrana celular de *Fusarium*. Esse lipopeptídeo possui ainda atividade antibacteriana especialmente contra bactérias Gram-negativas (Xu et al., 2018).

Nos extratos de *P. aeruginosa* IPR45 foram identificados, através do UPLC-MS, diferentes quinolonas e ramnolipídeos (Tabela 12; Apêndice E), que são biossurfactantes da classe dos glicolipídeos (Borah et al., 2016, Chopra et al., 2020). Foram detectados, biossurfactantes do tipo diramnolipídios (Rha2-C10-C8; Rha2-C10-C10; Rha2-C10-C12). *Pseudomonas aeruginosa* produz até seis tipos de ramnolipídeos, que possuem estrutura química e atividade superficial similares, sendo produtora, principalmente, de monoramnolipídeos do tipo Rha-C10-C10 e diramnolipídeos do tipo Rha2-C10-C10. Esses resultados estão de acordo com o estudo de Ndlovu et al., (2017), em que cromatografia líquida de ultra desempenho (UPLC) acoplada a espectrometria de massa com ionização por eletrospray (ESI-MS) forneceu uma caracterização precisa e rápida dos ramnolipídios, especificamente os monoramnolipídios (Rha-C 12 -C 10 /Rha-C 10 -C 12; Rha-C 10 -C 10; Rha-C 10 -C 8 /Rha-C 10 -C 8 ) e os diramnolipídios (Rha-Rha-C 12 -C 10 /RhaRha-C 10 -C 12; Rha-Rha-C 10 -C 10; Rha-Rha-C 10 -C 8 /Rha-Rha-C 10 -C 8), produzidos por *P. aeruginosa*. Estes biossurfactantes apresentam crescente interesse devido a sua ampla gama de aplicações em biorremediação, produtos farmacêuticos, cosméticos e na agricultura devido às suas propriedades antibacterianas e antifúngicas (Thakur et al., 2021). Borah et al., (2016), avaliaram a eficácia de ramnolipídeos produzidos por *P. aeruginosa* SS14 como agentes antifúngicos contra *F. verticillioides* em testes *in vitro* e em campo. Os autores revelaram que a utilização de 50 mg l<sup>-1</sup> de RL-SS14 causou a inibição completa da podridão do colmo e da espiga no milho em uma única aplicação, além de melhorar o tempo de frutificação e a biomassa das plantas. Além dos ramnolipídeos, no extrato de *P. aeruginosa* IPR45 foram detectadas diferentes alquil-4 quinolonas, metabólitos bacterianos produzidos principalmente por *Pseudomonas* sp., que possuem propriedades antibióticas e que desempenham um papel fundamental na comunicação bacteriana e quórum sensing em *P. aeruginosa* (2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona).

**Tabela 8** - Identificação química dos lipopeptídeos de *Bacillus velezensis* IM14 em meio Landy por UPLC-qTOF-MS. Classes identificadas: iturinas, fengicinas e surfactinas

Nº pico	T (min)	Compostos	Fórmula molecular	íon <i>m/z</i>	Erro (ppm)	Fragmentos de íons <i>m/z</i>	Referências
1	12,44	Iturina A2	C <sub>48</sub> H <sub>74</sub> N <sub>12</sub> O <sub>14</sub>	1043,5535	0,4	299, 801, 915	YE et al., 2012
2	13,25	Iturina A3–A5	C <sub>49</sub> H <sub>76</sub> N <sub>12</sub> O <sub>14</sub>	1057,5995	1.2	-	SOUZA et al., 2018
3	13,61	C <sub>14</sub> Fengicina A	C <sub>70</sub> H <sub>107</sub> N <sub>12</sub> O <sub>20</sub>	718,3786[M+2H] <sup>+</sup>	1,4	966, 1080	Villegas-Escobar et al., 2018; SOUZA et al., 2018
4	14,06	C <sub>15</sub> Fengicina A	C <sub>71</sub> H <sub>108</sub> N <sub>12</sub> O <sub>20</sub>	725,3978[M+2H] <sup>+</sup>	-1.1	966, 1080	Villegas-Escobar et al., 2018; SOUZA et al., 2018
5	14,33	C <sub>15</sub> fengicina A	C <sub>71</sub> H <sub>108</sub> N <sub>12</sub> O <sub>20</sub>	725,3876[M+2H] <sup>+</sup>	0,7	966, 1080	Villegas-Escobar et al., 2018; SOUZA et al., 2018
6	14,47	C <sub>15</sub> fengicina A	C <sub>71</sub> H <sub>108</sub> N <sub>12</sub> O <sub>20</sub>	725,3871[M+2H] <sup>+</sup>	0,6	966, 1080	Villegas-Escobar et al., 2018; SOUZA et al., 2018
7	14,68	C <sub>16</sub> Fengicina A	C <sub>73</sub> H <sub>112</sub> N <sub>12</sub> O <sub>20</sub>	732,3933[M+2H] <sup>+</sup>	0,4	966, 1080	Villegas-Escobar et al., 2018; SOUZA et al., 2018
8	14,81	C <sub>16</sub> fengicina A	C <sub>73</sub> H <sub>112</sub> N <sub>12</sub> O <sub>20</sub>	732,3951[M+2H] <sup>+</sup>	0,9	966, 1080	Villegas-Escobar et al., 2018; SOUZA et al., 2018
9	15,04	C <sub>17</sub> Fengicina A	C <sub>72</sub> H <sub>110</sub> N <sub>12</sub> O <sub>20</sub>	739,3989[M+2H] <sup>+</sup>	1,8	966, 1080	Villegas-Escobar et al., 2018; SOUZA et al., 2018
10	15,11	C <sub>16</sub> Fengicina B	C <sub>74</sub> H <sub>114</sub> N <sub>12</sub> O <sub>20</sub>	746,4099[M+2H] <sup>+</sup>	0,2	994, 1108	Villegas-Escobar et al., 2018; SOUZA et al., 2018
11	15,26	C <sub>16</sub> fengicina B	C <sub>74</sub> H <sub>114</sub> N <sub>12</sub> O <sub>20</sub>	746,4023[M+2H] <sup>+</sup>	2,0	994, 1108	Villegas-Escobar et al., 2018; SOUZA et al., 2018
12	23,57	Surfactina	C <sub>51</sub> H <sub>89</sub> N <sub>7</sub> O <sub>13</sub>	1008,6647	-0,1	455, 667, 895	SOUZA et al., 2018
13	23,77	Surfactina	C <sub>52</sub> H <sub>91</sub> N <sub>7</sub> O <sub>13</sub>	1022,6728	2,1	582, 796, 909	SOUZA et al., 2018
14	23,96	Surfactina	C <sub>52</sub> H <sub>91</sub> N <sub>7</sub> O <sub>13</sub>	1022,6743	-0,8	582, 796, 909	SOUZA et al., 2018
15	24,53	Surfactina	C <sub>53</sub> H <sub>93</sub> N <sub>7</sub> O <sub>13</sub>	1036,6910	0,1	441, 685, 923	SOUZA et al., 2018

**Tabela 9** - Identificação química dos lipopeptídeos de *Bacillus* sp. LIS05 em meio Landy por UPLC-qTOF-MS. Classes identificadas: iturina, fengicinas e surfactinas.

Nº pico	(min)	Compostos	Fórmula molecular	íon m/z	Erro (ppm)	Fragmentos de íons m/z	Referências
1	12,44	Iturina A2	C <sub>48</sub> H <sub>74</sub> N <sub>12</sub> O <sub>14</sub>	1043,5519 [M+H] <sup>+</sup>	-0,7	299, 801, 915	YE et al., 2012
2	13,59	C <sub>14</sub> Fengicina A	C <sub>70</sub> H <sub>107</sub> N <sub>12</sub> O <sub>20</sub>	718,3793 [M+2H] <sup>+</sup>	2,4	966, 1080	Villegas-Escobar et al., 2018; SOUZA et al., 2018
3	14,44	C <sub>15</sub> Fengicina A	C <sub>71</sub> H <sub>108</sub> N <sub>12</sub> O <sub>20</sub>	725,3832 [M+2H] <sup>+</sup>	-0,3	966, 1080	Villegas-Escobar et al., 2018; SOUZA et al., 2018
4	14,79	C <sub>16</sub> Fengicina A	C <sub>73</sub> H <sub>112</sub> N <sub>12</sub> O <sub>20</sub>	732,3924 [M+2H] <sup>+</sup>	-1,1	966, 1080	Villegas-Escobar et al., 2018; SOUZA et al., 2018
5	15,05	C <sub>17</sub> Fengicina A	C <sub>72</sub> H <sub>110</sub> N <sub>12</sub> O <sub>20</sub>	739,4003 [M+2H] <sup>+</sup>	1,8	966, 1080	Villegas-Escobar et al., 2018; SOUZA et al., 2018
6	15,24	C <sub>16</sub> Fengicina B	C <sub>74</sub> H <sub>114</sub> N <sub>12</sub> O <sub>20</sub>	746,4094 [M+2H] <sup>+</sup>	0,7	994, 1180	Villegas-Escobar et al., 2018; SOUZA et al., 2018
7	15,79	C <sub>17</sub> Fengicina B	C <sub>75</sub> H <sub>116</sub> N <sub>12</sub> O <sub>20</sub>	753,4125 [M+2H] <sup>+</sup>	1,2	994, 1180	Villegas-Escobar et al., 2018; SOUZA et al., 2018
8	16,02	C <sub>16</sub> Fengicina B	C <sub>74</sub> H <sub>114</sub> N <sub>12</sub> O <sub>20</sub>	746,4079[M+2H] <sup>+</sup>	-1,3	994	Villegas-Escobar et al., 2018; SOUZA et al., 2018
9	21,49	C <sub>14</sub> Surfactina	C <sub>45</sub> H <sub>97</sub> N <sub>7</sub> O <sub>19</sub>	1040,6824 [M+H] <sup>+</sup>	0,6	685, 909, 1022	MA et al., 2016
10	22,35	C <sub>12</sub> Surfactina	C <sub>43</sub> H <sub>91</sub> N <sub>7</sub> O <sub>18</sub>	994,6488 [M+H] <sup>+</sup>	-1.1	685, 976	MA et al., 2016; Tang et al., 2010
11	22,61	Surfactina	C <sub>56</sub> H <sub>91</sub> N <sub>7</sub> O <sub>12</sub>	1054,6807 [M+H] <sup>+</sup>	0.3	441, 554	MA et al., 2016
12	22,98	Surfactina	C <sub>51</sub> H <sub>89</sub> N <sub>7</sub> O <sub>13</sub>	1008,6595 [M+H] <sup>+</sup>	-0,2	455, 667, 895	SOUZA et al., 2018
13	23,23	Surfactina	C <sub>51</sub> H <sub>89</sub> N <sub>7</sub> O <sub>13</sub>	1008,6614 [M+H] <sup>+</sup>	1,7	455, 667, 895	SOUZA et al., 2018
14	23,79	Surfactina	C <sub>52</sub> H <sub>91</sub> N <sub>7</sub> O <sub>13</sub>	1022,6766 [M+H] <sup>+</sup>	1,3	582, 796, 909	SOUZA et al., 2018
15	23,97	Surfactina	C <sub>52</sub> H <sub>91</sub> N <sub>7</sub> O <sub>13</sub>	1022,6741 [M+H] <sup>+</sup>	-1,2	582, 796, 909	SOUZA et al., 2018
16	24,28	Surfactina	C <sub>51</sub> H <sub>89</sub> N <sub>7</sub> O <sub>13</sub>	1008,6581 [M+H] <sup>+</sup>	-1,6	455, 667, 895	SOUZA et al., 2018
17	24,51	Surfactina	C <sub>53</sub> H <sub>93</sub> N <sub>7</sub> O <sub>13</sub>	1036,6913 [M+H] <sup>+</sup>	0,3	441, 685, 923	SOUZA et al., 2018
18	24,88	Surfactina	C <sub>53</sub> H <sub>93</sub> N <sub>7</sub> O <sub>13</sub>	1036,6910 [M+H] <sup>+</sup>	0,8	441, 685, 923	SOUZA et al., 2018

**Tabela 10** - Identificação química dos lipopeptídeos de *Bacillus velezensis* CT02 em meio TSB por UPLC-qTOF-MS. Classes identificadas: fengicinas e surfactinas.

Nº pico	(min)	Compostos	Fórmula molecular	íon m/z	Erro (ppm)	Fragmentos de íons m/z	Referências
1	13,57	C <sub>14</sub> Fengicina A	C <sub>70</sub> H <sub>107</sub> N <sub>12</sub> O <sub>20</sub>	718,3788 [M+2H] <sup>+</sup>	1,7	966, 1080	Villegas-Escobar et al., 2018; SOUZA et al., 2018
2	13,79	Linear C <sub>16</sub> Fengicina A	C <sub>72</sub> H <sub>114</sub> N <sub>12</sub> O <sub>20</sub>	741,3965 [M+2H] <sup>+</sup>	3,9	966, 1080	MA et al., 2016
3	13,94	Linear C <sub>16</sub> Fengicina A	C <sub>72</sub> H <sub>114</sub> N <sub>12</sub> O <sub>20</sub>	741,3937 [M+2H] <sup>+</sup>	0,1	966, 1080	MA et al., 2016
4	14,06	C <sub>15</sub> Fengicina A	C <sub>71</sub> H <sub>108</sub> N <sub>12</sub> O <sub>20</sub>	725,4003 [M+2H] <sup>+</sup>	2,3	966, 1080	Villegas-Escobar et al., 2018; SOUZA et al., 2018
5	14,47	C <sub>15</sub> Fengicina A	C <sub>71</sub> H <sub>108</sub> N <sub>12</sub> O <sub>20</sub>	725,3986 [M+2H] <sup>+</sup>	-3,7	966, 1080	Villegas-Escobar et al., 2018; SOUZA et al., 2018
6	14,77	C <sub>16</sub> Fengicina A	C <sub>72</sub> H <sub>110</sub> N <sub>12</sub> O <sub>20</sub>	732,3915 [M+2H] <sup>+</sup>	-2,3	966, 1080	Villegas-Escobar et al., 2018; SOUZA et al., 2018
7	15,09	C <sub>17</sub> Fengicina A	C <sub>72</sub> H <sub>110</sub> N <sub>12</sub> O <sub>20</sub>	739,3990 [M+2H] <sup>+</sup>	3,9	966, 1080	Villegas-Escobar et al., 2018; SOUZA et al., 2018
8	15,22	C <sub>16</sub> Fengicina B	C <sub>74</sub> H <sub>114</sub> N <sub>12</sub> O <sub>20</sub>	746,4111 [M+2H] <sup>+</sup>	2,9	966, 1080	Villegas-Escobar et al., 2018; SOUZA et al., 2018
9	15,77	C <sub>17</sub> Fengicina B	C <sub>75</sub> H <sub>116</sub> N <sub>12</sub> O <sub>20</sub>	753,4147 [M+2H] <sup>+</sup>	3,6	994, 1180	Villegas-Escobar et al., 2018; SOUZA et al., 2018
10	15,99	C <sub>16</sub> Fengicina B	C <sub>74</sub> H <sub>114</sub> N <sub>12</sub> O <sub>20</sub>	746,4069 [M+2H] <sup>+</sup>	-2,0	994	Villegas-Escobar et al., 2018; SOUZA et al., 2018
11	16,14	C <sub>17</sub> Fengicina A	C <sub>72</sub> H <sub>110</sub> N <sub>12</sub> O <sub>20</sub>	739,4049 [M+2H] <sup>+</sup>	-2,3	966, 1080	Villegas-Escobar et al., 2018; SOUZA et al., 2018
12	21,30	C <sub>14</sub> Surfactina	C <sub>45</sub> H <sub>97</sub> N <sub>7</sub> O <sub>19</sub>	1040,6825	0,7	685, 909, 1022	MA et al., 2016
13	21,46	C <sub>14</sub> Surfactina	C <sub>45</sub> H <sub>97</sub> N <sub>7</sub> O <sub>19</sub>	1040,6917	-0,1	685, 909, 1022	MA et al., 2016
14	22,32	C <sub>12</sub> Surfactina	C <sub>43</sub> H <sub>91</sub> N <sub>7</sub> O <sub>18</sub>	994,6500	0,1	685, 873, 976	MA et al., 2016; Tang et al., 2010
15	22,96	Surfactina	C <sub>51</sub> H <sub>89</sub> N <sub>7</sub> O <sub>13</sub>	1008,6611	1,4	455, 667, 895	SOUZA et al., 2018
16	23,58	Surfactina	C <sub>51</sub> H <sub>89</sub> N <sub>7</sub> O <sub>13</sub>	1008,6600	0,3	455, 667, 895	SOUZA et al., 2018
17	23,79	Surfactina	C <sub>52</sub> H <sub>91</sub> N <sub>7</sub> O <sub>13</sub>	1022,6726	-2,6	582, 796, 909	SOUZA et al., 2018
18	23,95	Surfactina	C <sub>52</sub> H <sub>91</sub> N <sub>7</sub> O <sub>13</sub>	1022,6714	-3,8	582, 796, 909	SOUZA et al., 2018



19	24,51	Surfactina	C <sub>53</sub> H <sub>93</sub> N <sub>7</sub> O <sub>13</sub>	1036,6929	1.8	441, 685, 923	SOUZA et al., 2018
----	-------	------------	--	-----------	-----	---------------	--------------------

**Tabela 11** - Identificação química dos lipopeptídeos de *Paenibacillus* sp. LIS04 em meio TSB por UPLC-qTOF-MS. Classe identificada: ciclopeptídeos.

Nº pico	(min)	Compostos	Fórmula molecular	íon <i>m/z</i>	Erro (ppm)	Fragmentos de íons <i>m/z</i>	Referências
1	10,29	Polimixina B <sub>4</sub>	C <sub>54</sub> H <sub>94</sub> N <sub>16</sub> O <sub>13</sub>	588,4128[M+2H] <sup>+</sup>	0,3	863,4481; 662,1880	Govaerts et al., 2002; Choi e al., 2009
2	12,36	Polimixina B <sub>6</sub>	C <sub>56</sub> H <sub>98</sub> N <sub>16</sub> O <sub>14</sub>	610,4254[M+2H] <sup>+</sup>	1,2	461,3480; 762,3284	Govaerts et al., 2002; Choi e al., 2009
3	12,95	Polimixina B <sub>2</sub>	C <sub>55</sub> H <sub>96</sub> N <sub>16</sub> O <sub>13</sub>	595,4012[M+2H] <sup>+</sup>	-0,9	863,5214; 662,2843	Govaerts et al., 2002; Choi e al., 2009
4	14,60	Polimixina B <sub>3</sub>	C <sub>55</sub> H <sub>96</sub> N <sub>16</sub> O <sub>13</sub>	595,4024[M+2H] <sup>+</sup>	-1,9	863,5263; 662,2541	Govaerts et al., 2002; Choi e al., 2009
5	17,46	Isoleucinapolimixina B <sub>1</sub>	C <sub>56</sub> H <sub>98</sub> N <sub>16</sub> O <sub>13</sub>	602,4215[M+2H] <sup>+</sup>	2,3	562,2509; 662,3380	Govaerts et al., 2002; Choi e al., 2009
6	18,59	Polimixina B <sub>1</sub>	C <sub>56</sub> H <sub>98</sub> N <sub>16</sub> O <sub>13</sub>	602,4301[M+2H] <sup>+</sup>	1,7	542,3284; 662,3248	Govaerts et al., 2002; Choi e al., 2009
7	19,73	Polimixina B <sub>5</sub>	C <sub>56</sub> H <sub>98</sub> N <sub>16</sub> O <sub>13</sub>	602,4286[M+2H] <sup>+</sup>	2,9	461,3014; 562,3881	Govaerts et al., 2002; Choi e al., 2009

**Tabela 12** - Identificação química dos lipopeptídeos de *Pseudomonas aeruginosa* IPR45 em meio Landy por UPLC-qTOF-MS. Classes identificadas: quinolonas e ramnolipídeos.

Nº pico	(min)	Compostos	Fórmula molecular	íon <i>m/z</i>	Erro (ppm)	Fragmentos de íons <i>m/z</i>	Referências
1	12,23	Isômero 2-( <i>E</i> -Non-4-enil)-4-quinolona	C <sub>16</sub> H <sub>19</sub> NO	242,1549	0,7	159	Saalim et al., 2020
2	12,37	Isômero 2-( <i>E</i> -non-4-enil)-4-quinolona	C <sub>16</sub> H <sub>19</sub> NO	242,1543	-0,8	159	Saalim et al., 2020; Li et al., 2020a

3	12,59	2-heptil-quinolona	C <sub>16</sub> H <sub>21</sub> NO	244,1539	-2,5	159, 172	Saalim et al., 2020
4	13,08	2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona	C <sub>16</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>2</sub>	260,1642	-3,5	159, 186	Saalim et al., 2020; Li et al., 2020a
5	13,87	2-(6-metil)-heptil-4-quinolona	C <sub>17</sub> H <sub>23</sub> NO	258,1854	1,9	159, 172	Saalim et al., 2020; Li et al., 2020a
6	14,48	Derivado da quinolona	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> N <sub>2</sub> O	325,3218	-0,3	159	Saalim et al., 2020
7	14,80	2-(( <i>E</i> )-Non-4'-enil)-4-quinolona	C <sub>18</sub> H <sub>23</sub> NO	270,1853	-1,9	159	Saalim et al., 2020; Li et al., 2020a
8	14,99	Isômero 2-(( <i>E</i> )-Non-4'-enil)-4-quinolona	C <sub>18</sub> H <sub>23</sub> NO	270,1864	2,2	159, 184	Saalim et al., 2020; Li et al., 2020a
9	15,15	2-Nonil-4-quinolinol	C <sub>18</sub> H <sub>25</sub> NO	272,2023	3,3	159	Saalim et al., 2020; Li et al., 2020a
10	16,18	2-undecen-18-il-4-quinolona	C <sub>20</sub> H <sub>27</sub> NO	298,2165	-2,0	159, 172	Saalim et al., 2020; Bultel-Ponce et al., 1998
11	17,31	Não identificado	C <sub>21</sub> H <sub>29</sub> NO	312,2325	-0,7	159, 172	Saalim et al., 2020; Bultel-Ponce et al., 1998
12	17,59	2-undecil-4-quinolona	C <sub>20</sub> H <sub>29</sub> NO	300,2334	2,3	159	Saalim et al., 2020; Bultel-Ponce et al., 1998
13	17,90	di-Ramnolipídios Rha <sub>2</sub> -C10-C8	C <sub>30</sub> H <sub>54</sub> O <sub>13</sub>	623,3643	1,0	171, 313	Christova et al., 2011
14	18,33	Derivado da quinolona	C <sub>22</sub> H <sub>31</sub> NO	326,2474	-3,1	159, 172	-
15	18,97	di-Ramnolipídios Rha <sub>2</sub> -C10-C10	C <sub>32</sub> H <sub>58</sub> O <sub>13</sub>	651,3958	0,3	359, 505	Christova et al., 2011; Ndlovu et al., 2017
16	20,15	Isômero di-Ramnolipídios Rha <sub>2</sub> -C10-C10	C <sub>32</sub> H <sub>58</sub> O <sub>13</sub>	651,3937	-2,9	359, 505	Christova et al., 2011
17	21,22	di-Ramnolipídios Rha <sub>2</sub> -C10-C12	C <sub>34</sub> H <sub>62</sub> O <sub>13</sub>	679,4290	3,1	387, 533	Christova et al., 2011
18	22,29	Isômero di-Ramnolipídios Rha <sub>2</sub> -C10-C12	C <sub>34</sub> H <sub>62</sub> O <sub>13</sub>	679,4278	1,3	387, 533	Christova et al., 2011

### 5.5 Análise quimiométrica dos extratos bacterianos

De acordo com a análise de ANOVA unidirecional, os 46 compostos caracterizados pela UPLC-MS (Tabela 13) foram considerados estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ) com base na intensidade que foram detectados nos diferentes extratos (Apêndice F).

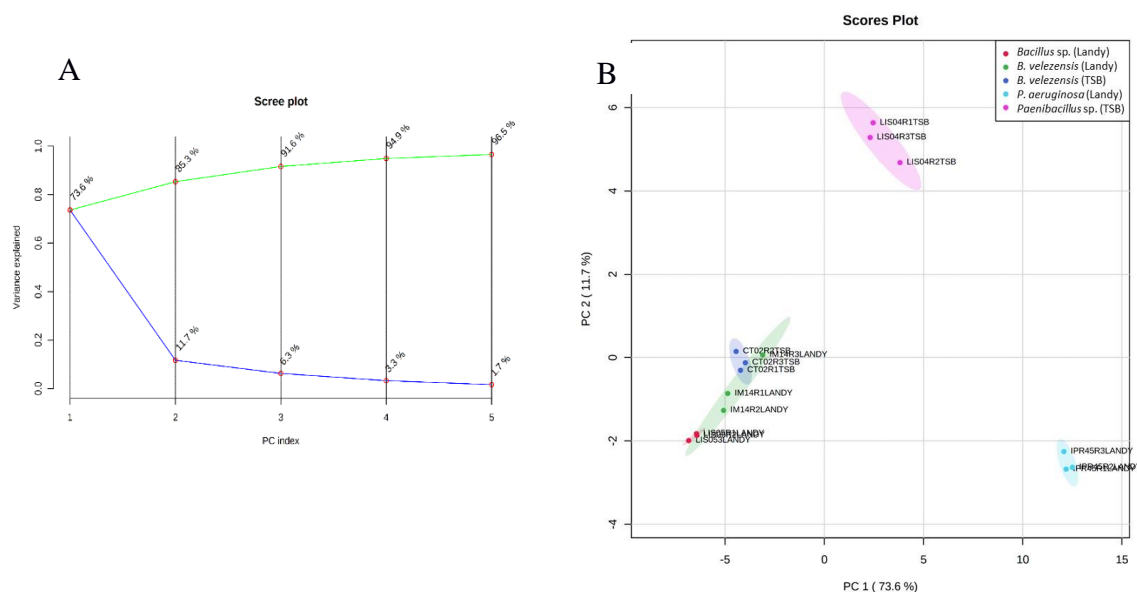
**Tabela 13** - Tabela síntese utilizada na análise quimiométrica dos dados obtidos a partir do HPLC-MS dos compostos caracterizados no extrato bruto das bactérias e o tempo de retenção

Nº	Tempo (min)	Compostos	Nº	Tempo (min)	Compostos
1	10,29	Polimixina B <sub>4</sub>	24	16,02	C <sub>16</sub> Fengicina B
2	12,37	2-(E-non-4-enil)-4-quinolona	25	16,14	C <sub>17</sub> Fengicina A
3	12,44	Iturina A <sub>2</sub>	26	16,18	2-undecen-18-il-4-quinolona
4	12,59	2-heptil-quinolona	27	16,42	C <sub>18</sub> Fengicina B
5	12,95	Polimixina B <sub>2</sub>	28	17,31	Não identificado
6	13,08	2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona	29	17,46	Isoleucinapolimixina B <sub>1</sub>
7	13,25	Iturina A <sub>3</sub> -A <sub>5</sub>	30	17,59	2-undecil-4-quinolona
8	13,59	C <sub>14</sub> Fengicina A	31	17,90	di-Ramnilipídios Rha2-C <sub>10</sub> -C <sub>8</sub>
9	13,79	C <sub>16</sub> Fengicina A	32	18,33	Derivado da quinolona
10	13,87	2-(6-metil)-heptil-4-quinolona	33	18,59	Polimixina B <sub>1</sub>
11	13,94	C <sub>16</sub> Fengicina A	34	18,97	di-Ramnilipídios Rha2-C <sub>10</sub> -C <sub>10</sub>
12	14,06	C <sub>15</sub> Fengicina A	35	20,15	di-Ramnilipídios Rha2-C <sub>10</sub> -C <sub>10</sub>
13	14,33	C <sub>15</sub> Fengicina A	36	21,22	di-Ramnilipídios Rha2C <sub>10</sub> -C <sub>12</sub>
14	14,44	C <sub>15</sub> Fengicina A	37	21,49	C <sub>14</sub> Surfactina
15	14,48	Derivado da quinolona	38	22,35	C <sub>12</sub> Surfactina
16	14,60	Polimixina B <sub>3</sub>	39	22,61	Surfactina
17	14,79	C <sub>16</sub> Fengicina A	40	22,98	Surfactina
18	14,80	2-((E)-Non-4'-enil)-4-quinolona	41	23,58	Surfactina
19	14,99	Isômero 2-((E)-Non-4'-enil)-4-quinolona	42	23,79	Surfactina
20	15,15	2-Nonil-4-quinolinol	43	23,97	Surfactina
21	15,20	C <sub>17</sub> Fengicina A	44	24,28	Surfactina
22	15,24	C <sub>16</sub> Fengicina B	45	24,51	Surfactina
23	15,79	C <sub>17</sub> Fengicina B	46	24,88	Surfactina

Quatro grupos foram identificados com base na composição e intensidade relativa dos compostos químicos presentes nos extratos bacterianos pela análise não supervisionada de componentes principais (ACP) (Figura 3A). Na análise, dois componentes principais (CP1 x CP2) explicam 85,3% da variância observada. A CP1 explica a tendência de separação das amostras de *Paenibacillus* sp. LIS04 e *P. aeruginosa* IPR45 das demais amostras das bactérias

do gênero *Bacillus* IM14, CT02 e LIS05, as quais apresentaram regiões de sobreposição e maior semelhança química (Figura 3B) como esperado.

Figura 3 - A) Porcentagem de variância explicada pelas cinco PCs. A linha azul mostra a variância explicada por cada PC individualmente, enquanto a linha verde mostra a variância acumulada. B) PC1 x PC2 escores da análise quimiométrica de bactérias isoladas de sementes de sorgo. As áreas sombreadas indicam as regiões de confiança de 95%.



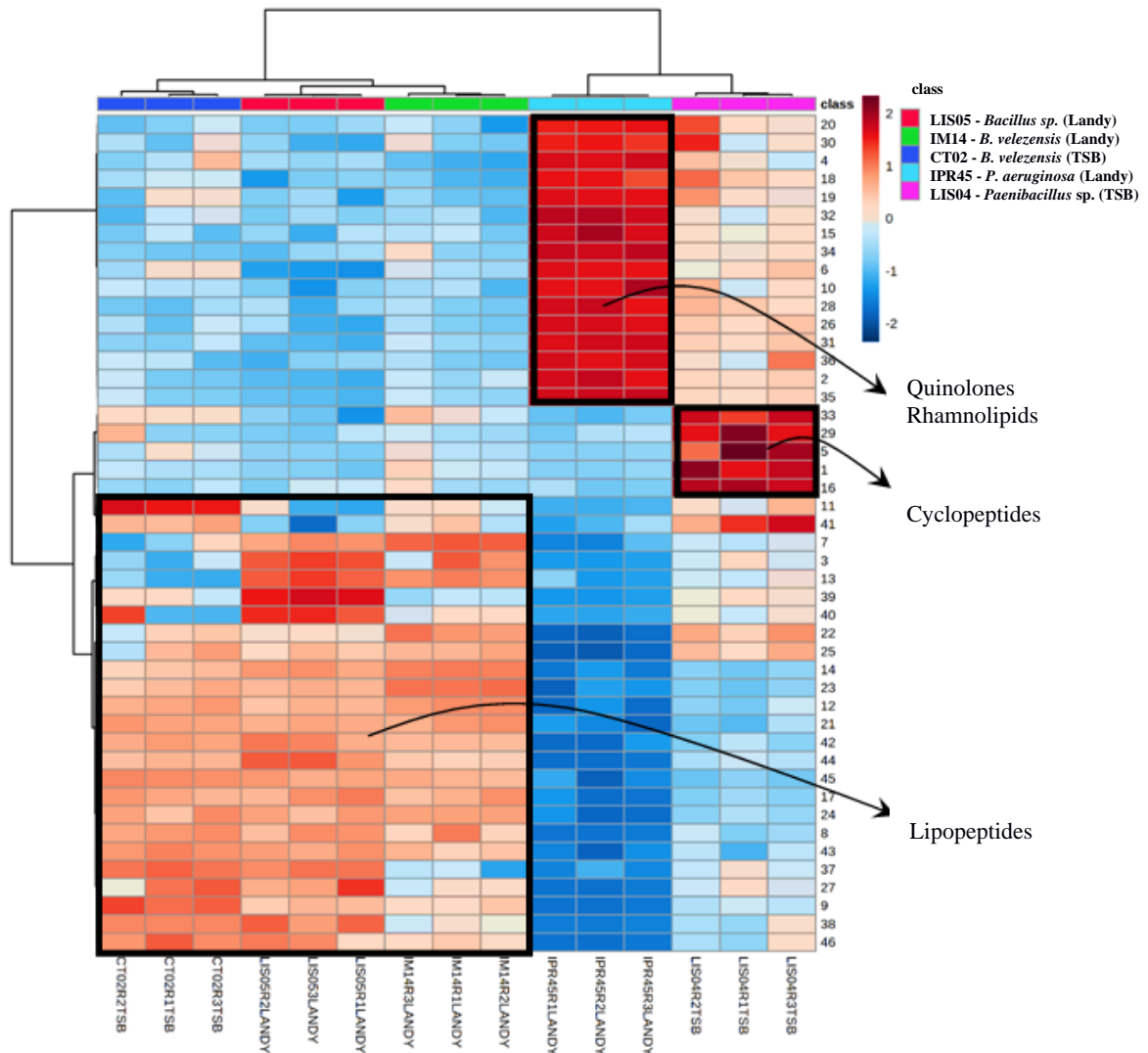
A HCA-Heat map (Figura 4) corrobora os resultados da PCA. As amostras foram reorganizadas em dois agrupamentos, discriminando a espécie de *Paenibacillus* sp. LIS04 e *P. aeruginosa* IPR45 das espécies de *Bacillus*, sem nenhum erro de classificação. Curiosamente, no agrupamento formado pelas bactérias do gênero *Bacillus*, foi possível observar que o extrato do isolado IM14 foi mais similar ao extrato do isolado LIS05 também cultivado no meio Landy do que ao extrato de *Bacillus* CT02 cultivada em meio TSB, sugerindo uma possível influência do meio de cultura no perfil metabólico dessas bactérias. De fato, conforme foi demonstrado nos testes de microdiluição realizados anteriormente, a atividade antifúngica contra *F. verticillioides* variou dependendo do meio de cultura e da bactéria utilizada, o que ocorreu provavelmente pela produção de moléculas antifúngicas diferentes. Akpa e colaboradores (2001), estudaram a influência do meio de cultura na produção de lipopeptídeos por *B. subtilis* NT02 e concluíram que a intensidade de produção de compostos homólogos depende da cepa e do meio cultura, sendo que o meio de cultura teve menor influência para a produção de moléculas homólogas à iturina do que para as surfactinas. A análise desses lipopeptídeos por cromatografia líquida de alta eficiência mostrou que NT02 produziu vários compostos

homólogos quando cultivada em meio Landy e um produto homólogo (Bacilomicina L c15) de alta intensidade quando o meio foi otimizado. A produção de antibióticos e sideróforos por *Pseudomonas* em grande parte também é dependente da composição mineral e fonte de carbono do meio conforme demonstrado por Shtark e colaboradores (2003), que relataram que ácidos orgânicos como fontes de nutrientes proporcionam uma produção mais intensa de exometabólitos e um maior nível de atividade antifúngica do que os açúcares.

A análise da abundância relativa dos íons detectados em cada amostra, representada pela intensidade das cores vermelho (alta intensidade) e azul (baixa intensidade), mostra que os lipopeptídeos predominam nas amostras. De modo geral, nas espécies de *Bacillus* predominam lipopeptídeos, tais como fengicinas, surfactinas e iturinas, inclusive, as iturinas (3 e 7) apresentam maior intensidade nas amostras de *Bacillus* sp. LIS05 e *B. velezensis* IM14, cultivadas em meio Landy. Em *Paenibacillus* sp. LIS04, houve predomínio de ciclopeptídeos, enquanto em *P. aeruginosa* predominam quinolonas e ramnolipídeos. Utilizando do mesmo método, Shahid e colaboradores (2021) conseguiram detectar nos extratos de *B. amyloliquefaciens* SB-1, *B. subtilis* A-2 e *B. tequilensis* A-3, que apresentaram inibição de oito fitopatógenos, vários homólogos de compostos surfactinas, iturinas e fengicinas, com quantidades máximas observadas para a cepa *B. amyloliquefaciens* SB-1 em comparação com outras duas cepas de *Bacillus*. Da mesma forma, ramnolipídeos produzidos por *P. aeruginosa* KVD-HM52 com atividade antifúngica contra *F. oxysporum* foram detectados em extratos produzidos por essa bactéria (Deepika et al., 2015). Extratos de metanol do sobrenadante da cultura de *Paenibacillus polymyxa* que apresentaram atividade antimicrobiana também foram analisados por HPCL e variantes de polimixinas foram detectadas por Shaheen e colaboradores (2011), resultados que vão de acordo com o que foi encontrado nesse estudo.

Outra abordagem importante consistiu em avaliar quais compostos dos extratos foram discriminantes para a sua atividade antifúngica, assim as amostras foram classificadas de acordo com os valores de concentração inibitória mínima capazes de reduzir no mínimo 50% do crescimento de *F. verticillioides* e em seguida submetidas a análise de PLS-DA. Considerando que quanto menor a concentração inibitória de extrato bacteriano, maior a ação antifúngica, é possível perceber que os extratos obtidos de bactérias do gênero *Bacillus* apresentaram o melhor desempenho, com destaque para *B. velezensis* CT02 cultivado no meio TSB.

Figura 4 - HCA-Heat map da análise quimiométrica de bactérias isoladas de sementes de sorgo.



Os números correspondem aos compostos listados na Tabela 13.

Na Figura 5, o gráfico de escores 3D de PLS-DA representa 91,2% da variância total explicada por três variáveis latentes, LV1 x LV2 x LV3, resultando em maior separação entre os grupos de bactérias, principalmente entre as espécies de *Bacillus*. Para minimizar erros de *overfitting* foi aplicada validação cruzada usando o modelo *leave-one-out cross-validation* (LOOCV), no qual valores cumulativos de  $R^2 = 0,98706$  e  $Q^2 = 0,92167$ , indicaram um modelo de quatro componentes como ideal (Figura 6). Em geral, o eixo LV1 explica 72,4% da variância observada, marcando o agrupamento das amostras de *Bacillus* em valores negativos, sem sobreposição, enquanto as espécies de *P. aeruginosa* e *Paenibacillus* sp. foram dispostas em

valores positivos de LV1. Examinando o eixo LV2 (10,8%), observa-se a separação de *Bacillus* sp. (LIS05), em valores positivos, de *B. velezensis* (CT02 e IM14), em valores negativos.

Figura 5 - Escores 3D de PLS-DA. A discriminação foi caracterizada por 72,4% para LV1, 10,8% para LV2 e 8% para LV3.

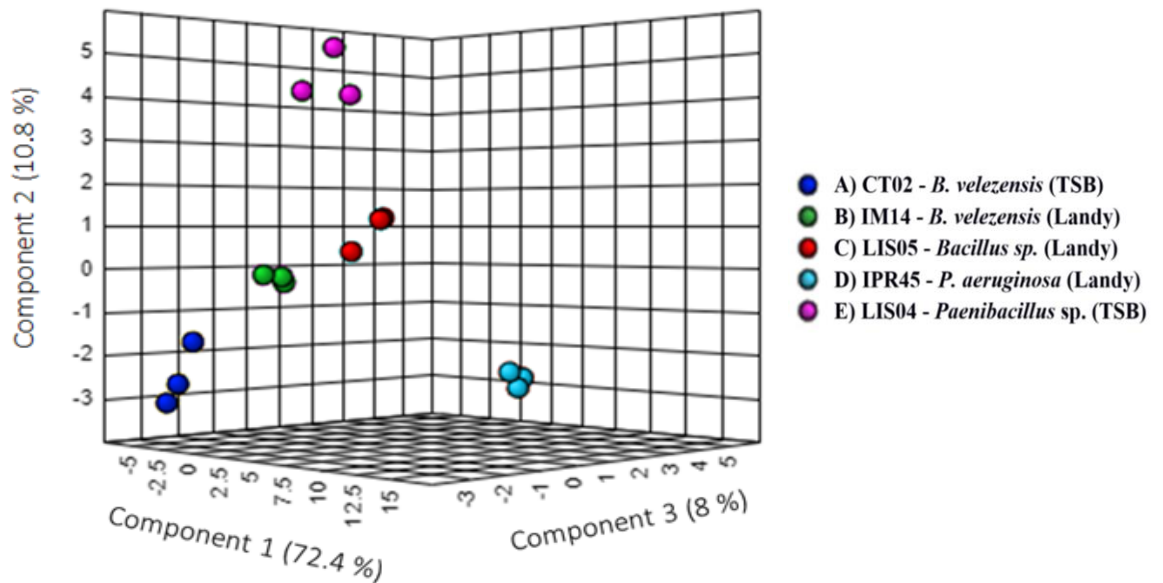
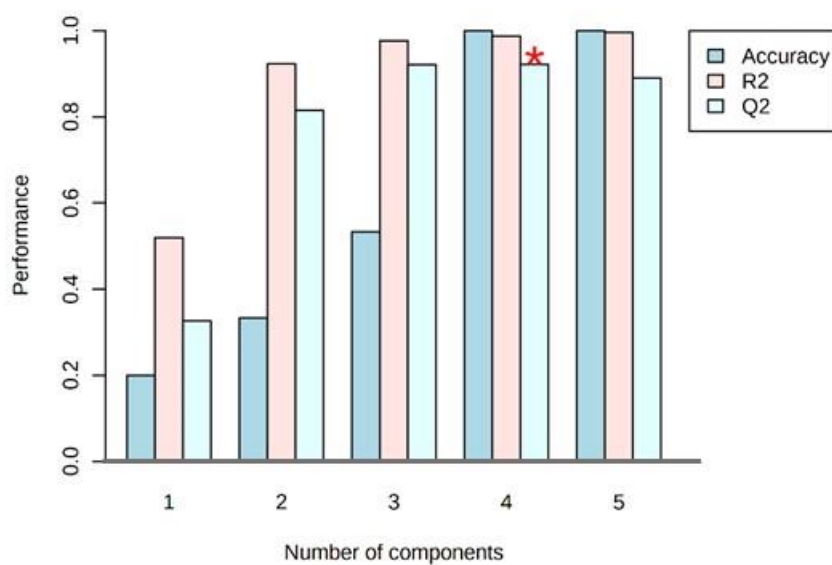


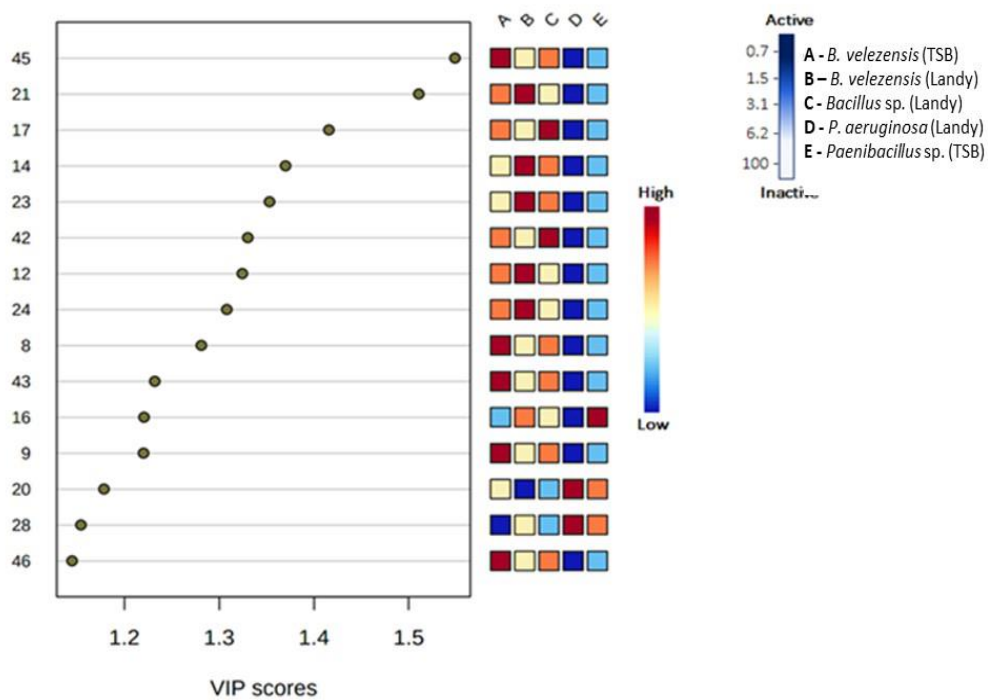
Figura 6 - Gráfico de validação cruzada pelo método *leave-one-out cross-validation* (LOOCV) aplicado em dados de análise discriminante de mínimos quadrados parciais (PLS-DA).



A estrela vermelha acima da coluna Q<sup>2</sup> indica que o modelo de quatro componentes é o ideal

Após a construção do modelo de PLS-DA, foi possível identificar quais compostos foram mais relevantes para a separação das amostras, de acordo com a concentração inibitória mínima, por meio da análise de VIP (Figura 7). Dessa forma, foi possível identificar os 15 compostos (Tabela 14) que mais contribuíram para atividade antifúngica ( $VIP > 1,0$ ), sendo 12 deles mais expressivos nos extratos de *Bacillus*, incluindo a surfactina **45** ( $VIP = 1.5488$ ), cuja intensidade é maior no extrato de *B. velezensis*, cultivado no meio TSB. De modo geral, as surfactinas (**45**, **42**, **43** e **46**) e as fengicinas (**21**, **17**, **14**, **23**, **12**, **24**, **8** e **9**), principalmente, foram discriminantes para o maior potencial antifúngico dos extratos de isolados do gênero *Bacillus*. No Apêndice G, são apresentados os gráficos de boxplot para os 12 compostos discriminados nos extratos de *Bacillus*.

Figura 7 - VIP escores dos compostos discriminantes entre os extratos bacterianos.



Quanto maior a pontuação VIP, melhor a capacidade de discriminação entre grupos. O mini heat map à direita ilustra a intensidade relativa dos compostos. As amostras foram classificadas em ordem crescente do valor da concentração inibitória mínima, sendo os menores valores considerados mais ativos (representado pela cor azul intensa na escala de atividade).



**Tabela 14** - Compostos discriminados na análise de VIP.

Composto	VIP	p-valor
Surfactina (45)	1.5488	2.84E-08
C <sub>17</sub> Fengicina A (21)	1.5107	5.53E-08
C <sub>16</sub> Fengicina A (17)	1.4158	4.07E-08
C <sub>15</sub> Fengicina A (14)	1.37	4.27E-10
C <sub>17</sub> Fengicina B (23)	1.3531	1.85E-08
Surfactina (42)	1.3302	2.80E-08
C <sub>15</sub> Fengicina A (12)	1.3244	7.48E-08
C <sub>16</sub> Fengicina B (24)	1.308	3.59E-08
C <sub>14</sub> Fengicina A (8)	1.2812	8.22E-07
Surfactina (43)	1.232	4.02E-07
Polimixina B <sub>3</sub> (16)	1.2207	2.69E-06
C <sub>16</sub> Fengicina A (9)	1.2201	9.09E-10
2-Nonil-4-quinolinol (20)	1.1784	0.000277
Não identificado (28)	1.1541	8.69E-07
Surfactina (46)	1.1447	1.93E-06

VIP: Variável de Importância na Projeção

## 5.6 Análise do genoma completo das bactérias antagonistas

Os genomas dos isolados CT02, IM14, LIS05, LIS04 e IPR45 sequenciados na plataforma Illumina HiSeq 4000 (Illumina, San Diego, CA, EUA) geraram um total de 13.573.106, 13.654.038, 13.605.486, 13.625.202, 13.643.630 reads, respectivamente. Todas as reads foram montadas para um genoma inicial de 4.013.253bp com cobertura de 486 vezes para CT02, de 3.997.574 e cobertura de 489 para IM14, de 4.013.450 e cobertura de 486 para LIS05, de 5.561.002 e cobertura de 347 para LIS04 e um genoma inicial de 6.471.651 bp com cobertura de 293 vezes para a IPR45, usando o SOAPdenovo v1.05.

O conteúdo de G + C foi de 46,54%; 46,38%, 46,54%, 45,43%, 66,25% para CT02, IM14, LIS05, LIS04 e IPR45, respectivamente. As características dos genomas sequenciados neste estudo estão resumidas na Tabela 15.

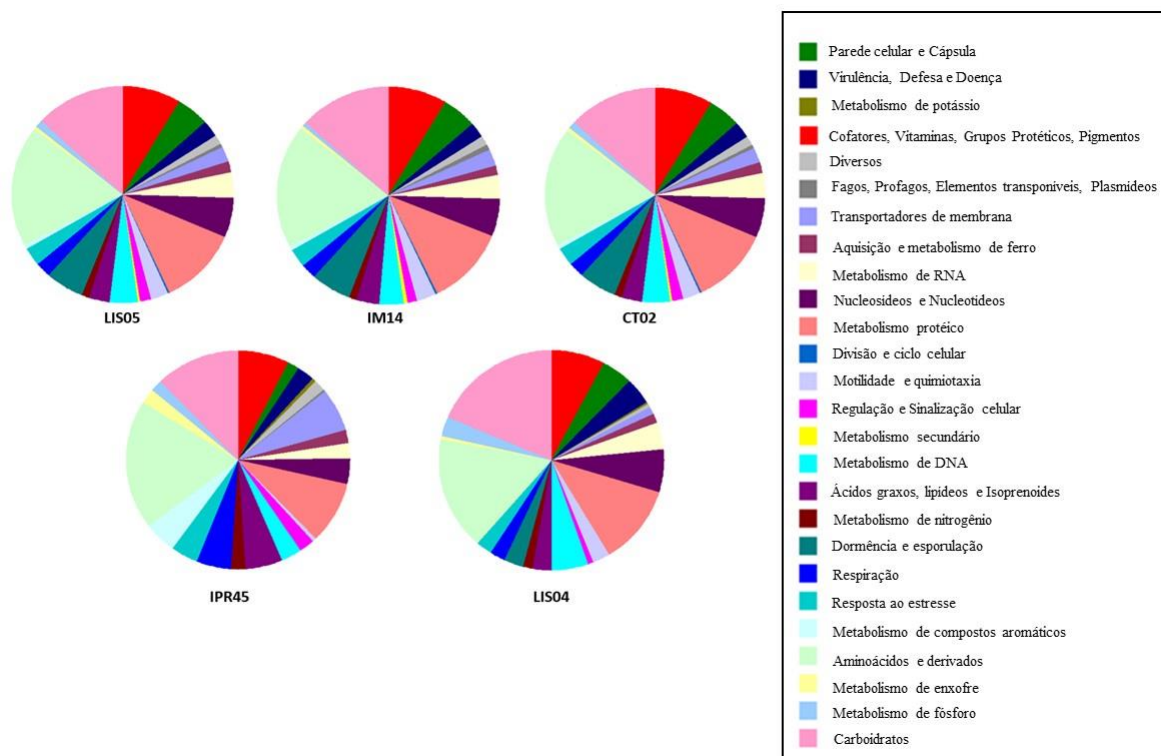
**Tabela 15** - Características gerais dos genomas dos isolados do gênero *Bacillus* CT02, IM14 e LIS05, de *Paenibacillus* sp. LIS04 e de *Pseudomonas aeruginosa* IPR45

Assembly	<i>Bacillus</i> CT02	<i>Bacillus</i> IM14	<i>Bacillus</i> LIS05	<i>Paenibacillus</i> sp. LIS04	<i>P. aeruginosa</i> IPR45
# Contigs (>=0 bp)	30	57	30	212	75
# Contigs (>=1000 bp)	11	24	11	47	28
Total length (>=0 bp)	4013253	3997574	4013450	5561002	6471651
Total length (>=1000 bp)	4007327	3985460	4007524	5510934	6451110

# Contigs	28	57	30	212	75
Largest contig	1354340	713769	1354537	931586	2325654
Total length	4013253	3997574	4013450	5561002	6471651
GC (%)	46.54	46.38	46.54	45.43	66.25
N50	1072201	468182	1072201	623597	916622
N75	642316	236038	642316	222165	471528
L50	2	4	2	4	2
L75	3	7	3	8	5
# Total reads	13573106	13654038	13605486	13625202	13643630
# Left	6786553	6827019	6802743	6812601	6821815
# Right	6786553	6827019	6802743	6812601	6821815
Mapped (%)	98.97	98.98	98.97	98.78	97.76
Properly paired (%)	97.67	97.23	97.53	96.68	96.76
Avg. coverage depth	486	489	486	347	293
Coverage >= 1x (%)	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
N's per 100 kbp	2.39	2.28	2.39	1.76	2.97

Depois da previsão e anotação de CDS (CoDing Sequence) usando os Softwares PROKKA e RAST, obteve-se 4107, 4062, 4109, 5365 e 6085 CDS para CT02, IM14, LIS05, LIS04 e IPR45, respectivamente. Destes, 1.191, 1177, 1191, 1180 e 1764 genes com funções atribuídas foram detectados, respectivamente, sendo divididas em 26 subsistemas (Figura 8).

Figura 8 - Classificação funcional de genes dos isolados do gênero *Bacillus* LIS05, IM14, CT02, de *Pseudomonas aeruginosa* (IPR45) e de *Paenibacillus* sp. (LIS04).



Genes envolvidos na produção de metabólitos antimicrobianos foram detectados nos genomas das cinco bactérias antagonistas e mostraram alta homologia de sequência com os grupos de genes biossintéticos conhecidos (Tabelas 16, 17 e 18).

Genes que controlam a síntese de onze compostos, envolvidos direta ou indiretamente na atividade antifúngica e bacteriana foram detectados nos genomas dos isolados CT02, IM14 e LIS05 de *Bacillus*. A análise de similaridade, empregando o programa Blastn (GenBank), mostrou que os 61 genes envolvidos nas sínteses dos diferentes compostos antifúngicos apresentaram variação nas sequências de nucleotídeos, que variaram de 74% a 100% de similaridade com genes previamente descritos.

Os genomas dos isolados CT02, IM14 e LIS05 abrigam agrupamentos de genes que são responsáveis pela biossíntese de vários lipopeptídeos via sintetases de peptídeos não ribossômicos (NRPSs), incluindo fengicina (*fen*), surfactina (*srfA*), iturina (*itu*), bacilomicina D (*bmy*) e paenilarvins (Tabela 16), metabólitos secundários com atividades antifúngicas de amplo espectro (Ongena e Jacques, 2008; Sood et al., 2014).

Um cluster de genes (*pks2*) sintetizador do policetídeo macrolactina, que foi relatado, por exibir atividade antifúngica e antibacteriana em *B. amyloliquefaciens* NJN-6 (Yuan et al., 2012) foi localizado no genoma dos isolados do gênero *Bacillus* desse trabalho. Além disso, agrupamentos de genes para síntese de micosubtilina (*myc*) foram identificados no cromossomo. Micosubtilina foi caracterizada por exibir atividade antifúngica contra fitopatógenos na cepa de *B. subtilis* BBG100 (Leclère et al., 2005). Efeitos da micosubtilina também foram demonstrados por Yu e colaboradores (2021), onde hifas de *F. graminearum* e *F. verticillioides*, quando tratadas com 20 µg/mL de micosubtilina resultaram na produção de poucos conídios. Conídios viáveis quando expostos a micosubtilina tiveram a taxa de germinação diminuída após 24h de tratamento, além disso os conídios aparentavam inchados e com alongamento do tubo germinativo reduzido. Os compostos fengicina, surfactina, micosubtilina, bacillomicina D, bacilisina e macrolactina, além de metabólitos antimicrobianos atuam como indutores de resistência sistêmica (ISR) em plantas (Ongena et al., 2007; Wu et al., 2018; Lin et al., 2019; Zaid et al., 2022), desencadeando diferentes vias de sinalização, como a do ácido jasmônico (JA), etileno (ET) e ácido salicílico (SA), em plantas (Fan et al., 2018). Um operon (*pps*) sintetizador de piplastatina, relatada por exibir atividade antifúngica em *B. amyloliquefaciens* ST6-3 (Gong et al., 2015), também foi identificado no cromossomo. A atividade antifúngica deste composto foi relatada para *F. graminearum*, onde atuou induzindo distorção nas hifas, aumento dos vacúolos, crescimento apical restrito e com deformação, este composto também foi relatado provocando conglobação em hifas jovens do fungo.

Também foi demonstrado que LIS05, CT02 e IM14 possuem um cluster de genes (*dhb*) codificado para o sideróforo bacillibactina, que é sintetizado em várias cepas do gênero *Bacillus*, incluindo *B. subtilis* (Dertz et al., 2006) e *B. velezensis* (Zhu et al., 2020). Bacillibactina está envolvido na quelação de ferro na rizosfera, inibindo o desenvolvimento de microrganismos que dependem do ferro para sua sobrevivência, incluindo fitopatógenos, que têm menor capacidade de competição por ferro (Zaid et al., 2022).

Um agrupamento de genes para o dipeptídeo antibiótico bacilisina (*bac*), que possui atividade antibacteriana e antifúngica, além de indução de resistência sistêmica ISR também foi detectado. Além desses, cluster de genes envolvidos na produção de bacillaene (*bae*), que é sintetizado em várias cepas de *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus* e *B. licheniformis* (Steinborn et al., 2005), foi detectado nos genomas dos isolados de *Bacillus* CT02, IM14 e LIS05 sequenciados nesse estudo.

**Tabela 16** - Lista de genes envolvidos na síntese de metabólitos biotivos encontrados no genoma de isolados do gênero *Bacillus* IM14, CT02 e LIS05

Gene	Metabólito	Função	Similaridade em relação ao Genbank (%)			Referência Genbank
			CT02	IM14	LIS05	
<i>fenB</i>	Fengicina	Antifúngico,	97.94	97.72	97.94	MT386612.1
<i>fenA</i>		ISR	92.61	92.61	92.61	AB973486.1
<i>fenC</i>			97.65	98.12	97.65	KU504270.1
<i>srfAA</i>	Surfactina	Antifúngico,	98.12	98.24	98.12	CP040881
<i>srfAB</i>		ISR	98.02	97.98	98.02	CP040881
<i>srfAC</i>			97.86	97.86	97.86	CP040881
<i>srfAD</i>			99.18	99.18	99.18	CP040881
<i>ituD</i>	Iturina	Antifúngico	96.51	96.67	96.51	KT781919.1
<i>ituA</i>			98.11	97.53	98.11	KT781919.1
<i>ituB</i>			96.76	96.79	96.76	KT781919.1
<i>ituC</i>			97.18	97.13	97.18	KT781919.1
<i>ppsA</i>	Pliplastatina	Antifúngico,	100.0	100.0	100.0	JQ073773.1
<i>ppsB</i>		Antibacteriano	100.0	99.03	100.0	CP079719.1
<i>ppsC</i>			92.30	92.30	92.30	JQ073773.1
<i>ppsD</i>			86.36	72.07	86.36	JQ073773.1
<i>ppsE</i>			100.0	98.71	100.0	CP079719.1
<i>mycA</i>	Micosubtilina	Antifúngico,	81.20	80.96	81.20	AF184956.1
<i>mycB</i>		ISR	79.93	80.00	79.93	AF184956.1
<i>mycC</i>			80.89	80.75	80.89	AF184956.1
<i>bmyC</i>	Bacillomicina D	Antifúngico,	89.00	88.85	89.00	JQ271536.1
<i>bmyB</i>		ISR	97.67	97.64	97.67	JQ271536.1
<i>bmyA</i>			97.09	98.21	97.09	JQ271536.1
<i>bmyD</i>			98.08	98.25	98.08	JQ271536.1
<i>bacA</i>	Bacilisina	Antifúngico,	98.86	99.35	98.86	AF396778.1

<i>bacB</i>		Antibacteriano	98.31	98.17	98.31	AF396778.1
<i>bacC</i>		ISR	98.42	98.95	98.42	AF396778.1
<i>bacD</i>			98.45	98.37	98.45	AF396778.1
<i>bacE</i>			99.32	99.15	99.32	AF396778.1
<i>pkS2A</i>	Macrolactina	Antifúngico,	98.91	98.87	98.91	AJ634061.2
<i>pkS2B</i>		Antibacteriano	99.17	99.24	99.17	AJ634061.2
<i>pkS2C</i>		ISR	99.05	99.14	99.05	AJ634061.2
<i>pkS2D</i>			99.06	99.17	99.06	AJ634061.2
<i>pkS2E</i>			99.10	98.87	99.10	AJ634061.2
<i>pkS2F</i>			98.82	98.77	98.82	AJ634061.2
<i>pkS2G</i>			98.99	98.66	98.99	AJ634061.2
<i>pkS2H</i>			98.83	99.06	98.83	AJ634061.2
<i>pkS2I</i>			99.64	99.46	99.64	AJ634061.2
<i>pdhA</i>			99.82	99.91	99.82	AJ634061.2
<i>FHJ82_09330</i>	Paenilarvins	Antifúngico	96.00	95.95	96.00	CP040881.1
<i>FHJ82_09335</i>			97.13	97.16	72.32	CP040881.1
<i>FHJ82_09340</i>			97.18	98.34	97.18	CP040881.1
<i>FHJ82_09345</i>			98.08	98.42	98.08	CP040881.1
<i>baeB</i>	Bacillaene	Antibacteriano	99.71	99.56	99.71	AJ634060.2
<i>baeC</i>		ISR	99.09	99.20	99.09	AJ634060.2
<i>baeD</i>			99.20	99.29	99.20	AJ634060.2
<i>baeE</i>			99.15	99.19	99.15	AJ634060.2
<i>baeI</i>			99.06	99.86	99.06	AJ634060.2
<i>baeG</i>			98.12	98.43	98.12	AJ634060.2
<i>baeH</i>			98.46	98.72	98.46	AJ634060.2
<i>baeL</i>			97.86	98.63	97.86	AJ634060.2
<i>baeJ</i>			98.61	98.65	98.61	AJ634060.2
<i>baeM</i>			98.46	98.93	98.46	AJ634060.2
<i>baeN</i>			98.89	98.71	98.89	AJ634060.2
<i>baeR</i>			98.27	98.51	98.27	AJ634060.2
<i>baeS</i>			98.87	99.03	98.87	AJ634060.2
<i>dhbF</i>	Bacillibactina	Sideróforo	74.72	74.48	74.72	AL009126.3
<i>dhbB</i>			100.0	99.03	100.0	CP039297.1
<i>dhbE</i>			74.64	74.52	74.64	AL009126.3
<i>dhbA</i>			99.11	100.0	99.11	CP102511.1
<i>dhbC</i>			100.0	100.0	100.0	CP079719.1
<i>Eg</i>	Celulase	Enzima lítica	93.46	93.60	93.46	AB695293.1

Também pesquisamos o genoma do isolado de *Paenibacillus* sp. LIS04 em busca de genes relacionados à produção de metabólitos bioativos envolvidos no controle biológico. Genes de cinco compostos bioativos, solúveis e voláteis, foram detectados no genoma de LIS04 mostrando mais de 87% de similaridade gênica com genes já descritos. Grupo de genes envolvidos na síntese de fusaricidina (*fus*, *fustE*), que é um antifúngico bem relatado, foi detectado no genoma de LIS04. Também foi detectado um agrupamento de genes envolvidos na síntese de polimixina (*pmx*), que possui função antibacteriana, além de antifúngica contra espécies de *Fusarium*, como foi demonstrado por Hsu et al., 2017. Foram detectados ainda genes da síntese de 2,3-butanodiol, metanotiol e isopreno (Tabela 17), que são compostos

orgânicos voláteis (COVs) responsáveis por desencadear mecanismos defensivos das plantas (Li et al., 2020b).

**Tabela 17** - Lista de genes envolvidos na síntese de metabólitos biotivos encontrados no genoma de *Paenibacillus* sp. LIS04

Gene	Metabólito	Função	Similaridade Genbank (%)	Referência Genbank
<i>fusE</i>	Fusaricidina	Antifúngico	87.24	CP025957
<i>fusA</i>			88.88	CP025957
<i>fusB</i>			87.50	CP025957
<i>fusC</i>			88.08	CP025957
<i>fusD</i>			91.91	CP025957
<i>fusE</i>			91.91	CP025957
<i>fusF</i>			90.06	CP025957
<i>fusG</i>			89.23	CP025957
<i>pmxA</i>	Polimixina	Antibacteriano	87.95	FR727736.1
<i>pmxE</i>		Antifúngico	92.00	FR727736.1
<i>mtnE</i>	Methanethiol	ISR	95.17	CP025957
<i>mmuM</i>	Methanethiol		93.90	CP025957
<i>metE</i>	Methanethiol		91.28	CP025957
<i>metH</i>	Methanethiol		93.98	CP025957
<i>lytB</i>	Isopreno	ISR	94.78	CP025957
<i>gcpE</i>	Isopreno		94.01	CP025957
<i>ispE</i>	Isopreno		94.03	CP025957
<i>ispF</i>	Isopreno		93.08	CP025957
<i>alsD</i>	2,3-Butanodiol		92.90	CP025957
<i>CIA50_2532</i>	beta- glucanase		Enzimas líticas	85.15
<i>CIA50_3796</i>	1,4-beta-glucanase	92.63		CP025957
<i>CIA50_3836</i>	endo-1,3-beta-glucanase	91.41		CP025957
<i>CIA50_1100</i>	exoglucanase A	94.42		CP025957
<i>CIA50_0229</i>	glicosil hidrolase	93.11		CP025957
<i>CIA50_0827</i>	glicosil hidrolase	91.17		CP025957
<i>CIA50_0421</i>	glicosil hidrolase	93.26		CP025957

A análise do genoma de *P. aeruginosa* IPR45 revelou a presença de agrupamentos de genes relacionados a síntese de metabólitos bioativos envolvidos no controle biológico como cianeto de hidrogênio (*hcnABC*), fenazina (*phzA\_B* e *phzDFGMS*) e salicilato (*pchA*), cluster de genes que também foram detectados no genoma de *P. aeruginosa* B18 e indicaram que essa bactéria pode conferir resistência da planta hospedeira a patógenos devido a produção desses metabólitos Singh et al. (2021). Cluster de genes envolvidos na produção de ramnolipídeos (*rhl*) e quinolona (*pqsE*) também foram detectados, além de genes que codificam o sideróforo pioverdina (*pvd*), que pode contribuir para o efeito de biocontrole da cepa. A produção de

sideróforos não apenas promove o crescimento das plantas, mas também contribui para o controle de doenças ao competir com fitopatógenos por metais residuais (Chlebeck et al., 2020).

**Tabela 18** - Lista de genes envolvidos na síntese de metabólitos bioativos encontrados no genoma de *Pseudomonas aeruginosa* IPR45

Gene	Metabólito	Atividade	Similaridade Genbank (%)	Referência Genbank
<i>hcnA</i>	Cianeto de hidrogênio	Antifúngico	99.04	CP007224.1
<i>hcnB</i>			98.92	CP007224.1
<i>hcnC</i>			97.61	CP007224.1
<i>phzM</i>	Fenazina	Antifúngico	99.90	CP007224.1
<i>phzA</i>		Antibacteriano	100.0	CP007224.1
<i>phzB</i>		ISR	98.16	CP007224.1
<i>phzD</i>			99.76	CP007224.1
<i>phzF</i>			99.69	CP007224.1
<i>phzG</i>			99.22	CP007224.1
<i>phzS</i>			98.59	CP007224.1
<i>pchA</i>		Salicilato	ISR	98.81
<i>pvdA</i>	Pioverdina	Sideróforo	82.90	CP053028.1
<i>pvdE</i>			73.00	CP053028.1
<i>pvdH</i>			99.43	CP007224.1
<i>pvdL</i>			99.40	CP007224.1
<i>pvdG</i>			99.37	CP007224.1
<i>pvdS</i>			100.0	CP007224.1
<i>pvdJ</i>			85.17	CP053028.1
<i>pvdO</i>			98.36	CP007224.1
<i>pvdN</i>			99.68	CP007224.1
<i>pvdM</i>			93.56	CP007224.1
<i>pvdP</i>			84.88	CP053028.1
<i>pvdI</i>			97.52	CP053028.1
<i>pvdQ</i>			99.51	CP007224.1
<i>rhIB</i>			Ramnolipídeos	Antifúngico
<i>rhIB</i>	99.61	CP007224.1		
<i>rhIE</i>	99.32	CP000438.1		
<i>rhIA</i>	99.77	CP007224.1		
<i>rhII</i>	99.83	CP007224.1		
<i>rhIG</i>	98.96	CP007224.1		
<i>rhIC</i>	99.28	CP007224.1		
<i>rhIR</i>	99.86	CP007224.1		
<i>pqsE</i>	Quinolona	Antifúngico		
<i>nagA</i>	Quitinase	Enzima	99.93	CP058332.1

Genes que codificam enzimas ativas relacionadas a atividade de biocontrole como celulase (*Bacillus* sp.), glucanases e glicosil hidrolases (*Paenibacillus* sp.) e quitinase (*P. aeruginosa*) também foram encontrados no genoma dos isolados avaliados, essas enzimas

degradam e lisam componentes da parede celular dos fungos afetando o seu crescimento e em alguns casos pode levá-los à morte (Mabood et al., 2014; Jadhav et al., 2017).

Atualmente, espécies de *Bacillus*, *Paenibacillus* e *Pseudomonas* receberam atenção considerável pela produção de diferentes metabólitos secundários biologicamente ativos que regulam uma ampla gama de doenças e estimulam o crescimento das plantas. Apesar da grande capacidade dos microrganismos antagonistas de produzir diferentes tipos de metabólitos antimicrobianos, sabe-se que muitos desses compostos são sintetizados apenas em resposta a estímulos externos ou sob condições especiais, isso dificulta a detecção de todos os compostos antimicrobianos produzidos por uma determinada cepa usando os métodos tradicionais de cultivo e extração (Tulp & Bohlin, 2005). Como alternativa, estudos genômicos dos microrganismos antagonistas vem sendo adotados, pois são muito úteis na identificação e descoberta de novos compostos antimicrobianos. Além disso, ampliam o conhecimento sobre os mecanismos de ação dos antagonistas que são necessários para projetar estratégias para melhorar a eficácia do controle biológico (Palmieri et al., 2022). Nesse trabalho, agrupamentos de genes foram identificados no genoma dos isolados de *Bacillus* CT02, IM14 e LIS05, de *P. aeruginosa* IPR45 e *Paenibacillus* sp. LIS04, que foram responsáveis pela síntese de diferentes metabólitos secundários e que foram identificados pela análise genômica comparativa.

## 5.7 Análise filogenética

Para determinar a posição taxonômica dos isolados bacterianos LIS05, CT02, IM14, LIS04 e IPR45, a análise filogenética usando sequências do genoma completo foi realizada usando a plataforma de bioinformática Type (strain) Genome Server (TYGS).

Os resultados da árvore filogenética baseada no genoma completo mostraram uma maior proximidade dos isolados do gênero *Bacillus* CT02, IM14 e LIS05 com *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42 (Figura 9).

O complexo de espécies do gênero *Bacillus* consiste em um número cada vez maior de espécies descritas, que exibem um grau extremamente alto de similaridade, portanto, a taxonomia dessas espécies constantemente traz confusão para os pesquisadores (Fan et al., 2017). A distinção dessas espécies usando parâmetros de taxonomia clássica, como por exemplo a análise filogenética do gene 16S rRNA, apresenta resultados falhos para diferenciar espécies dentro do complexo devido à natureza altamente conservada do gene (Rooney et al., 2009).



*Bacillus amyloliquefaciens* possui espécies intimamente relacionadas, porém com o advento da genômica comparativa e a disponibilidade de um número crescente de sequências completas do genoma, tornou-se possível distinguir duas subespécies dentro de *B. amyloliquefaciens*: *B. amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* e *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*. De acordo com Reva e colaboradores (2004), a subespécie “*plantarum*” representa um ecótipo distinto de cepas de *B. amyloliquefaciens* e que está associada a plantas, sendo cada vez mais utilizada como biofertilizante e para controle biológico na agricultura (Borriss, 2011). *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42 e outras espécies do grupo foram reclassificados como sendo *Bacillus velezensis* por Dunlap e colaboradores (2016). Portanto, os isolados CT02, IM14 e LIS05, que apresentaram maior proximidade com a cepa FZB42 *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* pela análise filogenética, serão descritos nesse trabalho a partir de agora como *Bacillus velezensis*.

Para o isolado de *Paenibacillus* sp. LIS04, a análise filogenética realizada via TYGS revelou que essa bactéria pertence a espécie *P. ottowii* com alta similaridade com a cepa tipo de *P. ottowii* MS2379 (Figura 10). A cepa tipo MS2379, que anteriormente havia sido relacionada às espécies *P. polymyxa* (DSM 36 T), *P. jamilae* (DSM 13815 T) e *P. peoriae* (DSM 8320 T) pela análise 16S rRNA e do gene *rpoB*, foi reclassificada como sendo da espécie *P. ottowii* por Velazquez e colaboradores (2020). Recentemente esses autores, com base em características fisiológicas, quimiotaxonômicas, bioquímicas e estudos de ácidos nucleicos da cepa MS2379, reconheceram que se trata de uma nova espécie do gênero *Paenibacillus*.

A árvore filogenética do genoma completo do isolado IPR45 confirmou a sua identificação como *P. aeruginosa*, apresentando uma alta similaridade com a cepa DSM50071 (Figura11).

Figura 9 - Árvore filogenética do genoma completo de isolados do gênero *Bacillus* CT02, IM14 e LIS05.

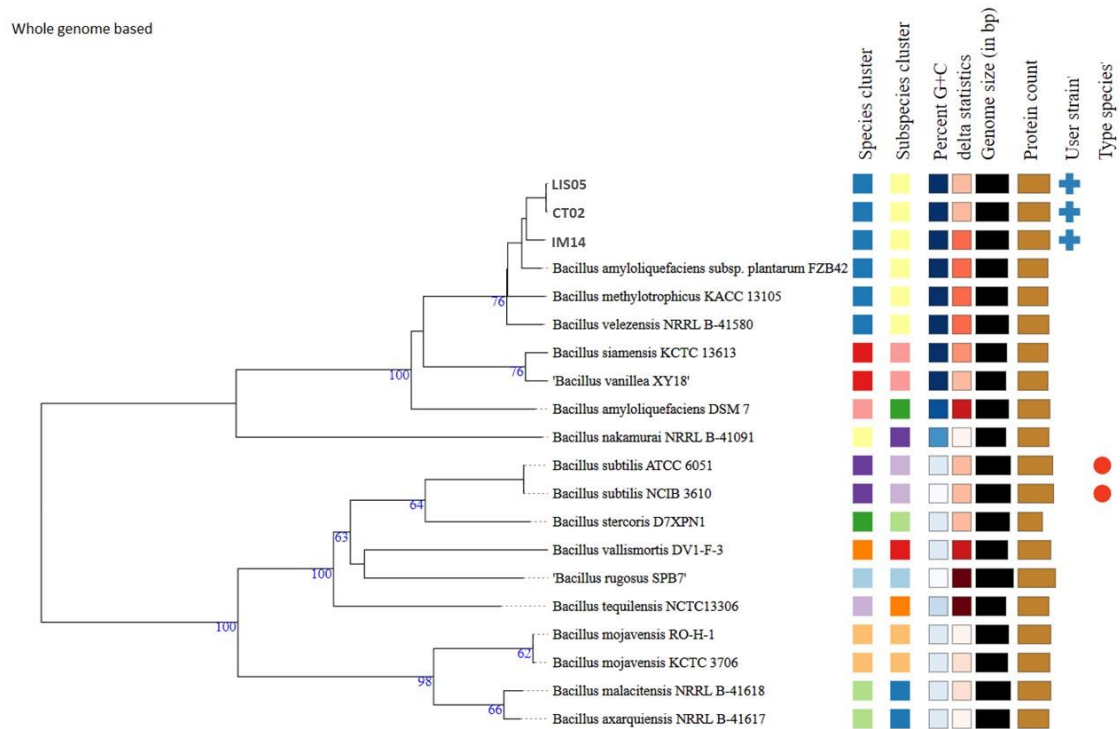


Figura 10 - Árvore filogenética *Paenibacillus ottowii* LIS04

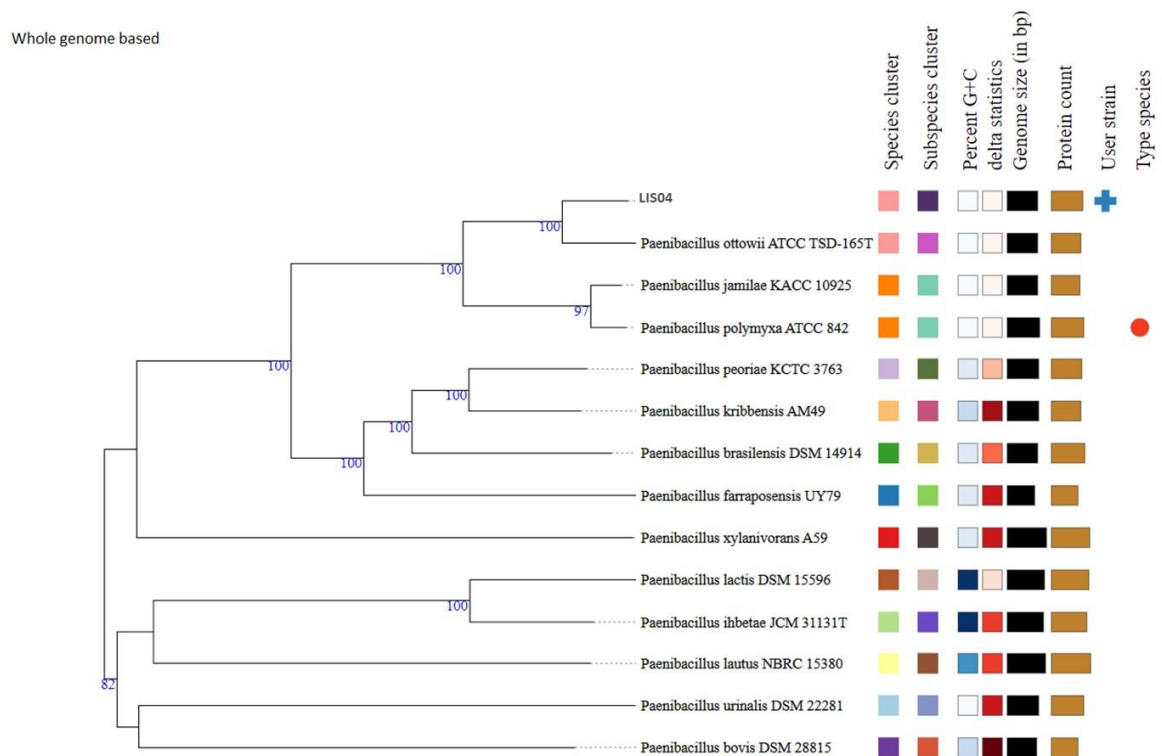
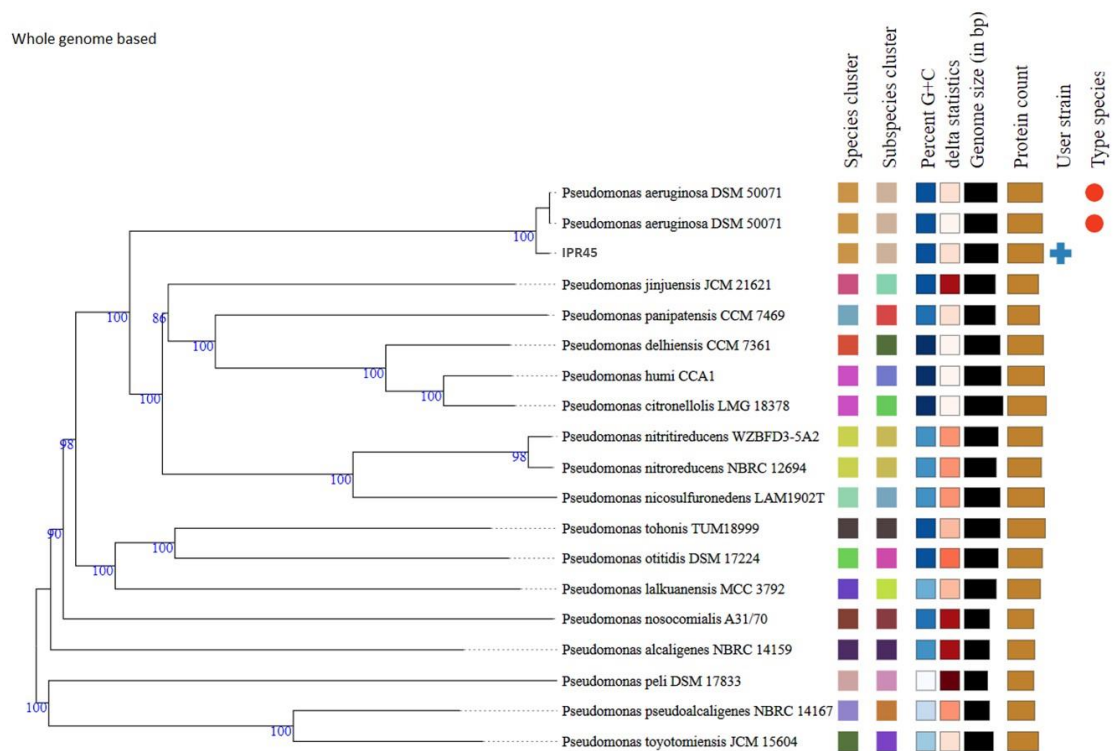


Figura 11 - Árvore filogenética *Pseudomonas aeruginosa* IPR45



## 5.8 Testes de combinação entre bactérias antagonistas e combinação de bactérias com fungicida químico

### 5.8.1 Compatibilidade entre as bactérias antagonistas

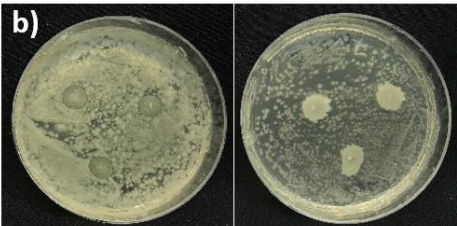
Entre os isolados confrontados, somente *P. aeruginosa* IPR45 inibiu o crescimento de todos os outros isolados sob condições *in vitro*, no entanto, todas as outras combinações foram consideradas compatíveis (Figura 12a). Isolados compatíveis conseguiram crescer um sobre o outro (Figura 12b) e zonas de inibição foram observadas em combinações incompatíveis (Figura 12c).

Figura 12 - Teste *in vitro* de compatibilidade entre os isolados pertencentes as espécies *Paenibacillus ottowii* LIS04, *Bacillus velezensis* IM14, CT02 e LIS05 e *Pseudomonas aeruginosa* IPR45.

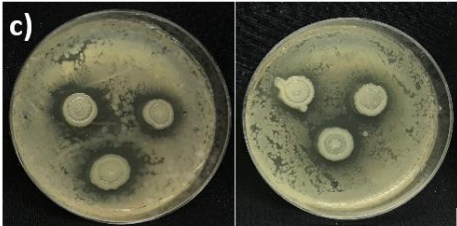
a)

Isolados	LIS04	LIS05	IM14	CT02	IPR45
LIS04 ( <i>P. ottowii</i> )		+	+	+	-
LIS05 ( <i>B. velezensis</i> )	+		+	+	-
IM14 ( <i>B. velezensis</i> )	+	+		+	-
CT02 ( <i>B. velezensis</i> )	+	+	+		-
IPR45 ( <i>P. aeruginosa</i> )	-	-	-	-	

b)



c)



(a) O sinal de adição indica uma combinação compatível e um sinal negativo indica uma combinação incompatível. (b) Combinações compatíveis: *B. velezensis* LIS05 X *B. velezensis* IM14 e *P. ottowii* LIS04 X *B. velezensis* IM14 e (c) incompatíveis em placas: *P. aeruginosa* IPR45 X *B. velezensis* LIS05 e *B. velezensis* IM14 X *P. aeruginosa* IPR45

Grande parte dos trabalhos de biocontrole de doenças e promoção do crescimento de plantas se baseiam na utilização de agentes únicos de biocontrole como antagonista a um único patógeno. Essa abordagem pode ser parcialmente responsável pelo desempenho inconsistente em campo, porque é improvável que um único agente biológico seja ativo em todos os ambientes do solo em que é aplicado ou ativo contra todos patógenos que atacam a planta hospedeira (Domenech et al., 2006). Em muitos casos, a mistura de agentes de biocontrole demonstrou resultar em níveis mais altos de controle do que a aplicação de um agente sozinho, devido ao efeito sinérgico da combinação de diferentes mecanismos de ação de cada agente individual (Liu et al., 2018). Porém, para que seja possível a aplicação bem-sucedida dos agentes de biocontrole é necessário que exista compatibilidade entre eles, o que foi demonstrado entre as espécies dos gêneros *Bacillus* e *Paenibacillus* utilizados nesse trabalho.

Os resultados dos testes feitos anteriormente indicam que esses isolados atuam sobre diferentes patógenos de plantas por diferentes mecanismos, como a produção de compostos antifúngicos solúveis e voláteis e produção de enzimas extracelulares, além de indução do mecanismo de defesa das plantas, que é considerado como outro mecanismo de biocontrole (Daud et al., 2019). Com base nesses resultados, acredita-se que a mistura de dois ou mais isolados com mecanismos de ação distintos será mais eficiente no biocontrole e promoção de crescimento de plantas do que os isolados individuais.

Liu e colaboradores (2018) encontraram que a mistura de dois isolados de *B. velezensis* (AP197 e AP298) foi mais eficiente no controle de diferentes doenças de plantas do que quando os isolados foram utilizados individualmente. O efeito sinérgico da utilização de dois ou mais microrganismos também foi descrito por Zalila-Kolsi e colaboradores (2016), onde a utilização de inóculo misto de *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* e *P. polymyxa* foi mais eficaz em reduzir os danos provocados por *F. graminearum* em plantas de trigo do que tratamentos com uma única estirpe.

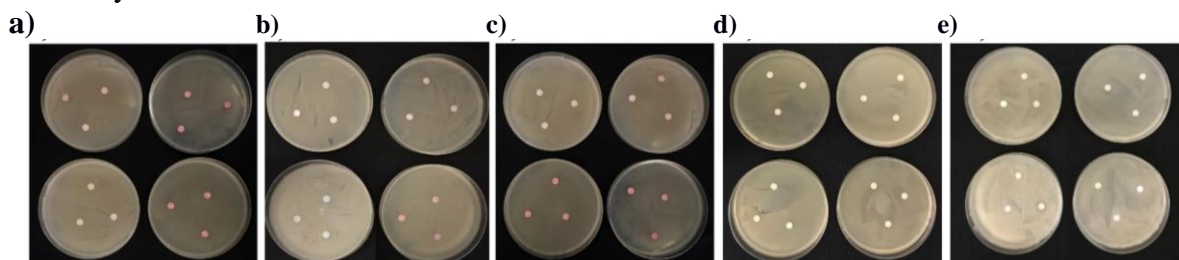
Apesar de *P. aeruginosa* IPR45 ter sido incompatível com os outros isolados, uma forma de utilizá-la no controle biológico, seria usar os metabólitos produzidos na forma de extrato e ou avaliar o seu potencial de patogenicidade segundo as normas da ANVISA. Esta espécie, associada a fungicidas, apresenta boa compatibilidade com esses defensivos, como foi demonstrado em um estudo de Siddiqui et al (2000), em que *P. aeruginosa* usada em combinação com fungicida Benlate foi efetiva no controle de fungos que infectam raízes no solo, além de promover um aumento do crescimento e rendimento de grãos do trigo.

## 5.8.2 Compatibilidade das bactérias antagonistas com fungicida químico

### 5.8.2.1 Método do disco de papel

Os isolados também foram avaliados quanto a sua compatibilidade com fungicida Fludioxonil + Metalaxyl-M pelo método do disco de papel. Nesse teste, nenhuma zona de inibição em torno dos halos foi observada nas placas com as três concentrações testadas (50 ppm, 100ppm e 1000ppm) após 96 h de incubação (Figura 13).

Figura 13 - Teste *in vitro* de compatibilidade entre os isolados e o fungicida Fludioxonil + Metalaxyl-M.



(a) *Paenibacillus ottowii* LIS04, (b, c, e) *Bacillus velezensis* LIS05, CT02 e IM14, respectivamente (e) *Pseudomonas aeruginosa* IPR45. Placa superior à esquerda: 0 ppm (controle com água destilada), placa superior à direita: 50 ppm, placa inferior à esquerda: 100 ppm e placa inferior à direita 1000 ppm.

### 5.8.2.2 Método turbidimétrico

Os cinco isolados selecionados foram testados quanto à sua suscetibilidade/tolerância ao fungicida Fludioxonil + Metalaxyl-M comumente usado no tratamento de sementes para o controle de *F. verticillioides*. O crescimento dos isolados na presença do fungicida foi avaliado pelo método turbidimérico e os resultados são apresentados na Tabela 19.

**Tabela 19** - Compatibilidade *in vitro* dos isolados bacterianos com o fungicida Fludioxonil + Metalaxyl-M em três diferentes concentrações, evidenciada pela densidade ótica medida pelo crescimento em meio de cultura líquido.

Isolados	Concentração (ppm) de Fludioxonil + Metalaxyl-M/valores de D.O a 600 nm*			
	50	100	1000	Controle bacteriano
<i>Paenibacillus</i> sp. LIS04	1,065 ± 0,00 b	0,848 ± 0,00 a	0,785 ± 0,02 c	0,861 ± 0,01 a
<i>B. velezensis</i> LIS05	0,457 ± 0,01 d	0,379 ± 0,02 c	0,320 ± 0,02 b	0,420 ± 0,01 a
<i>B. velezensis</i> CT02	0,989 ± 0,03 b	0,663 ± 0,01 a	0,742 ± 0,18 a	0,719 ± 0,04 a
<i>B. velezensis</i> IM14	0,932 ± 0,01 c	0,793 ± 0,02 a	0,667 ± 0,04 b	0,803 ± 0,08 a
<i>P. aeruginosa</i> IPR45	1,084 ± 0,00 a	1,095 ± 0,00 a	1,067 ± 0,02 a	1,114 ± 0,00 a

Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ). Controle bacteriano = meio de cultura contendo somente os isolados bacterianos, sem adição do fungicida.

Foi observada uma grande variação no crescimento dos isolados expostos às diferentes doses do fungicida. Na concentração de 50 ppm não ocorreu diminuição do crescimento de nenhum dos isolados, sendo que nessa concentração ainda foi possível observar um aumento da turbidez do meio de quatro dos cinco isolados testados, LIS04, LIS05, CT02 e IM14, após 24 h de incubação.

Alta compatibilidade entre os isolados CT02 de *B. velezensis* e IPR45 de *P. aeruginosa* com o fungicida foi observada, já que não ocorreu nenhuma redução do crescimento mesmo na maior dose utilizada (1000 ppm).

Reduções de 9,7% e 23,8% no crescimento foram observadas para o isolado LIS05 nas doses de 100 ppm e 1000 ppm respectivamente. Ocorreu ainda uma redução no crescimento dos isolados *B. velezensis* IM14 e *P. ottowii* LIS04 de 16,9% e 8,8% respectivamente na maior dose do fungicida Fludioxonil + Metalaxyl-M (1000 ppm).

Embora tanto o método de disco de papel quanto o método turbidimétrico sejam frequentemente empregados para testes de compatibilidade, variações nos resultados entre as duas técnicas podem ocorrer e estarem relacionadas, principalmente, à capacidade de difusão fungicida e à oxigenação no meio de cultura (Silva et al., 2006). No mais, a avaliação com discos é apenas qualitativa, sem a quantificação do inóculo, sendo justificada a necessidade de se complementar com outras técnicas de avaliação quantitativas, como o método turbidimétrico, que leva em consideração a padronização do inóculo e quantificação do crescimento bacteriano

em espectrofotômetro. Ressalta-se, ainda, que a distribuição uniforme dos produtos no meio líquido (método turbidimétrico) e a constante oxigenação do meio em relação ao método dos discos impregnados se apresenta como a condição mais próxima do efeito obtido no tratamento de sementes em campo.

A compatibilidade de Metalaxil-M em diferentes formulações já foi relatada em outros estudos. Nandini e colaboradores (2018), por exemplo, relataram compatibilidade de *Pseudomonas fluorescens* com Mancozeb (4%) + metalaxil-M (64%), não ocorrendo formação de halo de inibição nas concentrações de 500 ppm, 1000 ppm e 2000 ppm nos ensaios pelo método de disco de papel. Zalte e colaboradores (2013) relataram compatibilidade entre isolados de *B. subtilis* e *P. fluorescens* com Metalaxyl em concentrações de até 3000 ppm.

Nesse trabalho, os resultados do teste de disco de papel mostraram que os isolados foram compatíveis com a mistura Fludioxonil + Metalaxyl-M em todas as concentrações. Entretanto, no método turbidimétrico, ocorreram reduções no crescimento de três isolados. (Basamma & Shripad Kulkarni, 2017). Outra questão a ser considerada é a de que o tratamento biológico na semente para estes isolados deverá obedecer às boas práticas de uso de produtos biológicos, evitando o maior tempo de contato de exposição da bactéria com os químicos.

Grande parte dos trabalhos de compatibilidade entre os agentes antagonistas e os fungicidas químicos são desenvolvidos utilizando testes *in vitro*, cuja vantagem é permitir a máxima exposição dos microrganismos aos produtos avaliados. Dessa forma, ao se detectar a compatibilidade no laboratório a sua segurança em campo é praticamente garantida em relação ao efeito observado *in vitro*. Porém, quando observada a toxicidade em laboratório não significa que o mesmo efeito refletirá em campo (Alves et al., 1998).

## **5.9 Controle de *Fusarium verticillioides* em casa de vegetação**

### **5.9.1 Combinação entre bactérias**

Os isolados *P. ottowii* LIS04 e os isolados de *B. velezensis* LIS05, CT02 e IM14 foram testados contra *F. verticillioides* em experimento de casa de vegetação. Para esse ensaio o isolado *P. aeruginosa* IPR45 não foi incluído, pois apresentou incompatibilidade com os demais isolados *in vitro*.

Os parâmetros de germinação e crescimento de plantas de milho obtidas a partir de sementes infectadas com *F. verticillioides* e tratadas com as bactérias de forma individual ou em combinação estão expressos na Tabela 20. As sementes inoculadas com *F. verticillioides* e

sem nenhum tratamento apresentaram redução de 13% na taxa de germinação (TG) quando comparadas com o controle não inoculado (C) ou comparadas com as sementes inoculadas e tratadas com fungicida (MFv) que apresentaram germinação de 100%.

**Tabela 20** - Parâmetros de germinação de sementes e de crescimento de plantas de milho obtidas a partir de sementes infectadas com *Fusarium verticillioides* e tratadas com as bactérias individuais ou em combinação.

DESCRIÇÃO	TG %	Altura (cm)	Diâmetro (cm)	MSPA (g)	MSR (g)
Controle (C)	100	1,32 a	11,97 c	5,33 c	0,58 b
<i>F. verticillioides</i> (CFv)	86,7	1,34 a	9,39 d	4,45 c	0,40 b
Fludioxonil + Metalaxyl-M + <i>F. verticillioides</i> (MFv)	100	1,14 b	11,94 c	5,29 c	0,73 a
LIS04 + <i>F. verticillioides</i>	100	1,21 b	11,43 c	5,37 c	0,81 a
LIS05 + <i>F. verticillioides</i>	93,3	1,29 b	12,38 b	5,71 c	0,55 b
CT02 + <i>F. verticillioides</i>	100	1,23 b	13,24 b	6,64 b	0,48 b
IM14 + <i>F. verticillioides</i>	86,7	1,35 a	11,25 c	5,40 c	0,61 b
LIS04 + LIS05 + <i>F. verticillioides</i>	86,7	1,43 a	12,51 b	6,17 b	0,35 b
LIS04 + CT02 + <i>F. verticillioides</i>	86,7	1,49 a	13,95 a	8,45 a	0,81 a
LIS04 + IM14 + <i>F. verticillioides</i>	93,3	1,48 a	13,01 b	8,27 a	0,68 a
LIS05 + CT02 + <i>F. verticillioides</i>	93,3	1,42 a	11,58 c	7,28 a	0,58 b
LIS05 + IM14 + <i>F. verticillioides</i>	93,3	1,34 a	13,96 a	6,54 b	0,73 a
CT02 + IM14 + <i>F. verticillioides</i>	100	1,39 a	12,69 b	7,63 a	0,85 a

Letras diferentes na coluna indicam diferenças significativas entre os tratamentos pelo Teste de Scott Knott a 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ). TG = Taxa de germinação das sementes, MSPA = massa seca da parte aérea e MSR = massa seca do sistema radicular. LIS04: *Paenibacillus ottowii*, LIS05, CT02 e IM14: *Bacillus velezensis* e IPR45: *Pseudomonas aeruginosa*.

Sementes inoculadas com *F. verticillioides* e tratadas somente com o isolado *P. ottowii* LIS04 ou com o isolado *B. velezensis* CT02 de forma individual ou combinado com o isolado *B. velezensis* IM14 apresentaram taxa de germinação (TG) de 100% igual as sementes tratadas com o fungicida Fludioxonil + Metalaxyl-M (MFv) e ao controle sem inoculação com *F. verticillioides* (C).

Uma taxa de germinação de 93% foi observada quando se utilizou o isolado de *B. velezensis* LIS05 individualmente ou combinado com *B. velezensis* CT02 ou com IM14, mostrando efeito protetor nas sementes quando comparado ao efeito negativo do patógeno sobre a TG, que apresentou média de 86,7%.

A inoculação das sementes com *F. verticillioides* reduziu em 21% o diâmetro do colmo das plantas em comparação com o controle não inoculado (C). Quando foram utilizados os isolados de forma individual ou combinada nas sementes, todos os tratamentos foram favoráveis para o aumento do diâmetro de plantas em relação às plantas que foram somente inoculadas com o fitopatógeno e não receberam nenhum tratamento (CFv). Melhores combinações foram observadas entre os isolados *P. ottowii* LIS04 + *B. velezensis* CT02 e de *B.*



*velezensis* LIS05 + *B. velezensis* IM14 que aumentaram o diâmetro do colmo das plantas em relação às tratadas com fungicida e ao controle sem inoculação.

A inoculação das sementes com *F. verticillioides* (CFv) não ocasionou diferenças significativas na massa seca da parte aérea (MSPA) em relação ao controle sem inoculação (C). Porém, quando as sementes foram inoculadas com o fitopatógeno e tratadas com o isolado CT02 de forma individual ou quando foram utilizadas todas as combinações de isolados houve um aumento significativo da massa seca em relação aos tratamentos que não foram inoculados com nenhum isolado bacteriano (C, CFv e MFv). A massa seca das raízes (MSR) de plantas que foram inoculadas com *P. ottowii* LIS04 utilizado de forma isolada ou em combinação com *B. velezensis* CT02 ou IM14 e a combinação de dois isolados de *B. velezensis* (IM14 + LIS05) ou (IM14 + CT02) foram estatisticamente iguais ao tratamento com fungicida Fludioxonil + Metalaxyl-M (MFv).

Nenhum tratamento utilizando os isolados de forma individual ou combinados foram favoráveis para o aumento da altura de plantas em relação ao controle inoculado somente com *F. verticillioides* (CFv) ou sem inoculação (C). Reduções na altura das plantas foram observadas quando se utilizou o fungicida químico Fludioxonil + Metalaxyl-M (MFv) ou os isolados LIS04, LIS05 e CT02 individualmente.

No geral, os tratamentos contendo os isolados *P. ottowii* LIS04 e *B. velezensis* CT02 de forma individual ou as combinações de dois isolados de *B. velezensis* (CT02 + IM14) e (LIS05 + IM14); ou combinações de *P. ottowii* + *B. velezensis* (LIS04 + CT02) e (LIS04 + IM14) apresentaram resultados mais favoráveis na taxa de germinação das sementes, no diâmetro do colmo e no peso seco da planta quando comparados ao controle positivo que foram inoculadas com *F. verticillioides* e não receberam nenhum tratamento (CFv). Esses resultados indicam que os tratamentos de sementes com os isolados foram eficazes em minimizar os danos causados pela penetração de *F. verticillioides* nas sementes e raízes das plantas, melhorando os parâmetros de crescimento. Estes resultados estão de acordo com aqueles relatados por Einloft e colaboradores (2021) que mostraram que o tratamento de sementes com *Bacillus* de forma individual ou combinada e que foram expostas a *F. verticillioides* apresentaram aumento nos parâmetros de crescimento de plantas de milho.

A mistura de isolados antagonistas compatíveis pode aumentar a capacidade de controle dos fitopatógenos e melhoria da produtividade de plantas, o que ocorreria pela combinação de microrganismos com diferentes capacidades benéficas, como a produção de diferentes metabólitos antifúngicos solúveis e voláteis que podem agir sinergicamente, solubilização de fósforo, produção de fitormônios, entre outros (Kalantari et al., 2018). Os resultados obtidos

nesse estudo revelaram que os três isolados selecionados do gênero *Bacillus* CT02, IM14 e LIS05 e o isolado de *P. ottowii* LIS04 apresentam diferentes características de promoção de crescimento e de biocontrole, e que a inoculação dessas bactérias de forma combinada nas sementes foi benéfica. Como os experimentos de compatibilidade revelaram que esses isolados não se inibem mutuamente, é provável que os resultados aprimorados sejam devidos ao efeito sinérgico. A aplicação dessas bactérias é uma abordagem promissora para o biocontrole de *F. verticillioides* e melhoria da produtividade do milho. Porém, mais estudos são necessários para confirmar nossas descobertas em condições de campo.

### 5.9.2 Combinação entre bactérias e fungicida químico

Os parâmetros de germinação e crescimento de plantas de milho obtidas a partir de sementes infectadas com *F. verticillioides* e tratadas com as bactérias de forma individual ou combinadas com o fungicida químico Fludioxonil + Metalaxyl-M estão expressos na Tabela 21. A taxa de germinação das sementes inoculadas com *F. verticillioides* e tratadas com os isolados *P. ottowii* LIS04, *B. velezensis* CT02 e *P. aeruginosa* IPR45 aplicados de forma isolada e sem fungicida químico (SFM) foi de 100%, sendo igual a taxa de germinação do controle sem inoculação do fitopatógeno e das sementes inoculadas com *F. verticillioides* e tratadas com fungicida comercial (CFM). Para esses isolados, a aplicação conjunta com o fungicida afetou de forma negativa a taxa de germinação. Por outro lado, foi observado efeito positivo da combinação com o fungicida comercial (CFM) para isolados LIS05 e IM14; as taxas de germinação aumentaram de 93,3% e 86,7% para 100% e 93,3% respectivamente.

**Tabela 21** - Parâmetros de germinação e de crescimento de plantas de milho após 30 dias de tratamento das sementes com os isolados individuais ou em combinação com o fungicida Fludioxonil + Metalaxyl-M.

Tratamento	TG		Altura (cm)		Diâmetro		MSPA		MSR	
	SFM	CFM	SFM	CFM	SFM	CFM	SFM	CFM	SFM	CFM
Controle	100,0	100,0	1,29 aA	1,29 aA	11,97 Aa	11,97 cA	5,33 Aa	5,33 bA	0,58 aA	0,58 cA
Fv	86,7	100,0	1,34 aA	1,14 bB	9,39 cB	11,94 cA	4,45 Aa	5,29 bA	0,40 aA	0,73 cA
LIS04 + Fv	100,0	80,0	1,21 aB	1,40 aA	11,43 bA	11,62 cA	5,37 aA	5,96 bA	0,81 aA	0,33 dB
LIS05 + Fv	93,3	100,0	1,29 aA	1,37 aA	12,38 aB	14,66 bA	5,71 Ab	8,44 aA	0,55 aB	1,27 bA
CT02 + Fv	100,0	93,3	1,23 aA	1,35 aA	13,24 aA	12,92 cA	6,64 Ab	8,56 aA	0,48 aB	1,30 bA
IM14 + Fv	86,7	93,3	1,35 aA	1,32 aA	11,25 bB	14,82 bA	5,40 aB	7,82 aA	0,61 aA	0,83 cA
IPR45 + Fv	100,0	93,3	1,33 aA	1,20 bA	13,29 aB	16,55 aA	5,45 Ab	8,79 aA	0,67 aB	1,94 aA
FPA + Fv	93,3	93,3		1,25	11,34 bB	17,52 aA	5,99 Ab	8,41 aA	0,41 aB	1,15
			1,39 aA	bA						bA
Interação										
Bactéria x Fungicida			*		*		*		*	

Fv = *Fusarium verticillioides*; CFM = com fungicida Fludioxonil + Metalaxyl-M; SFM = sem fungicida Fludioxonil + Metalaxyl-M; TG = Taxa de germinação das sementes; MSPA = massa seca da parte aérea e MSR = massa seca do sistema radicular. Os dados são médias das amostras analisadas em triplicata. Letras minúsculas

diferentes na coluna e letras maiúsculas nas linhas indicam diferenças significativas pelo Teste de Scott Knott a 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ). \*Significativo para valor de  $p < 0,05$ . LIS04: *Paenibacillus ottowii*, LIS05, CT02 e IM14: *Bacillus velezensis* e IPR45: *Pseudomonas aeruginosa*.

A altura de plantas dos tratamentos com os isolados LIS04, LIS05, CT02 e IM14 associados ao fungicida químico (CFM) foi estatisticamente igual ao controle sem inoculação de *F. verticillioides* e superior à de plantas inoculadas com o fitopatógeno e tratadas somente com o fungicida químico.

A inoculação com *F. verticillioides* promoveu uma redução de 21,5% no diâmetro do colmo das plantas em comparação ao controle sem inoculação. Por sua vez, o diâmetro das plantas inoculadas com *F. verticillioides* e tratadas com os isolados LIS04, IM14 e o filtrado de *P. aeruginosa* (FPA) foram superiores ao diâmetro das plantas na mesma condição, mas que não receberam nenhum tratamento. Quando utilizado os isolados LIS05, CT02 e IPR45 sem tratamento químico, os diâmetros das plantas foram iguais ao controle sem inoculação de *F. verticillioides*.

Nas sementes tratadas com o fungicida Fludioxonil + Metalaxyl-M (CFM), não houve diferença estatística no diâmetro das plantas inoculadas ou sem inoculação com *F. verticillioides*. Em combinação com o fungicida, os isolados FPA, IPR45, IM14 e LIS05 promoveram um aumento de 46%, 38%, 24% e 22% respectivamente no diâmetro das plantas em relação àquelas inoculadas com *F. verticillioides* e tratadas somente com fungicida químico. Na interação, combinação dos isolados LIS05, IM14, IPR45 e seu filtrado (FPA) com o fungicida químico Fludioxonil + Metalaxyl-M foi mais eficiente que seu uso de forma individual.

Quando foi utilizado o fungicida químico para tratamento das sementes não houve diferença significativa na massa seca das plantas (MSPA) inoculadas ou sem inoculação com *F. verticillioides*. A associação do fungicida Fludioxonil + Metalaxyl-M com cinco isolados promoveu um aumento na massa seca das plantas em relação àquelas inoculadas com *F. verticillioides* e tratadas somente com fungicida químico e em relação as plantas sem inoculação. Incrementos de 66,1%, 61,8%, 59,5%, 58,9% e 47,8% na massa seca das plantas foram obtidos, utilizando os isolados IPR45, CT02, LIS05, FPA e IM14 respectivamente, em relação as plantas que receberam somente o tratamento químico. Na interação, as combinações dos isolados LIS05, CT02, IM14, IPR45 e seu filtrado (FPA) com o fungicida Fludioxonil + Metalaxyl-M foram mais eficientes que seu uso de forma individual.

Nas sementes tratadas com fungicida (CFM) não houve diferença significativa na massa seca das raízes (MSR) comparadas com as das plantas inoculadas com *F. verticillioides* ou

daquelas sem inoculação. Quando combinados com fungicida, os isolados IPR45 e seu filtrado (FPA) e os isolados CT02 e LIS05 promoveram um aumento na massa seca de raízes de 165%, 57%, 78% e 74% respectivamente, em relação as plantas cujas sementes foram tratadas somente com o fungicida químico. O desenvolvimento de um maior sistema radicular está diretamente relacionado à maior eficiência da planta na aquisição de nutrientes e água do solo e sendo assim, maior resistência a fitopatógenos de forma indireta.

Na interação, a combinação dos isolados LIS05, CT02, IPR45 e seu filtrado (FPA) com o fungicida Fludioxonil + Metalaxyl-M foi mais eficiente no aumento da massa seca das raízes que seu uso de forma individual. Para o isolado LIS04, seu uso de forma individual foi mais eficiente que combinado ao fungicida.

Quando não foi utilizado o fungicida químico (SFM) não houve diferenças significativas na altura, na massa seca de plantas e na massa seca de raízes entre os tratamentos.

De modo geral, a combinação dos isolados de *B. velezensis* LIS05, CT02 e IM14, IPR45 (*P. aeruginosa*) e seu filtrado (FPA) com o fungicida químico Fludioxonil + Metalaxyl-M mostraram efeitos benéficos para as plantas, sendo melhor que seu uso de forma individual. A combinação desses métodos pode melhorar o controle de *F. verticillioides* e promover ganhos de produtividade na cultura do milho em campo, conforme Luz (2003). O autor observou efeito positivo da combinação de Fludioxonil + Metalaxyl-M com o bioagente *Paenibacillus macerans* na germinação de sementes e no rendimento de grãos de milho em relação à testemunha. Como a combinação de agentes de biocontrole e fungicidas pode reduzir a dose do composto químico ou a sua frequência de aplicação e melhorar o controle de doenças, eles traduzem os princípios do manejo integrado de doenças (MID) na prática (Ons et al., 2020).

## **5.10 Controle biológico de *Fusarium verticillioides* em campo**

### **5.10.1 Avaliação do controle de *Fusarium verticillioides* a partir da inoculação das bactérias antagonistas e do fitopatógeno nas sementes**

Com base no desempenho em condições de casa de vegetação, três isolados de *B. velezensis* CT02, IM14, LIS05, um isolado de *P. ottowii* LIS04 e um isolado de *P. aeruginosa* IPR45 foram selecionadas para serem testadas em condições de campo. Tratamentos contendo isolados individuais, combinação de dois isolados ou combinações de isolados com fungicidas foram testados e apresentaram resultados significativos ( $p < 0,05$ ) na produtividade do milho.

A inoculação das sementes com *F. verticillioides* ocasionou uma redução significativa de 11,7% na produtividade do milho em relação às plantas que não foram inoculadas. Oito tratamentos, incluindo o filtrado de *P. aeruginosa* (FPA), as bactérias CT02 e IM14 utilizadas de forma individual ou em combinação, a combinação LIS04 + IM14 e as combinações dos isolados LIS05, IPR45 e CT02 com o fungicida de Fludioxonil + Metalaxyl-M, foram eficientes para evitar que perdas na produtividade acontecessem devido a inoculação de *F. verticillioides* (Tabela 22).

De modo geral, a maior produtividade foi obtida nas plantas tratadas com a combinação dos isolados CT02 + IM14, ocorrendo um incremento significativo de 11,08% em relação ao controle inoculado somente com *F. verticillioides* (Tabela 22). Os mesmos isolados, quando utilizados de forma individual, resultaram em aumentos na produtividade de 7,90% para CT02 e de 5,03% para IM14. O uso combinado de *P. ottowii* LIS04 com *B. velezensis* IM14, além do filtrado de *P. aeruginosa* (FPA), também resultaram em aumentos significativos da produtividade em comparação ao milho inoculado com o fitopatógeno que não recebeu tratamento bacteriano ou que recebeu apenas o tratamento químico.

Combinações das bactérias com de Fludioxonil + Metalaxyl-M também foram favoráveis para o aumento significativo ( $p < 0,05$ ) da produtividade do milho quando comparado com o milho inoculado com *F. verticillioides* e sem tratamento bacteriano. As combinações dos isolados LIS05, IPR45 e CT02 com o fungicida químico promoveram aumentos de 9,69%, 8,91% e 2,04%, respectivamente, em comparação ao controle não tratado. A produtividade foi significativamente superior ao efeito obtido com o uso individual do produto químico. Nesses casos, ocorreram incrementos de 12,74%, 11,93% e 4,87% pelos isolados LIS05, IPR45 e CT02, respectivamente, quando associadas com o fungicida químico.

Os demais tratamentos não foram eficientes em reduzir a perda de produtividade ocasionada pela inoculação de *F. verticillioides* nas sementes, apresentando resultados iguais ao do controle inoculado com o fitopatógeno e que não recebeu tratamento bacteriano.

**Tabela 22** - Produtividade de milho híbrido BRS Caimbé inoculado com os agentes antagonistas de forma individual, combinados entre si ou em associação com fungicida químico nas sementes após 180 dias de cultivo em condições de campo.

<b>Tratamentos</b>	<b>Produtividade (kg ha<sup>-1</sup>)</b>
Controle não inoculado	7134,18 a
Controle + <i>F. verticillioides</i>	6296,74 b
CT02 + <i>F. verticillioides</i>	6794,49 a
FPA + <i>F. verticillioides</i>	6694,04 a
IM14 + <i>F. verticillioides</i>	6613,52 a
IPR45 + <i>F. verticillioides</i>	6200,38 b
LIS04 + <i>F. verticillioides</i>	5898,75 b
LIS05 + <i>F. verticillioides</i>	5441,40 b
CT02 + IM14 + <i>F. verticillioides</i>	6995,02 a
LIS04 + IM14 + <i>F. verticillioides</i>	6783,44 a
LIS04 + CT02 + <i>F. verticillioides</i>	6296,92 b
LIS05 + IM14 + <i>F. verticillioides</i>	5956,82 b
Fludioxonil + Metalaxyl-M + <i>F. verticillioides</i>	6126,61 b
LIS05 + Fludioxonil + Metalaxyl-M + <i>F. verticillioides</i>	6907,26 a
IPR45 + Fludioxonil + Metalaxyl-M + <i>F. verticillioides</i>	6858,02 a
CT02 + Fludioxonil + Metalaxyl-M + <i>F. verticillioides</i>	6425,29 a
IM14 + Fludioxonil + Metalaxyl-M + <i>F. verticillioides</i>	6181,89 b
FPA + Fludioxonil + Metalaxyl-M + <i>F. verticillioides</i>	5559,85 b

Médias seguidas pelas mesmas letras indicam diferenças não significativas entre os tratamentos pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). LIS04: *Paenibacillus ottowii*, LIS05, CT02 e IM14: *Bacillus velezensis* e IPR45: *Pseudomonas aeruginosa*.

O tratamento biológico em sementes (bacterização) é uma forma de introduzir os agentes bacterianos no sistema solo-planta e tem sido amplamente utilizado para o controle biológico de patógenos de plantas do solo (Cavaglieri et al., 2005; Correa et al., 2009). Dessa forma, testamos o tratamento de sementes com cinco isolados que foram capazes de inibir o crescimento de *F. verticillioides in vitro* para avaliar sua atividade em campo. Nossos resultados sugerem que tratamentos utilizando bactérias de forma individual, combinação de duas bactérias e combinação de bactérias com fungicida Fludioxonil + Metalaxyl-M foram benéficos para evitar perdas de produtividade do milho infectado com *F. verticillioides*. A eficácia do tratamento de sementes com agentes antagonistas também foi relatada em muitos outros estudos. Inoculação de *Bacillus cereus* B25 nas sementes aumentou o rendimento de grãos e reduziu incidência e gravidade da podridão do colmo e da espiga, bem como a contaminação por fumonisinas de *F. verticillioides* (Lizárraga-Sánchez). Pereira e colaboradores (2010) verificaram melhor controle da contaminação por *F. verticillioides* no milho através da bacterização de sementes, em comparação com a pulverização direta das mesmas bactérias nas espigas de milho.

### 5.10.2 Avaliação do controle de *Fusarium verticillioides* a partir da inoculação do fitopatógeno no colmo do milho

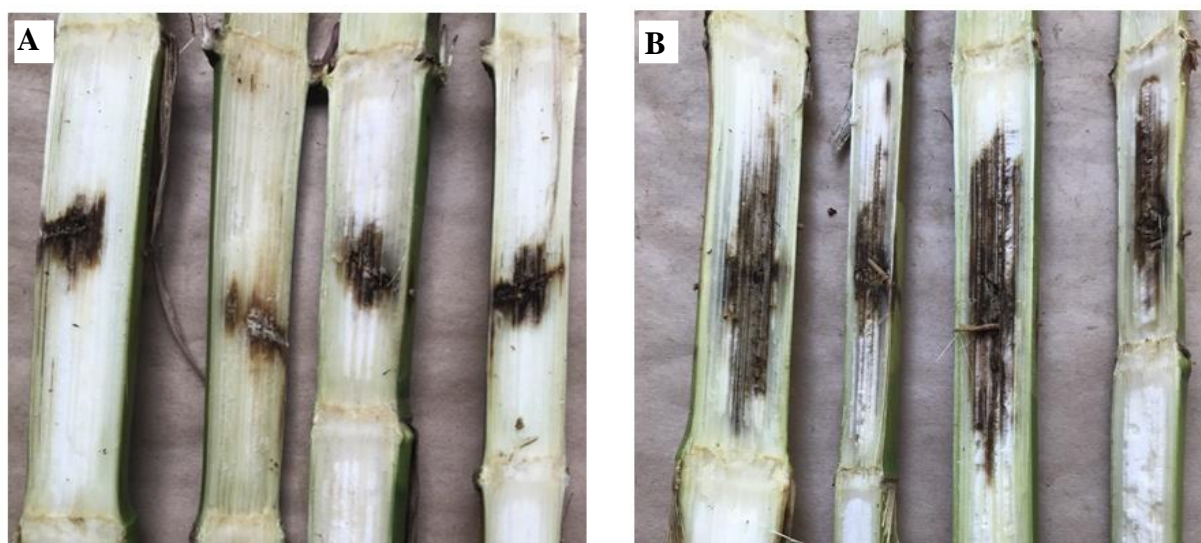
A podridão-do-colmo foi medida em porcentagem da severidade de acordo com a escala de Nicoli et al. (2015) após 30 dias da inoculação com *F. verticillioides*, tempo necessário para ocorrer a infecção pelo fitopatógeno. Foram avaliadas lesões de coloração marrom característica da podridão causada por *F. verticillioides* (Figura 14). A Tabela 23 mostra a severidade da doença observada em cada tratamento e o efeito dos isolados no percentual de redução da podridão-do-colmo. Os resultados mostraram que tanto os isolados utilizados de forma individual quanto as combinações dos isolados foram eficientes na redução da podridão do colmo em relação ao controle, onde as plantas não receberam nenhum tratamento visando controle do patógeno.

**Tabela 23** - Efeito do tratamento de sementes com os isolados bacterianos na redução da severidade da podridão-do-colmo após a inoculação de *Fusarium verticillioides* em campo.

Tratamentos	Severidade da doença (%)	Redução da podridão (%)
Controle não inoculado	10,4 a	–
Controle inoculado com <i>F. verticillioides</i>	47,9 d	0,00
Controle Fludioxonil + Metalaxyl-M + <i>F. verticillioides</i>	31,3 c	34,65
<i>P. ottowii</i> (LIS04) + <i>F. verticillioides</i>	22,9 b	52,19
<i>B. velezensis</i> (CT02) + <i>F. verticillioides</i>	31,3 c	34,65
<i>B. velezensis</i> (LIS05) + <i>F. verticillioides</i>	31,3 c	34,65
<i>B. velezensis</i> (IM14) + <i>F. verticillioides</i>	22,9 b	52,19
<i>P. aeruginosa</i> (IPR45) + <i>F. verticillioides</i>	27,1 c	43,42
Filtrado de <i>P. aeruginosa</i> (FPA) + <i>F. verticillioides</i>	31,3 c	34,65
CT02 + IM14 + <i>F. verticillioides</i>	22,9 b	52,19
LIS04 + CT02 + <i>F. verticillioides</i>	31,3 c	34,65
LIS05 + IM14 + <i>F. verticillioides</i>	31,3 c	34,65
LIS04 + IM14 + <i>F. verticillioides</i>	18,8 b	60,75

\*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Figura 14 - Efeito da inoculação dos isolados na redução da podridão-do-colmo causada por *Fusarium verticillioides* em milho.



(A) *Paenibacillus ottowii* LIS04 + *Bacillus velezensis* IM14 + *F. verticillioides* (B) Controle + *F. verticillioides*

A severidade da doença diminuiu significativamente ( $p < 0,05$ ) em todos os tratamentos com uso de isolados antagonistas. Os melhores resultados foram obtidos quando se utilizou os isolados *P. ottowii* LIS04 e *B. velezensis* IM14 de forma individual ou em combinação, além da combinação de dois isolados de *B. velezensis* (CT02 + IM14). Nesses tratamentos, as reduções da podridão do colmo foi de 52,1% e 60,75% em relação as plantas infectadas com *F. verticillioides* e não submetidas a quaisquer tipos de tratamento químico ou biológico. Cheng e colaboradores (2019) testaram *Bacillus methylotrophicus* TA-1 para reduzir a podridão do colmo do milho e obtiveram supressão da doença em 86,8% em casa de vegetação. No campo, a bacterização de sementes com TA-1 não só reduziu a incidência de podridão do colmo do milho, como também aumentou a altura, o diâmetro do colmo e o rendimento dos grãos. Cepa de *B. cereus* B25 também foi efetiva para reduzir significativamente a incidência da podridão do colmo causada por *F. verticillioides* no milho, conforme relatado por Figueroa-López e colaboradores (2016).

A produtividade anual do milho é significativamente reduzida devido a podridão do colmo causada especialmente por *F. verticillioides*. Nesse estudo selecionamos com sucesso espécies de *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Paenibacillus* com atividades inibitórias significativas para *F. verticillioides*. Esses resultados são promissores uma vez que não há híbridos resistentes ou tolerantes contra esta doença e a aplicação de nenhum produto químico é viável nesses casos (Kenganal et al., 2017). A maior redução da podridão do colmo foi obtida pela combinação dos isolados de *P. ottowii* LIS04 + *B. velezensis* IM14, que pode ter ocorrido devido ao efeito



sinérgico contra *F. verticillioides*. Esses isolados tem a capacidade de produzir uma vasta gama de metabólitos antifúngicos distintos, uma vez que se trata de duas espécies diferentes, conforme foi demonstrado pela análise do genoma e dados de UPLC-MS. Além disso, os metabólitos secundários produzidos por *B. velezensis* como fengicina, surfactina, micosubtilina, bacillomicina D, bacilisina macrolactina e os compostos orgânicos voláteis 2,3-butanodiol, metanotiol e isopreno produzidos por *P. ottowii* podem ativar a resposta de defesa da planta. Assim, esses efeitos cooperativos resultaram da combinação de diferentes mecanismos de ação que possivelmente potencializaram o efeito na redução da podridão do colmo por *F. verticillioides*.

## **5.11 Promoção de crescimento vegetal pelas bactérias antagonistas**

### **5.11.1 Caracterização dos isolados quanto a produção de fatores de promoção de crescimento vegetal *in vitro***

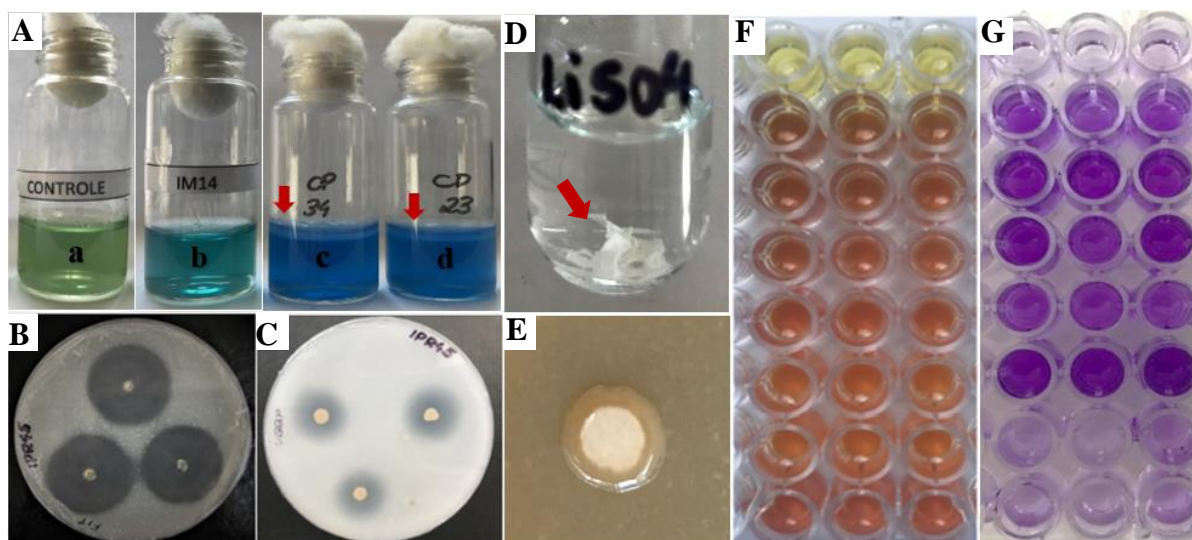
Microrganismos com atividade simultânea de biocontrole e promoção de crescimento vegetal são considerados de grande importância no desenvolvimento de novos bioprodutos. Espécies de *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Paenibacillus* produzem uma variedade de compostos envolvidos no biocontrole de fitopatógenos e na promoção do crescimento vegetal, o que os tornam candidatos para a maioria das aplicações agrícolas e biotecnológicas. A capacidade de produzir ácido indolacético (AIA), fixar nitrogênio, produzir amônia e exopolissacarídeos (EPS), formar biofilme e solubilizar e mineralizar P, a partir de formas pouco disponíveis de fósforo orgânico e inorgânico, são algumas das características desejáveis dos microrganismos antagonistas para que atuem também como promotores de crescimento de plantas (MPCP). Assim, todos os cinco isolados antagonistas de *F. verticillioides* foram testados quanto a esses parâmetros. Os resultados estão expressos na Tabela 24 e mostram que todos os isolados apresentaram pelo menos quatro das seis características de promoção do crescimento de plantas avaliadas, sendo elas produção de ácido 3-indol-acético (AIA), solubilização de fosfatos, produção de amônia, produção de EPS e formação de biofilme.

**Tabela 24** - Caracterização dos isolados quanto aos parâmetros relacionados à promoção de crescimento de plantas.

Isolado	Produção de AIA ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	Fixação de N	IS de fósforo <sup>1</sup>		Produção de $\text{NH}_3$ <sup>2</sup>	Formação de biofilme <sup>3</sup>	Produção de EPS
			Fitato	NBRIP			
LIS04	2,601	-	1,0	1,0	-	+	+
LIS05	5,174	-	0,8	0,3	+++	+++	+
CT02	2,666	-	0,7	0,2	+++	+++	+
IPR45	2,419	-	4,7	4,1	+++	++	+
IM14	3,204	-	1,1	0,2	+++	+++	+

<sup>1</sup> Índice de solubilização e mineralização de P em meio de cultura Fitato e NBRIP, contendo fósforo orgânico e inorgânico, respectivamente. <sup>2</sup> Grau de reação para a produção de amônia com base na coloração do caldo com reagente de Nessler: + cor amarela fraca e pequena produção, ++ cor amarela escura e quantidade média de produção, +++ cor marrom escuro e quantidade máxima de produção de amônia, - indica ausência de produção. <sup>3</sup> Fortemente formadora de biofilme (+++), Moderadamente formadora de biofilme (++) . Fracamente formadora de biofilme (+).

Figura 15 - Exemplos de detecção *in vitro* dos parâmetros de promoção de crescimento de plantas pelos isolados.



(A) Fixação de nitrogênio (a) controle negativo, (b) meio inoculado com o isolado IM14, (c e d) formação de película na superfície nos controles positivos indicada pela seta. (B) Mineralização de fosfato pela formação de halo claro ao redor das colônias em meio com fósforo orgânico e (C) Solubilização em meio inorgânico. (D) Produção de precipitado em etanol absoluto e (E) formação de material cremoso envolvendo a colônia: indicativos da produção de EPS. (F) Produção de amônia e (G) Produção de biofilme pelos isolados: os poços superiores contêm o controle negativo e os inferiores contêm os isolados. LIS04: *Paenibacillus ottowii*, LIS05, CT02 e IM14: *Bacillus velezensis* e IPR45: *Pseudomonas aeruginosa*

Todos os cinco isolados foram positivos para a produção de AIA em meio líquido, com valores médios variando entre 2 a 5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  na presença de DL-triptofano como precursor, sendo o isolado *B. velezensis* LIS05 o maior produtor desse hormônio com média de 5,174  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Essa variação na produção de AIA foi anteriormente relatada entre isolados da mesma espécie, e pode ser influenciada por condições da cultura, estágio de crescimento e disponibilidade de substrato (Herrera-Quiterio et al., 2020). Ao ser produzido pelos microrganismos promotores de crescimento de plantas, o fitohormônio AIA estimula o desenvolvimento das raízes das plantas, especialmente as secundárias, aumentando assim a

absorção de água e nutrientes, o que conseqüentemente promove maior crescimento e rendimento das plantas (Wagi & Ahmed, 2019).

Dos cinco isolados avaliados, todos apresentaram potencial solubilizador e mineralizador de fósforo comprovado pela formação de halo transparente nos meios contendo fitato de sódio e fosfato tri-cálcio (NBRIP), que são fonte de P orgânico e inorgânico respectivamente. Em geral a eficiência de solubilização pelos isolados foi baixa ( $IS < 2$ ) exceto por *P. aeruginosa* IPR45 que foi capaz tanto de solubilizar quanto de mineralizar fosfatos com alta eficiência ( $IS < 4$ ) (Figuras 15B e 15C). Alta solubilização de fósforo por bactérias da espécie *P. aeruginosa* em meio contendo fosfato tricálcico também foi encontrado por Sharma et al. (2017), que associou a produção de ácidos orgânicos como um importante mecanismo na solubilização da fonte de P do meio. O fósforo (P) é um nutriente altamente encontrado nos solos; no entanto, se liga facilmente a outros elementos, como ferro, alumínio e cálcio, dependendo do pH e da mineralogia do solo, se tornando indisponível para a absorção pelas plantas (Kalayu, 2019; de Amaral et al., 2020). Microrganismos solubilizadores de fosfatos (MSF) desempenham um papel importante na conversão de P indisponível (P orgânico e P inorgânico) em P disponível. Os MSF secretam ácido orgânico para dissolver fosfato inorgânico, enquanto os microrganismos mineralizadores secretam fosfatases para mineralizar enzimaticamente o fósforo orgânico (Chen & Liu, 2019). Esse efeito aumenta a disponibilidade de fósforo para as plantas, melhorando o crescimento e o rendimento vegetal (Billah et al., 2019).

Todos os isolados de *B. velezensis* LIS05, CT02 e IM14 e o isolado de *P. aeruginosa* IPR45 apresentaram máxima produção de amônia, indicada pela cor marrom nos poços (Figura 15F). Somente o isolado de *P. ottowii* LIS04 não mostrou produção de amônia em testes *in vitro* como também ocorreu em um estudo de Kavamura et al. (2013). A produção de amônia é uma característica importante dos microrganismos antagonistas e promotores de crescimento vegetal. Se os microrganismos produzem quantidade de amônia que excede seus próprios requisitos, como geralmente é o caso, o excedente é excretado no ambiente e fornece nitrogênio para a planta hospedeira promovendo o alongamento das raízes e produção de biomassa (Marques et al., 2010).

Nenhum dos isolados foi positivo para fixação de nitrogênio, mesmo que tenha ocorrido uma alteração de cor de verde para azul no meio semi-sólido em alguns casos, nenhuma formação de película foi observada quando comparados com o controle positivo (Figura 15A). Crescimento em meio semi-sólido livre de nitrogênio com formação de película perto da superfície é a primeira indicação de que as bactérias possam ser diazotróficas (Silva et al.,

2016). Embora os isolados de *Bacillus*, *Paenibacillus* e *Pseudomonas* testados aqui não tenham apresentado resultado positivo utilizando essa técnica de seleção inicial, outros autores relatam a capacidade de fixação de nitrogênio por esses gêneros por meio da identificação da presença do gene *nifH* nos seus genomas. Liu et al. (2019) identificaram o gene em isolados de *Paenibacillus* sp. isoladas de rizosfera e Yousuf et al. (2017) em diferentes espécies de *Bacillus* pela detecção do gene *nifH* e atividade da enzima nitrogenase. Nesse estudo, foi feito o sequenciamento do genoma completo das bactérias selecionadas e os genes relacionados a promoção de crescimento vegetal, incluindo o gene *nifH*, serão investigados em uma próxima etapa desse trabalho.

A produção de exopolissacarídeos (EPS) e a formação de biofilme foram características comuns para todos os isolados testados. Os EPS têm sido associados à adesão inicial de micróbios, que é a etapa principal para a formação de biofilme (Haggag, 2010). Dos cinco isolados testados, três (LIS05, CT02 e IM14) foram classificados como fortemente formadores de biofilme, sendo todos esses isolados pertencentes a espécie *B. velezensis* (Figura 15G).

Para o desenvolvimento de um bioproduto, é importante que os microrganismos selecionados apresentem capacidade de sobrevivência no ambiente a ser inserido e capacidade de colonizar a raiz e planta. A aderência bacteriana à raiz depende de uma série de fatores, incluindo a produção de polissacarídeos extracelulares (EPS), seguido pela formação de biofilme (Bogino et al., 2013). Nesse estudo, todos os isolados foram capazes de produzir EPS e formar biofilme *in vitro*. Muitos microrganismos promotores de crescimento de plantas secretam substâncias poliméricas extracelulares ou exopolissacarídeos (EPS). Os EPS são compostos diversos que apresentam múltiplas funções a depender da sua composição e estrutura. Os EPS microbianos facilitam a adesão dos microrganismos às superfícies das raízes das plantas e partículas do solo (Morcillo & Manzanera, 2021) e podem aumentar a agregação de partículas do solo e beneficiar as plantas, mantendo a umidade do ambiente e retendo nutrientes, além de proteger o ambiente contra o ressecamento e flutuações no potencial hídrico (Costa et al., 2018).

A formação de biofilme em torno das plantas hospedeiras é uma característica importante que tem sido associada à capacidade de colonização dos microrganismos (Li et al. 2013), além de funcionar como uma ferramenta de proteção contra condições ambientais hostis (Junaid & Khan, 2018). Em um ambiente onde os microrganismos enfrentam uma intensa competição, a capacidade de formar biofilme é uma característica essencial a ser considerada na escolha dos agentes a serem usados. Além de melhorar a colonização e a sobrevivência, a organização das comunidades microbianas em biofilmes também pode conduzir a importantes

mecanismos de biocontrole (Pandín, 2017; Pedraza et al., 2020). De fato, alguns mecanismos de controle empregados pelos antagonistas, como a síntese de compostos antimicrobianos e o sequestro de nutrientes estão diretamente relacionados a disputa por espaço e nutrientes (Molina et al., 2003). Bais e colaboradores (2004) associaram a atividade de biocontrole de *B. subtilis* contra o patógeno *Pseudomonas syringae* à capacidade de formação de biofilme e à produção de surfactina. Após a colonização das raízes, *B. subtilis* forma um biofilme estável e extenso e secreta surfactina, que atua em conjunto para proteger as plantas contra infecções por bactérias patogênicas. Esse efeito foi comprovado por Chen et al. (2013), que mostraram que a mutação de três genes relacionados a formação de biofilme resultou na falha na produção de surfactina e, portanto, na formação de biofilme, colonização radicular e controle da doença causada por *R. solanacearum* em tomateiro. *Pseudomonas*, outro gênero de agentes de biocontrole, utiliza a formação de biofilme como uma estratégia para eliminar concorrentes da rizosfera. Por exemplo, ao colonizar as raízes de plantas, o fitopatógeno *Phytophthora parasítica* produz exsudatos que estimulam o crescimento da bactéria antagonista *Pseudomonas putida*, essa por sua vez, forma um biofilme protetor e impede um novo crescimento de *P. parasítica* (Ahn et al., 2007).

### 5.11.2 Promoção de crescimento de milho em casa de vegetação

A seleção das bactérias candidatas a bioinoculantes para as plantas tem sido realizada por meio de testes *in vitro* em condições laboratoriais. Contudo, a reprodutibilidade dos resultados nos testes de laboratório nos sistemas solo-planta ainda é uma dificuldade a ser superada, visto que a eficiência da inoculação varia de acordo com o tipo de solo, cultivar e fatores ambientais (Calvo et al., 2014). Assim, as bactérias selecionadas e testadas para a promoção de crescimento vegetal *in vitro* foram utilizadas para tratamento de sementes afim de avaliar o efeito de promoção de crescimento em plantas de milho. Os resultados desse teste estão expressos na Tabela 25.

A avaliação em casa de vegetação, mostrou que as plantas as quais as sementes foram tratadas com a combinação dos dois isolados de *B. velezensis* CT02 e IM14 apresentaram os melhores resultados (Figura 16). Foi observado aumento significativo ( $P < 0,05$ ) de todos os parâmetros avaliados, sendo eles: altura das plantas (18,1%), diâmetro do colmo (15,1%), massa seca da parte aérea MSPA (44%), massa seca de raízes MSR (72,4%) e massa seca total (46,8%). O isolado de *B. velezensis* IM14 utilizado para tratar as sementes de forma individual também se destacou na promoção do crescimento do milho aumentando significativamente

( $P < 0,05$ ) quatro dos cinco parâmetros de crescimento vegetal avaliados. Sendo eles: diâmetro do colmo (13,6%), massa seca da parte aérea MSPA (54,2%), massa seca de raízes MSR (77,5%) e massa seca total (56,6%). Foi observado ainda aumento significativo da altura de plantas (16,6%), da massa seca da parte aérea MSPA (35,2%) e massa seca total MST (30,7%) nas inoculadas com a combinação de dois isolados de *B. velezensis* (LIS05 + CT02).

*Bacillus velezensis* além de um importante agente de controle biológico tem sido citado em vários estudos como um eficiente promotor de crescimento vegetal (Meng et al., 2016; Fan et al., 2018). Resultados semelhantes foram encontrados em um trabalho de Liu e colaboradores (2018), em que a mistura de dois isolados de *B. velezensis* aumentou significativamente 13 de 15 parâmetros relacionados ao crescimento vegetal na presença de patógenos, enquanto os isolados individuais AP197, AP298 e o controle positivo aumentaram 8, 6 e 4 parâmetros de crescimento, respectivamente. Espécies de *Bacillus* promovem o crescimento de plantas pela produção de AIA, fixação de N, solubilização de fosfatos, produção de amônia e formação de biofilme (Hwangbo et al., 2016; Meng et al., 2016; Kim et al., 2017b). Nesse trabalho, os testes *in vitro* mostraram que os isolados de *Bacillus* sp. IM14, CT02 e LIS05 foram positivos para cinco das seis características de promoção de crescimento vegetal avaliadas, sendo elas produção de AIA, solubilização de P, formação de biofilme, produção de amônia e EPS.

Foi observado aumento significativo ( $P < 0,05$ ) do diâmetro do colmo (22,3%), das matérias secas da parte aérea MSPA (48,7%) e massa seca total MST (43,6%) nas plantas inoculadas com *P. aeruginosa* IPR45. Nesse trabalho, esse isolado foi testado nos experimentos de casa de vegetação somente de forma individual por não ter apresentado compatibilidade com os outros isolados em testes realizados anteriormente. *P. aeruginosa* é uma bactéria gram-negativa, móvel e ubíqua, amplamente encontrada na rizosfera e que tem potenciais aplicações práticas em sistemas agrícolas (Chandra et al., 2020). Seu potencial como promotora de crescimento de plantas, agente de biorremediação e agente de controle biológico vem sendo descrito ao longo dos anos. Várias cepas de *P. aeruginosa* estão envolvidas na promoção do crescimento de plantas (Roychowdhury et al., 2019; Ghadamgahi et al., 2022). Nos testes *in vitro*, *P. aeruginosa* IPR45 foi o único isolado capaz tanto de solubilizar quanto de mineralizar fosfatos com alta eficiência ( $IS < 4$ ). O fósforo (P) é um dos elementos mais essenciais para o crescimento das plantas, porém sua disponibilidade nos solos é limitada devido à sua rápida fixação seguida pela produção de óxidos como hidróxido de cálcio  $[Ca(OH)_2]$ , hidróxido de alumínio  $[Al(OH)_3]$  e hidróxido ferroso  $[Fe(OH)_2]$  (Sah et al., 2021). Alguns microrganismos conhecidos como solubilizadores de fosfato têm a capacidade de converter fósforo insolúvel em solúvel tornando-o disponível para as plantas (Mahidi et al., 2011). Em um trabalho de

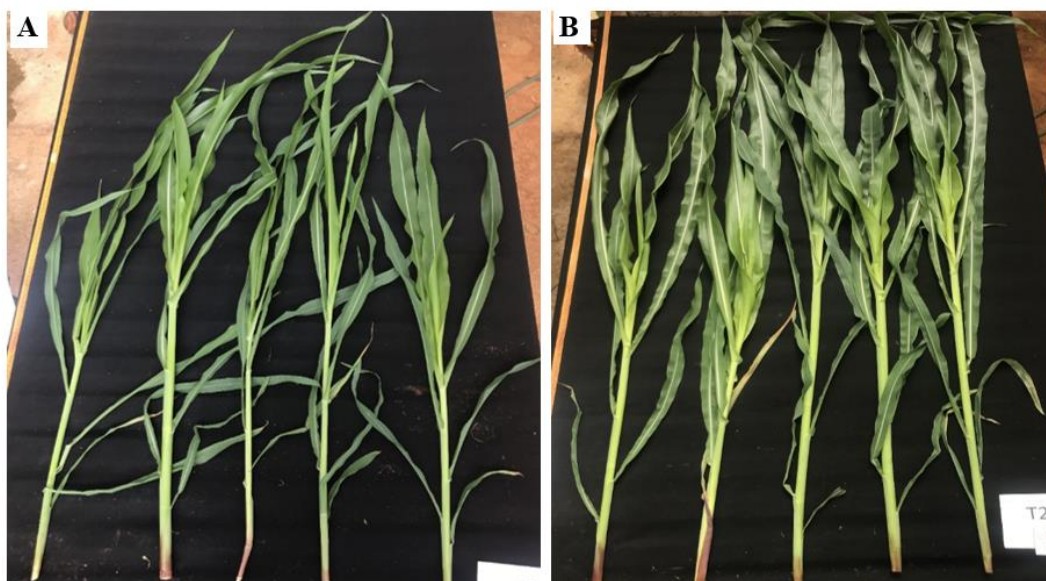
Roychowdhury e colaboradores (2019), sementes que foram inoculadas com *P. aeruginosa* após 30 dias da semeadura, apresentaram aumento do peso úmido (até 140%), peso seco (até 88%), comprimento da raiz (até 25%) e comprimento do colmo (até 14%) em relação aos controles não inoculados.

**Tabela 25** – Dados de promoção de crescimento de milho obtidos após tratamento das sementes com os isolados bacterianos individuais ou em combinação.

TRATAMENTOS	Altura (cm)	Diâmetro (cm)	MSPA (g)	MSR (g)	MST (g)
Controle (C)	1,32 b	11,97 b	5,33 b	0,58 b	5,91 b
LIS04 ( <i>P. ottowii</i> )	1,27 b	11,99 b	5,15 b	0,49 b	5,64 b
LIS05 ( <i>B. velezensis</i> )	1,27 b	12,68 b	5,86 b	0,49 b	6,35 b
CT02 ( <i>B. velezensis</i> )	1,15 b	12,57 b	5,24 b	0,50 b	5,74 b
IM14 ( <i>B. velezensis</i> )	1,35 b	13,60 a	8,22 a	1,03 a	9,26 a
IPR45 ( <i>P. aeruginosa</i> )	1,36 b	14,64 a	7,93 a	0,56 b	8,49 a
FPA (Filtrado de <i>P. aeruginosa</i> )	1,26 b	10,77 b	4,54 b	0,20 b	4,74 b
<i>P. ottowii</i> + <i>Bacillus</i> sp. (LIS04 + LIS05)	1,27 b	11,44 b	4,12 b	0,36 b	4,49 b
<i>P. ottowii</i> + <i>B. velezensis</i> (LIS04 + CT02)	1,39 b	11,18 b	5,51 b	0,44 b	5,96 b
<i>P. ottowii</i> + <i>B. velezensis</i> (LIS04 + IM14)	1,30 b	11,64 b	5,69 b	0,41 b	6,11 b
<i>B. velezensis</i> + <i>B. velezensis</i> (LIS05 + CT02)	1,54 a	12,07 b	7,21 a	0,51 b	7,73 a
<i>B. velezensis</i> + <i>B. velezensis</i> (LIS05 + IM14)	1,28 b	11,47 b	4,82 b	0,47 b	5,30 b
<i>B. velezensis</i> + <i>B. velezensis</i> (CT02 + IM14)	1,56 a	13,78 a	7,68 a	1,00 a	8,68 a

Os dados são médias de nove amostras analisadas em triplicata. Letras diferentes na coluna indicam diferenças significativas entre os tratamentos pelo Teste de Scott Knott a 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ). TG = Taxa de germinação das sementes, MSPA = massa seca da parte aérea e MSR = massa seca do sistema radicular.

Figura 16 - Avaliação da promoção de crescimento do milho pelos isolados em casa de vegetação.



(A) Controle. (B) Plantas cujas sementes foram tratadas com a combinação de dois isolados de *Bacillus velezensis* (CT02 + IM14).

Microrganismos têm sido utilizados na agricultura como biofertilizantes e agentes de biocontrole para melhorar o crescimento das plantas e controlar o crescimento de fitopatógenos (Naphade & Hussain, 2014). O uso desses microrganismos com efeitos benéficos múltiplos no desenvolvimento de bioprodutos representam uma alternativa aos pesticidas e fertilizantes sintéticos na busca de uma agricultura mais sustentável (Silva et al., 2022). Sabe-se que em uma condição natural, a promoção de crescimento de plantas e a atividade de biocontrole no meio ambiente é oriunda de um efeito conjunto de características presentes em várias bactérias simbióticas (Richard, 2019). Dessa forma, a escolha de bactérias com diferentes habilidades se torna importante a fim de fornecer um consórcio bacteriano que se assemelhe com a microbiota natural (Kavamura et al., 2013).

Espécies de *Bacillus* e *Paenibacillus*, além de *P. aeruginosa* são bem conhecidas como promotoras de crescimento vegetal além de antagonistas de diferentes patógenos de plantas (Liu et al., 2008; Santoyo et al., 2012; Liu et al., 2019a; Liu et al., 2019b). Nesse trabalho, isolados dessas espécies (LIS05, CT02 e IM14, LIS04 e IPR45, respectivamente), que foram anteriormente selecionados como antagonistas a *F. verticillioides* (Diniz et al., 2021), também foram testados quanto as características de promoção de crescimento *in vitro* e promoção de crescimento de milho em casa de vegetação, de forma individual ou em combinação.

As bactérias promotoras de crescimento vegetal auxiliam no desenvolvimento das plantas por meio de três mecanismos primários: fitoestimulação, biofertilização e biocontrole (Liu et al., 2017). A fitoestimulação aumenta o crescimento das plantas por meio da produção direta de fitohormônios, como o ácido indol-3-acético (AIA). A biofertilização ocorre através da solubilização e assimilação de nutrientes como fósforo e nitrogênio que não estão prontamente disponíveis para as plantas no solo. O biocontrole é um mecanismo indireto de promoção do crescimento vegetal no qual os microrganismos protegem as plantas contra patógenos através da produção de metabólitos secundários bioativos ou por competição por nutrientes (Faria et al., 2021).

A formulação de misturas de microrganismos benéficos é uma estratégia para abordar múltiplos modos de ação na promoção de crescimento vegetal e biocontrole de múltiplos patógenos (Jetiyanon e Kloepper 2002). Microrganismos com diferentes efeitos positivos para as plantas utilizados em mistura podem aprimorar os resultados devidos ao efeito sinérgico (Silva et al., 2022). Mecanismos de promoção de crescimento de plantas combinados com aqueles relacionados ao controle de fitopatógenos são de grande importância na escolha de cepas a serem utilizadas no desenvolvimento de um inoculante multifuncional. O uso de microrganismos com múltiplos benéficos em sistemas de cultivo pode levar ao aumento de



produtividade, reduzir os custos de produção, aumentar a segurança alimentar e reduzir o uso de agroquímicos, contribuindo para uma agricultura mais sustentável (Rezende et al., 2021).

Os resultados obtidos mostraram que não há dúvidas quanto à eficácia dos isolados IM14 e IPR45 utilizados de forma individual ou as combinações IM14 + CT02 e CT02 + LIS05 para melhorar o desenvolvimento de plantas de milho em condições de casa de vegetação. Neste caso, o aumento da produtividade pode ser explicado pelos mecanismos de promoção de crescimento aqui validados em bancada e em casa de vegetação, aumentando o crescimento da planta de milho por mecanismos hormonais, nutricionais e pela melhor colonização das raízes, além do maior antagonismo ao patógeno.

Os isolados testados apresentaram potencial de promoção de crescimento e atividade antifúngica de amplo espectro contra fungos fitopatogênicos, que foram detectados nesse trabalho e em trabalhos anteriores (Diniz et al., 2021, 2022). Esses resultados abrem perspectivas para a utilização desses isolados como inoculantes para aumentar a fertilidade do solo, o crescimento e a proteção de plantas.

## 6 CONCLUSÕES

- Isolados de *Bacillus* sp., *Paenibacillus* sp. e *P. aeruginosa* inibiram *F. verticillioides* e outros patógenos do milho (*M. phaseolina*, *Stenorcapella* sp., *F. graminearum*, *C. graminicola* e *Bipolaris* sp.) em testes *in vitro*.
- O sequenciamento genômico revelou que os isolados LIS05, IM14 e CT02 pertencem a espécie *B. velezensis*, LIS04 a *P. ottowii* e confirmou que o isolado IPR45 era *P. aeruginosa*.
- Os isolados antagonistas produziram metabólitos antifúngicos solúveis em diferentes meios (PD, LB + glicose, TSB e Landy) que inibiram até 100% do crescimento de *F. verticillioides*.
- A análise por HPLC-MS e dos genomas revelou que a atividade de biocontrole dos isolados se deve principalmente a síntese de metabólitos antifúngicos, especialmente lipopeptídeos para *Bacillus* sp. e *Paenibacillus* sp. e raminolípídeos para *P. aeruginosa*.

- Em casa de vegetação, os tratamentos contendo os isolados *P. ottowii* LIS04 e *B. velezensis* CT02 de forma individual ou as combinações de dois isolados de *B. velezensis* (CT02 + IM14) e (LIS05 + IM14); e as combinações de *P. ottowii* + *B. velezensis* (LIS04 + CT02) e (LIS04 + IM14) apresentaram resultados mais favoráveis na taxa de germinação das sementes, no diâmetro do colmo e no peso seco da planta.
- A utilização dos isolados de *B. velezensis* LIS05, CT02 e IM14, *P. aeruginosa* IPR45 e seu filtrado (FPA) em combinação com o fungicida químico foi favorável para o aumento da maior parte dos parâmetros agrônômicos avaliados nos experimentos em casa de vegetação.
- A combinação de dois isolados de *B. velezensis* (CT02 + IM14) promoveu um incremento de 11,08% na produtividade do milho quando comparando com o controle inoculado somente com *F. verticillioides*.
- As combinações LIS05, IPR45 e CT02 com o fungicida químico promoveram aumentos de 12,74%, 11,93% e 4,87%, respectivamente, na produtividade do milho em comparação ao efeito obtido com o uso individual do produto químico.
- Tanto os isolados utilizados de forma individual quanto as combinações de dois isolados foram eficientes na redução da podridão do colmo do milho em campo, porém, melhores resultados foram obtidos utilizando os isolados *P. ottowii* LIS04 e *B. velezensis* IM14 individualmente ou combinados, além da combinação de dois isolados de *B. velezensis* (CT02 + IM14).
- Todos os isolados apresentaram pelo menos quatro das seis características de promoção de crescimento vegetal avaliadas *in vitro*, incluindo solubilização e mineralização de P, produção de AIA e amônia, formação de biofilme e produção de EPS.
- Em casa de vegetação, quatro das cinco bactérias, quando utilizadas individualmente e/ou em combinação, contribuíram para a melhoria de no mínimo três parâmetros de crescimento da planta.

- A combinação dos dois isolados de *B. velezensis* (CT02 + IM14) se destacou na avaliação da promoção de crescimento vegetal em casa de vegetação, com aumento significativo da altura das plantas, diâmetro do colmo, massa seca da parte aérea, massa seca de raízes e massa seca total.
- Para uma melhor compreensão dos possíveis mecanismos de promoção do crescimento de plantas pelas bactérias, a presença de genes relacionados aos principais mecanismos diretos de PCP será ser investigada nos seus genomas.
- Trabalhos futuros terão como alvo desenvolver bioformulações baseadas em *B. velezensis* CT02, IM14 e LIS05, *P. ottowii* LIS04 e *P. aeruginosa* IPR45, com benefícios de promoção de crescimento de plantas e controle de *F. verticillioides* para utilização na cultura do milho.
- Considerando os resultados, é possível indicar pelo menos duas melhores combinações de isolados, sendo (CT02 + IM14) e (LIS04 + IM14); e duas melhores combinações de bactérias com fungicida químico, sendo CT02 ou IPR45 + Fludioxonil + Metalaxyl-M para o uso como biofungicidas na cultura do milho

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ABDEL-RAHMAN, H. M.; SALEM, A. A.; MOUSTAFA, M. M. A.; EL-GARHY, H. A. S. A novice *Achromobacter* sp. EMCC1936 strain acts as a plantgrowth-promoting agent. **Acta Physiol Plant**, 39, n. 61, 2017.

AHANGER, R. A.; BHATAND, H. A.; DAR, N. A. Biocontrol agents and their mechanism in plant disease management. **Scientia Acta Xaveriana**, v. 5, n.1, p. 47-58, 2014.

AHN, S.-J.; YANG, C.-H.; COOKSEY, D. A. *Pseudomonas putida* 06909 genes expressed during colonization on mycelial surfaces and phenotypic characterization of mutants. **J Appl Microbiol.**, 103 (1), p.120-32, 2007.

AKPA, E.; JACQUES, P.; WATHELET, B.; PAQUOT, M.; FUCHS R.; BUDZIKIEWICZ, H.; THONART1, P. Influence of Culture Conditions on Lipopeptide Production by *Bacillus subtilis*. **Appl Biochem Biotechnol.**, 91, p. 551-561, 2001.

ALMEIDA, A. P.; CORRÊA, B.; MALLOZZI, M. A. B.; SAWASAKI, E.; ORTEGA, E. M. Mycoflora and aflatoxin/fumonisin production by fungal isolates from freshly harvested corn hybrids. **Braz. J. Microbiol.**, v. 31, n. 4, p. 321-26, 2000.

ALVES, S. B.; MOINO JÚNIOR, A.; ALMEIDA, J. E. M. Produtos fitossanitários e entomopatógenos. In: ALVES, S. B. (Ed.) Controle microbiano de insetos, Piracicaba: FEALQ, capítulo 8, p. 217-238, 1998.

AMARAL, P. F.; COELHO, M. A.; MARRUCHO, I. M.; COUTINHO, J. A. Biosurfactants from yeasts: characteristics, production and application. **Adv Exp Med Biol.**, v. 672, p. 236-249, 2010.

ARSENEAULT, T.; FILION, M. Biocontrol through antibiosis: Exploring the role played by subinhibitory concentrations of antibiotics in soil and their impact on plant pathogens. **Canadian Journal of Plant Pathology**, 39:3, p. 267-274, 2017.

ASARI, S.; MATZÉN, S.; PETERSEN, M. A.; BEJAI, S.; MEIJER, J. Multiple effects of *Bacillus amyloliquefaciens* volatile compounds: plant growth promotion and growth inhibition of phytopathogens. **FEMS Microbiology Ecology**, Jun, 92(6):fiw070, 2016.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS ÍNDÚSTRIAS DO MILHO - ABIMILHO, 2020. Disponível em: <http://www.abimilho.com.br>. Acesso em maio/2020.

AZIZ, R. K.; BARTELS, D.; BEST, A. A.; DEJONGH, M.; DISZ, T.; EDWARDS, R. A.; FORMSMA, K.; GERDES, S.; GLASS, E. M.; KUBAL, M.; MEYER, F.; OLSEN, G.J.; OLSON, R.; OSTERMAN, A.L.; OVERBEEK, R.A.; MCNEIL, L.K.; PAARMANN, D.; PACZIAN, T.; PARRELO, B.; PUSCH, G.D.; REICH, C.; STEVENS, R.; VASSIEVA, O.; VONSTEIN, V.; ZAGNITKO, O. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. **BMC genomics**, 9:75, 2008.

BAIS, H. P.; FALL, R.; VIVANCO, J. M. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against Infection of Arabidopsis Roots by *Pseudomonas syringae* is Facilitated by Biofilm Formation and Surfactin Production. **Plant Physiology**, 134 (1), p. 307-319, 2004.

BARDIN, M.; AJOUZ, S.; COMBY, M.; LOPEZ-FERBER, M.; GRAILLOT, B.; SIEGWART, M.; NICOTI, P. C. Is the efficacy of biological control against plant diseases likely to be more durable than that of chemical pesticides? **Front Plant Sci.**, 6:566, 2015.

BARROSO, V. M.; ROCHA, L. O.; REIS, T. A.; REIS, G. M.; DUARTE, A. P.; MICHELOTTO, M. D.; CORREA, B. *Fusarium verticillioides* and fumonisin contamination in Bt and non-Bt maize cultivated in Brazil. **Mycotoxin Res**, v. 33, p. 121-127, 2017.

BASAMMA, H.; KULKARNI, S. Studies on Compatibility of *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn. with Chemical Fungicides. **Int.J.Curr. Microbiol.App.Sci.** 6(3), p. 578-586, 2017.

BEDOYA, J. C.; DEALIS, M. L.; SILVA, C. S.; NIEKAWA, E.T.G.; NAVARRO, M.O.P.; SIMIONATO, A.S.; MODOLON, F.; CHRYSSEAFIDIS, A.L.; ANDRADE, G. Enhanced production of target bioactive metabolites produced by *Pseudomonas aeruginosa* LV strain. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 17, p. 653-664, 2019.

BERRAQUERO, F. R.; BAYA, A. M.; CORMENZANA, A. R. Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. **Ars Pharmaceutica**, v.17, n. 4, p.399- 406, 1976.

BHALE, U. N.; RAJKONDA, J. N. Compatibility of fungicides and antagonistic activity of *Trichoderma* spp. against plant pathogens. **Bioscience Methods**, v. 6, n. 3, p. 1-9, 2015.

BHATTACHARYYA, P. N.; JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 1327-1350, 2012.

BHATTACHARYYA, S. K.; SEN, K.; DE, R. K.; BANDOPADHYAY, A.; SENGUPTA, C.; ADHIKARY, N. K. Integration of biocontrol agents with fungicide, weedicide and plant growth regulator for management of stem and root rot of jute. **Journal of Applied and Natural Science**, 9(2), p. 899-904, 2017.

BILLAH, M.; KHAN, M.; BANO, A.; HASSAN, T.U.; MUNIR, A.; GURMANI, A. R. Phosphorus and phosphate solubilizing bacteria: Keys for sustainable agriculture. **Geomicrobiology Journal**, 36:10, p. 904-916, 2019.

BLACUTT, A. A.; GOLD, S. E.; VOSS, K. A.; GAO, M.; GLENN, A. E. *Fusarium verticillioides*: Advancements in understanding the toxicity, virulence, and niche adaptations of a model mycotoxigenic pathogen of maize. **Phytopatology**, v. 108, p. 312-326, 2018.

BOGINO, P. C.; OLIVA, M. D. E. L.; SORROCHE, F. G.; GIORDANO, W. The role of bacterial biofilms and surface components in plant-bacterial associations. **Int J Mol Sci.** 14(8):15838-59, 2013.

BONATERRA, A.; BADOSA, E.; DARANAS, N.; FRANCÉS, J.; ROSELLÓ, G.; MONTESINOS, E. Bacteria as Biological Control Agents of Plant Diseases. **Microorganisms**, 10(9):1759, 2022.

BORAH, S. N.; GOSWAMI, D.; SARMA, H. K.; CAMEOTRA, S. S.; DEKA S. Rhamnolipid Biosurfactant against *Fusarium verticillioides* to Control Stalk and Ear Rot Disease of Maize. **Front. Microbiol.** 7:1505, 2016.

BOROWICZ, J.; SAAD OMER, Z. 2000. Influence of rhizobacterial culture media on plant growth and on inhibition of fungal pathogens. **BioControl** 45, p. 355-371, 2000.

BORRISS, R. Use of Plant-Associated *Bacillus* Strains as Biofertilizers and Biocontrol Agents in Agriculture. In: MAHESHWARI, D. (eds) Bacteria in Agrobiolology: Plant Growth Responses. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 41-76, 2011.

BRITO, A. H.; PINHO, R. G. V.; PEREIRA, J. L. A. R.; BALESTRE, M. Controle químico da cercosporiose, mancha-branca e grãos ardidos em milho. **Revista Ceres**, v. 60, n.5, p. 629-635, 2013.

BULTEL-PONCÉ, V. V.; BERGE, J. P.; DEBITUS, C.; NICOLAS, J. L.; GUYOT M. Metabolites from the Sponge-Associated Bacterium *Pseudomonas* Species. **Mar Biotechnol** (NY). Jul;1(4):384-390, 1999.

BUTLER, M. J.; DAY, A. W.; HENSON, J. M.; MONEY, N. P. Pathogenic Properties of Fungal Melanins, **Mycologia**, v. 93, n.1, p. 1-8, 2001.

BUTLER, M. J.; LAZAROVITS G.; HIGGINS, V. J.; LACHANCE, M-A. Identification of a black yeast isolated from oak bark as belonging to genus *Phaeococcomyces* sp: analysis of melanin produced by the yeast. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 35, n.7, p.728-734, 1989.

CALVO, P.; NELSON, L.; KLOEPPER, J. W. Agricultural uses of plant biostimulants. **Plant Soil** 383, p. 3-41, 2014.

CAMEOTRA, S. S.; MAKKAR, R. S.; KAUR, J.; MEHTA, S.K. Synthesis of biosurfactants and their advantages to microorganisms and mankind, **Adv Exp Med Biol.**, 672, p. 261-280, 2010.

CAMPANILE, G.; RUSCELLI, A.; LUISI, N. Antagonistic activity of endophytic fungi towards *Diplodia corticola* assessed by *in vitro* and in planta test. **European Journal of Plant Pathology**, v.117, p. 237-246, 2007.

CAPPUCCINO, J. C.; SHERMAN N. In: Microbiology: A Laboratory Manual, third ed. Benjamin/cummings Pub. Co. New York, p. 125-179, 1992.

CAVAGLIERI, L.; ORLANDO, J.; RODRÍGUEZ, M. I.; CHULZE, S.; ETCHEVERRY, M. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides* *in vitro* and at the maize root level. **Res Microbiol.**, 156(5-6):748-54, 2005.

CESA-LUNA, C.; BAEZ, A.; QUINTERO-HERNÁNDEZ, V.; DE LA CRUZ-ENRÍQUEZ, J.; CASTAÑEDA-ANTONIO, M. D.; MUÑOZ-ROJAS, J. The importance of antimicrobial compounds produced by beneficial bacteria on the biocontrol of phytopathogens. **Acta Biologica Colombiana**, v. 25, n.1. p. 140-154, 2020.

CHANDRA, H.; KUMARI, P.; BISHT, R.; PRASAD, R.; YADAV, S. Plant growth promoting *Pseudomonas aeruginosa* from *Valeriana wallichii* displays antagonistic potential against three phytopathogenic fungi. **Mol Biol Rep.**, 47(8), p.6015-6026, 2020.

CHAVARRI, M.; BARROYETA, J.; OCHOA, Y.; RUMBOS, N.; ALEZONES, J. Detección de *Fusarium verticillioides* y fumonisinas en granos de maíz blanco provenientes de los estados Yaracuy y Guárico, Venezuela. **Nova Scientia**, v.9, n. 19, p. 171-184, 2017.

CHEN, Q.; LIU S. Identification and Characterization of the Phosphate-Solubilizing Bacterium *Pantoea* sp. S32 in Reclamation Soil in Shanxi, China. **Frontiers in Microbiology**, 10:2171, 2019.

CHEN, Y.; YAN, F.; CHAI, Y.; LIU, H.; KOLTER, R.; LOSICK, R.; GUO, J-H. Biocontrol of tomato wilt disease by *Bacillus subtilis* isolates from natural environments depends on conserved genes mediating biofilm formation. **Environ Microbiol.** v.15(3), p. 848-864, 2013.

CHENG, X.; JI, X.; GE, Y.; LI, J.; QI, W.; QIAO K. Characterization of Antagonistic *Bacillus methylotrophicus* Isolated From Rhizosphere and Its Biocontrol Effects on Maize Stalk Rot. **Phytopathology**; 109(4):571-581, 2019.

CHENNAKESAVULU, M.; REDDIKUMAR, M.; ESWARA REDDY, N. P. Evaluation of different fungicides and their compatibility with *Pseudomonas fluorescens* in the control of redgram wilt incited by *Fusarium udum*. **Journal of Biological Control**, v. 27, n.4, p. 354-361, 2013.

CHOI, S. K.; PARK, S. Y.; KIM, R.; KIM, S. B.; LEE, C. H.; KIM, J. F.; PARK, S. H. Identification of a polymyxin synthetase gene cluster of *Paenibacillus polymyxa* and heterologous expression of the gene in *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, v.191(10), p. 3350-3358, 2009.

CHONG, J.; SOUFAN, O.; LI, C.; CARAUS, I.; LI, S.; BOURQUE, G.; WISHART, D. S.; XIA, J. MetaboAnalyst 4.0: towards more transparent and integrative metabolomics analysis. **Nucleic Acids Res.**, Jul 2;46(W1):W486-W494, 2018.

CHOPRA, A.; BOBATE, S.; RAHI, P.; BANPURKAR, A.; MAZUMDER, P. B. SATPUTE, S. *Pseudomonas aeruginosa* RTE4: A Tea Rhizobacterium With Potential for Plant Growth Promotion and Biosurfactant Production. **Front. Bioeng. Biotechnol.** 8:861, 2020.

CHRISTOVA, N.; TULEVA, B.; COHENB, R.; IVANOVA, G.; STOEVD, G.; STOILOVA-DISHEVA, M., STOINEVA, I. Chemical characterization and physical and biological activities of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* BN10. **Z Naturforsch C J Biosci.**, 66(7-8), p.394-402, 2011.

CHUNG, S.; KONG, H.; BUYER, J. S.; LAKSHMAN, D. K.; LYDON, J.; KIM, S. D.; ROBERTS, D. P. Isolation and partial characterization of *Bacillus subtilis* ME488 for suppression of soil borne pathogens of cucumber and pepper. **Appl Microbiol Biotechnol.**, v. 80(1), p. 115-123, 2008.

CLSI - CLINICAL and Laboratory Standards Institute. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica de Fungos

Filamentosos; Norma Aprovada. Documento M38-A, v. 22, n.16. ISBN 1-56238-470-8. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos, 2002.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos, Brasília, DF, v.10, safra 2022/23, n.3. terceiro levantamento, dezembro 2022. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos>. Acesso em dez/2022.

CORDERO, R. J.; CASADEVALL, A. Functions of fungal melanin beyond virulence. **Fungal Biol Rev.**, 31(2), p. 99-112, 2017.

CORREA, O. S.; MONTECCHIA, M. S.; BERTI, M. F.; FERNÁNDEZ FERRARI, M. C.; PUCHEU, N. L.; KERBER, N. L.; GARCIA, A. F. *Bacillus amyloliquefaciens* BNM122, a potential microbial biocontrol agent applied on soybean seeds, causes a minor impact on rhizosphere and soil microbial communities. **Applied Soil Ecology**, v. 41, p. 185-194, 2009.

COSTA, O. Y. A.; RAAIJMAKERS, J. M.; KURAMAE, E. E. Microbial Extracellular Polymeric Substances: Ecological Function and Impact on Soil Aggregation. **Front. Microbiol.**, 9:1636, 2018.

COSTA, R. V.; COTA, L. V.; CRUZ, J. C.; SILVA, D. D.; QUEIROZ, V. A. V.; GUIMARÃES, L. J. M.; MENDES, S. M. Recomendações para a redução da incidência de grãos ardidos em milho. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, n. 38, 22 p. Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, ISSN 1517-198, 2011.

COX, C. D.; RINEHART JR, K. L.; MOORE ML, COOK JR, J. C. Pyochelin: novel structure of an iron-chelating growth promoter for *Pseudomonas aeruginosa*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 78(7):4256-60, 1981.

DARLING, A. C.; MAU, B.; BLATTNER, F. R.; PERNA, N. T. Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. **Genome Res.**, 14(7):1394-403, 2004.

DAUD, N. S.; DIN, A. R. J. M.; ROSLI, M. A.; AZAM, Z. M.; OTHMAN, N. Z.; SARMIDI, M. R. *Paenibacillus polymyxa* bioactive compounds for agricultural and biotechnological applications. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 18, 101092, 2019.

DAVIS, R. M.; COLYER, P. D.; ROTHROCK, C. S.; KOCHMAN, J. K. *Fusarium* wilt of cotton: population diversity and implications for management. **Plant Disease**, v. 90, n.6, p. 692-703, 2006.

DE AMARAL LEITE, A.; DE SOUZA CARDOSO, A. A.; DE ALMEIDA LEITE, R.; DE OLIVEIRA-LONGATTI, S. M.; LUTOSA FILHO, J. F.; DE SOUZA MOREIRA, F. M.; MELO, L. C. A. Selected bacterial strains enhance phosphorus availability from biochar-based rock phosphate fertilizer. **Annals of Microbiology**, v. 70, n. 6, 2020.

DEEPA, N.; SREENIVASA, M. Y. *Fusarium verticillioides*, a globally important pathogen of agriculture and livestock: A Review. **Journal of Veterinary Medicine and Research**, v. 4(4): 1084, 2017.



DEEPIKA, K. V.; SRIDHAR, P. R.; BRAMHACHARI, P.V. Characterization and antifungal properties of rhamnolipids produced by mangrove sediment bacterium *Pseudomonas aeruginosa* strain KVD-HM52. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4(4), p. 608-615, 2015.

DELCAMBE L. L'Iturine. II. Composition en Acides Aminés, Spectre Ultraviolet et Structure Cyclique. **Bulletin des Sociétés Chimiques Belges.**, v.74, p. 329-340, 1965.

DERTZ, E. A.; XU, J.; STINTZI, A.; RAYMOND, K. N. Bacillibactin-mediated iron transport in *Bacillus subtilis*. **J Am Chem Soc.** 11;128(1):22-3, 2006.

DEY, R.; PAL, K. K.; BHATT, D. M.; CHAUHAN, S. M. Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria. **Microbiological Research**, v.159, p. 371-394, 2004.

DINIZ, G. F. D.; COTA, L. V.; FIGUEIREDO, J. E. F.; AGUIAR, F. M.; DA SILVA, D. D.; DE PAULA LANA, U. G.; DOS SANTOS, V. L.; MARRIEL, I. E.; DE OLIVEIRA-PAIVA, C. A. Antifungal activity of bacterial strains from maize silks against *Fusarium verticillioides*. **Arch Microbiol.**, 204(1):89, 2021.

DINIZ, G. F. D.; FIGUEIREDO, J. E. F.; DE PAULA LANA, U. G.; MARINS, M. S.; DA SILVA, D. D.; COTA, L. V.; Marriel, I. E.; DE OLIVEIRA-PAIVA, C. A. Microorganisms from corn stigma with biocontrol potential of *Fusarium verticillioides*. **Brazilian Journal of Biology**, v. 82, e262567, 2022.

DOMENECH, J.; REDDY, M. S.; KLOEPPER, J. W.; RAMOS, B.; GUTIERREZ-MAÑERO, J. Combined application of the biological product LS213 with *Bacillus*, *Pseudomonas* or *Chryseobacterium* for growth promotion and biological control of soil-borne diseases in pepper and tomato. **BioControl**, v. 51, p. 245-258, 2006.

DUBEY, S. C.; SINGH V.; PRIYANKA, K.; UPADHYAY, B. K.; SINGH, B. Combined application of fungal and bacterial bio-agents, together with fungicide and *Mesorhizobium* for integrated management of *Fusarium* wilt of chickpea. **BioControl**, 60, p. 413-424, 2015.

DUNLAP, C.; KIM, S. J.; KWON, S. W.; ROONEY, A. *Bacillus velezensis* is not a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* and '*Bacillus oryzicola*' are later heterotypic synonyms of *Bacillus velezensis* based on phylogenomics. **Int J Syst Evol Microbiol.**, 66 (3), p. 1212-1217, 2016.

DUNLAP, C. A.; SCHISLER, D. A.; BOWMAN, M. J., ROONEY, A. P. Genomic analysis of *Bacillus subtilis* OH 131.1 and co-culturing with *Cryptococcus flavescens* for control of *Fusarium* head blight. **Plant Gene**, v. 2, p. 1-9, 2015.

ECHENIQUE, J. V. Z.; ESTIMA-SILVA, P.; PEREIRA, D. B.; MARQUES, L. S.; RIBEIRO, L. S.; SCHILD, A. L. Leukoencephalomalacia in horses associated with immature corn consumption. **Cienc. Rural**, v. 49, n.3, e20180925, 2019.

EINLOFT, T. C.; HARTKE, S.; DE OLIVEIRA, P. B.; SARAIVA, P. S.; DIONELLO, R. G. Selection of rhizobacteria for biocontrol of *Fusarium verticillioides* on non-rhizospheric soil and maize seedlings roots. **Eur J Plant Pathol** 160, p. 503-518, 2021.

FAN, B.; BLOM, J.; KLENK, H. P.; BORRIS, R. *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis*, and *Bacillus siamensis* Form an "Operational Group *B. amyloliquefaciens*" within the *B. subtilis* Species Complex. **Front. Microbiol.**, v. 8:22, 2017.

FAN, B.; WANG, C.; SONG, X.; DING, X.; WU, L.; WU, H.; GAO, X.; BORRIS, R. *Bacillus velezensis* FZB42 in 2018: The Gram-Positive Model Strain for Plant Growth Promotion and Biocontrol. **Front. Microbiol.**, v. 9:2491, 2018.

FAO: FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION FOR THE UNITED NATIONS. Integrated Pest Management. Disponível em: <http://www.fao.org/agriculture/crops/thematic-sitemap/theme/pests/ipm/en/>. Acesso em nov/2022.

FARIA, P. S. A; MARQUES, V. O.; SELARI, P. J. R. G.; MARTINS, P. F.; SILVA, F. G.; SALES, J. F. Multifunctional potential of endophytic bacteria from *Anacardium othonianum* Rizzini in promoting *in vitro* and *ex vitro* plant growth. **MicrobiolRes.**, 242:126600, 2021.

FÁTIMA, SABIN; TEHMINA, ANJUM. Identification of a Potential ISR Determinant from *Pseudomonas aeruginosa* PM12 against *Fusarium* Wilt in Tomato. **Front Plant Sci.**, 8:848, 2017.

FERREIRA, D. F. SISVAR - Sistema de análise de variância. Versão 5.3. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2010.

FIGUEIRA, E. L. Z.; COELHO, A. R.; ONO, E. Y. S.; HIROOKA, E. Y. Milho: riscos associados à contaminação por *Fusarium verticillioides* e fumonisina. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.24, n.2, p. 359-378, 2003.

FIGUEROA-LÓPEZ, A. M.; CORDERO-RAMÍREZ, J. D.; MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, J. C.; LÓPEZ-MEYER, M.; LIZÁRRAGA-SÁNCHEZ, G. J.; FÉLIX-GASTÉLUM, R.; CASTROMARTÍNEZ, C.; MENDOZA- MALDONADO, I. E. Rhizospheric bacteria of maize with potential for biocontrol of *Fusarium verticillioides*. **Springer Plus**, 5: 330, 2016.

FILLINGER, S.; ELAD, Y. Botrytis - the fungus, the pathogen and its management in agricultural systems. Springer International Publishing Switzerland, Basel, 2016.

FIRA, D.; DIMKIĆ, I.; BERIĆ, T.; LOZO, J.; STANKOVIĆ, S. Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. **J Biotechnol.**, v. 285, p. 44-55, 2018.

FREIRE, F. C. O.; VIEIRA, I. G. P.; GUEDES, M. I. F.; MENDES, F. N. P. Micotoxinas: importância na alimentação e na saúde humana e animal. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 48 p. (Documentos, 110), 2007.

GHADAMGAHI, F.; TARIGHI, S.; TAHERI, P.; SARIPELLA, G. V.; ANZALONE, A.; KALYANDURG, P. B.; CATARA, V.; ORTIZ, R.; VETUKURI, R. R. Plant Growth-Promoting Activity of *Pseudomonas aeruginosa* FG106 and Its Ability to Act as a Biocontrol Agent against Potato, Tomato and Taro Pathogens. **Biology**, 11(1):140, 2022.

GOMES, E. B.; DIAS, L. R.; MIRANDA, R. C. M. Actinomycetes bioactive compounds: Biological control of fungi and phytopathogenic insect. **African Journal of Biotechnology**, v.17 (17), p. 552-559, 2018.

GONG, A. D.; LI, H. P.; YUAN, Q. S.; SONG, X. S.; YAO, W.; HE, W. J.; ZHANG, J. B.; LIAO, Y. C. Antagonistic Mechanism of Iturin A and Plipastatin A from *Bacillus amyloliquefaciens* S76-3 from Wheat Spikes against *Fusarium graminearum*. **Plos ONE**, 10(2): e0116871, 2015.

GORDON, S. A.; WEBER, R. P. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. **Plant Physiology**, v. 26(1), p. 192-195, 1951.

GOVAERTS, C.; ORWA, J.; VAN, SCHEPDAEL, A.; ROETS, E.; HOOGMARTENS, J. Characterization of polypeptide antibiotics of the polymyxin series by liquid chromatography electrospray ionization ion trap tandem mass spectrometry. **J Pept Sci.**, 8(2), p. 45-55, 2002.

GRAÇAS, J. P.; RIBEIRO, C.; COELHO, F. A. A.; CARVALHO, M. E. A.; CASTRO, P. R. C. Microrganismos estimulantes na agricultura. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 56p, 2015.

GUIMARÃES, D. P.; COSTA, F. A.A.; RODRIGUES, M. I.; MAUGERI, F. Optimization of dextran synthesis and acidic hydrolysis by surface response analysis. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 16, (2), p.129-139, 1999.

GUIMARÃES, E. A. Espécies de *Fusarium* associadas ao sorgo no Brasil: diversidade, patogenicidade e potencial toxigênico. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal De Lavras, Lavras, 2016.

HAGGAG, W. M. The role of biofilm exopolysaccharides on biocontrol of plant disease. In: Elnashar M (ed) **Biopolymers**, v. 14, p. 271-284, 2010.

HERRERA-QUITERIO, A.; TOLEDO-HERNÁNDEZ, E.; AGUIRRE-NOYOLA, J. L.; ROMERO, Y.; RAMOS, J.; PALEMÓN-ALBERTO, F.; TORIBIO-JIMÉNEZ, J. Antagonic and plant growth-promoting effects of bacteria isolated from mine tailings at El Fraile, Mexico. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 52, p. 231-239, 2020.

HSU, L. H.; WANG, H. F.; SUN, P. L.; HU, F. R.; CHEN, Y.L. The antibiotic polymyxin B exhibits novel antifungal activity against *Fusarium* species. **Int J Antimicrob Agents.**, v. 49(6), p.740-748, 2017.

HWANGBO, K.; UM, Y.; KIM, K. Y.; MADHAIYAN, M.; SA, T. M.; LEE, Y. Complete genome sequence of *Bacillus velezensis* CBMB205, a phosphate-solubilizing bacterium isolated from the rhizoplane of rice in the Republic of Korea. **Genome Announc.**, 4(4):e00654-16, 2016.

ISLAM, F.; YASMEEN, T.; ALI, Q.; ALI, S.; ARIF, M.S.; HUSSAIN, S.; RIZVI, H. Influence of *Pseudomonas aeruginosa* as PGPR on oxidative stress tolerance in wheat under Zn stress. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 104, p. 285-293, 2014.

JADHAV, H. P.; SHAIKH, S. S.; SAYYED, R. Z. Role of hydrolytic enzymes of rhizoflora in biocontrol of fungal phytopathogens: an overview. In: Mehnaz S (ed) Rhizotrophs: Plant growth promotion to bioremediation. Springer, Singapore, pp 183–203, 2017.

JENNINGS, L. D.; RAYNER, D. R.; JORDAN, D. B.; OKONYA, J. F.; BASARAB, G. S.; AMOROSE, D. K.; ANACLERIO, B. M.; LEE, J. K.; SCHWARTZ, R S.; WHITMORE, K. A. Cyclobutane Carboxamide Inhibitors of Fungal Melanin: Biosynthesis and their Evaluation as Fungicides. **Bioorg Med Chem.**, v. 8(5), p. 897- 907, 2000.

JETIYANON, K.; KLOEPPER, J. W. Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria for induction of systemic resistance against multiple plant diseases. *Biol. Control* 24:285-291, 2002.

JUNAID, P. M.; KHAN, F. Biofilm: A future generation biofertilizer. **Indian J. Applied & Pure Bio.**, v. 33(2), p. 131-134, 2018.

KALANTARI, S.; MAREFATL, A.; NASERI, B.; HEMMATI, R. Improvement of bean yield and *Fusarium* root rot biocontrol using mixtures of *Bacillus*, *Pseudomonas* and *Rhizobium*. **Tropical plant pathol.** v. 43, p. 499-505, 2018.

KALAYU, G. Phosphate Solubilizing Microorganisms: Promising Approach as Biofertilizers. **International Journal of Agronomy**, ID 4917256, p. 7, 2019.

KAMLE, M.; MAHATO, D. K.; DEVI, S.; LEE, K. E.; KANG, S. G.; KUMAR, P. Fumonisin: Impact on Agriculture, Food, and Human Health and their Management Strategies. **Toxins**, 11 (6): 328, 2019.

KAVAMURA, V. N.; SANTOS, S. N.; SILVA, J. L.; PARMA, M. M.; AVILA, L. A.; VISCONTI, A.; ZUCCHI, T. D.; TAKETANI, R. G.; ANDREOTE, F. D.; MELO, I. S. Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. **Microbiological Research**, v. 168, p. 183-191, 2013.

KENGANAL, M.; PATIL, M. B.; NIMBARAGI, Y. Management of Stalk Rot of Maize Caused by *Fusarium moniliforme* (Sheldon). **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 6(9), p. 3546-3552, 2017.

KHAN, N.; MAYMON, M.; HIRSCH, A. M. Combating *Fusarium* Infection Using *Bacillus*-Based Antimicrobials. **Microorganisms**, 5(4):75, 2017.

KHAN, R. A. A.; NAJEEB, S.; MAO, Z.; LING, J.; YANG, Y.; LI, Y.; XIE, B. Bioactive Secondary Metabolites from *Trichoderma* spp. against Phytopathogenic Bacteria and Root-Knot Nematode. **Microorganisms**, 8(3): 401, 2020.

KHOKHAR, M. K.; GUPTA, R. Integrated Disease Management. **Popular Kheti**, v. 2(1), p. 87-91, 2014.

KIM, K.; LEE, Y.; HA, A.; KIM, JI-IN; PARK, A. R.; YU, N. H.; SON, H.; CHOI, G. J.; PARK, H. W.; LEE, C. W.; LEE, T.; LEE, Y. W.; KIM, J. C. Chemosensitization of *Fusarium graminearum* to chemical fungicides using cyclic lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* Strain JCK-12. **Front. Plant Sci.**, v. 8:2010, 2017a.

KIM, P. I.; RYU, J.; KIM, Y. H.; CHI, Y-T. Production of biosurfactant lipopeptides Iturin A, Fengycin, and Surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for control of *Colletotrichum gloeosporioides*. **J Microbiol Biotechnol.**, v. 20, n. 1, p. 138-145, 2010.

KIM, S. Y., SONG, H., SANG, M. K., WEON, H. Y., SONG, J. The complete genome sequence of *Bacillus velezensis* strain GH1-13 reveals agriculturally beneficial properties and a unique plasmid. **J Biotechnol.**, v. 259, p. 221-227, 2017b.

KÖBERL, M.; RAMADAN, M. E.; ADAM, M.; CARDINALE, M.; HALLMANN, J.; HEUER, H.; SMALLA, K.; BERG, G. *Bacillus* and *Streptomyces* were selected as broad-spectrum antagonists against soilborne pathogens from arid areas in Egypt. **FEMS Microbiology Letters**, v. 342 (2), p. 168-178, 2013.

KOEK, M. M.; JELLEMA, R. H.; GREEF, J. V.; TAS, A. C.; HANKEMEIER, T. Quantitative metabolomics based on gas chromatography mass spectrometry: status and perspectives. **Metabolomics**, v. 7(3), p. 307-328, 2011.

KUMAR, R. S.; AYYADURAI, N.; PANDIARAJA, P.; REDDY, A. V.; Y VENKATESWARLU, Y.; PRAKASH, O.; N SAKTHIVEL, N. Characterization of antifungal metabolite produced by a new strain *Pseudomonas aeruginosa* PUPa3 that exhibits broad-spectrum antifungal activity and biofertilizing traits. **J Appl Microbiol.**; v. 98(1), p. 145-154, 2005.

LANDY, M.; WARREN, G.H.; ROSENMANM, S. B.; COLIO, L. G. Bacillomycin: An antibiotic from *Bacillus subtilis* active against pathogenic fungi. **Proc Soc Exp Biol Med.**, v. 67(4), p. 539-541, 1948.

LANZA, F. E.; FIGUEIREDO, J. E. F.; COSTA, R. V.; MOURA, L. O.; MARCONDES, M. M.; SILVA, D. D.; COTA, L. V.; CORRÊA, C. L.; NICOLI, A. N.; RAMOS, T. C. D. A. Efeito do tratamento de sementes com o biofungicida bacteriano CNPMS22 na sobrevivência e desenvolvimento de plantas de milho em solo infestado com *Fusarium verticillioides*. Anais. Campinas: Instituto Agrônômico, Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, p. 555-562, 2012.

LANZA, F. E.; ZAMBOLIM, L.; COSTA, R. V.; QUEIROZ, V. A. V.; COTA, L. V.; SILVA, D. D.; SOUZA, A. G. C.; FIGUEIREDO, J. E. F. Prevalence of fumonisin-producing *Fusarium* species in Brazilian corn grains. **Crop Protection**, v. 65, p. 232-237, 2014.

LANZA, F. E.; ZAMBOLIM, L.; COSTA, R. V.; SILVA, D. D.; QUEIROZ, V. A. V.; PARREIRA, D. F.; MENDES, S. M.; SOUZA, A. G. C.; COTA, L.V. Aplicação foliar de fungicidas e incidência de grãos ardidos e fumonisinas totais em milho. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 51(05), p. 638-646, 2016.

LECLÈRE, V.; BÉCHET, M.; ADAM, A.; GUEZ, J. S.; WATHELET, B.; ONGENA, M.; THONART, P.; GANCEL, F.; CHOLLET-IMBERT, M.; JACQUES, P. Mycosubtilin overproduction by *Bacillus subtilis* BBG100 enhances the organism's antagonistic and biocontrol activities. **Appl Environ Microbiol.**, v. 71(8), p. 4577-4584, 2005.

LI, H.; LI, H.; BAI, Y; WANG, J.; NIE, M.; LI, B.; XIAO, M. The use of *Pseudomonas fluorescens* P13 to control sclerotinia stem rot (*Sclerotinia sclerotiorum*) of oilseed rape. **J Microbiol.**, v. 49(6), p. 884-889, 2011.

- LI, J.; SUN, W.; SAALIM, M.; WEI, G.; ZAleta-PINET, D.A.; CLARK, B.R. Isolation of 2-Alkyl-4-quinolones with Unusual Side Chains from a Chinese *Pseudomonas aeruginosa* Isolate. **Journal of Natural Products**, v. 83(7), p. 2294-2298, 2020a.
- LI, J.Y.; GAO, T.T.; WANG, Q. Comparative and Functional Analyses of Two Sequenced *Paenibacillus polymyxa* Genomes Provides Insights Into Their Potential Genes Related to Plant Growth-Promoting Features and Biocontrol Mechanisms. **Front. Genet.**, 11:564939, 2020b.
- LI, S.; ZHANG, N.; ZHANG, Z.; LUO, J.; SHEN, B.; ZHANG, R.; SHEN, Q. Antagonist *Bacillus subtilis* HJ5 controls *Verticillium* wilt of cotton by root colonization and biofilm formation. **Biol Fertil Soils**, v. 49, p. 295-303, 2013.
- LI, Y.; CHEN, S. Fusaricidin Produced by *Paenibacillus polymyxa* WLY78 Induces Systemic Resistance against *Fusarium* Wilt of Cucumber. **Int. J. Mol. Sci.**, 20(20):5240, 2019.
- LIM, S. M.; YOON, M. Y.; CHOI, G. J.; CHOI, Y. H.; JANG, K. S.; SHIN, T. S.; PARK, H. W.; YU, N. H.; KIM, Y. H.; KIM, J. C. Diffusible and Volatile Antifungal Compounds Produced by an Antagonistic *Bacillus velezensis* G341 against Various Phytopathogenic Fungi. **Plant Pathol J.**, v. 33(5), p. 488-498, 2017.
- LIN, F.; XUE, Y.; HUANG, Z.; JIANG, M.; LU, F.; BIE, X.; MIAO, S.; LU, Z. Bacillomycin D inhibits growth of *Rhizopus stolonifer* and induces defense-related mechanism in cherry tomato. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 103(2), p. 7663-7674, 2019.
- LIU, H.; CARVALHAIS, L. C.; CRAWFORD, M.; SINGH, E.; DENNIS, P. G.; PIETERSE C. M. J.; SCHENK, P. M. Inner Plant Values: Diversity, Colonization and Benefits from Endophytic Bacteria. **Front Microbiol.**, 8:2552, 2017.
- LIU, K.; MCINROY, J. A.; HU, C. H.; KLOEPPER, J. W. Mixtures of Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria Enhance Biological Control of Multiple Plant Diseases and Plant-Growth Promotion in the Presence of Pathogens. **Plant Dis**, v. 102(1), p. 67-72, 2018.
- LIU, W.; MU, W.; ZHU, B.; DU, Y.; LIU, F. Antagonistic Activities of Volatiles from Four Strains of *Bacillus* spp. and *Paenibacillus* spp. Against Soil-Borne Plant Pathogens. **Agricultural Sciences in China**, v. 7(9), p. 1104-1114, 2008.
- LIU, X.; LI, Q.; LI, Y.; GUAN, G.; CHEN, S. *Paenibacillus* strains with nitrogen fixation and multiple beneficial properties for promoting plant growth. **PeerJ**, 7:e7445, 2019a.
- LIU, Y.; TENG, K.; WANG, T.; DONG, E.; ZHANG, M.; TAO, Y.; ZHONG, J. Antimicrobial *Bacillus velezensis* HC6: production of three kinds of lipopeptides and biocontrol potential in maize. **J Appl Microbiol.**, v.128(1), p. 242-254, 2019b.
- LIZÁRRAGA-SÁNCHEZ, G. J.; LEYVA-MADRIGAL, K. Y.; SÁNCHEZ-PEÑA, P.; QUIROZ-FIGUEROA, F. R.; MALDONADO-MENDOZA, I. E. *Bacillus cereus* sensu lato strain B25 controls maize stalk and ear rot in Sinaloa, Mexico. **Field Crops Research**, v. 176, p. 11-21, 2015.

LUO, Y.; CHENG, Y.; YI, J.; ZHANG, Z.; LUO, Q.; ZHANG, D.; LI, Y. Complete Genome Sequence of Industrial Biocontrol Strain *Paenibacillus polymyxa* HY96-2 and Further Analysis of Its Biocontrol Mechanism. **Front Microbiol.**, 9:1520, 2018.

LUZ, W. C. Combinação dos tratamentos biológico e químico de semente de milho. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28(1), p. 93-95, 2003.

MA, Z.; HU, J. Production and Characterization of Surfactin-Type Lipopeptides as Bioemulsifiers Produced by a *Pinctada martensii*-Derived *Bacillus mojavensis* B0621A. **Appl Biochem Biotechnol.**, 177(7), p.1520-1529, 2015.

MABOOD, F.; ZHOU, X.; SMITH, D. L. Microbial signaling and plant growth promotion. **Canadian Journal Plant Science**, v. 94, n. 6, p. 1051-1063, 2014.

MAHIDI, S. S.; HASSAN, G. I.; HUSSAIN, A.; FAISUL-UR-RASOOL. Phosphorus availability issue- Its fixation and role of phosphate solubilizing bacteria in phosphate solubilization. **Research Journal of Agricultural Sciences**, 2(1), p. 174-179, 2011.

MAHMOUD, S.; ZIEDAN, EL, S. H.; FARRAG, E. S.; KHALAPHALLAH, R.; ELYMANI, A. Antifungal activity of pyocyanin produced by *Pseudomonas aeruginosa* against *Fusarium oxysporum* schlech a root-rot phytopathogenic fungi. **International Journal of PharmTech Research**, v. 9, n.8, p. 43-50, 2016.

MARASAS, W. F.; KELLERMAN, T. S.; GELDERBLOM, W. C.; COETZER, J. A.; THIEL, P. G.; VAN DER LUGT, J. J. Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B1 isolated from *Fusarium moniliforme*. **Onderstepoort J Vet Res.** 55(4), p.197-203, 1988.

MARQUES, A. P. G. C.; PIRES, C.; MOREIRA, H.; RANGEL, A. O. S. S.; CASTRO, P. M. L. Assessment of the plant growth promotion abilities of six bacterial isolates using *Zea mays* as indicator plant. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42(8), p. 1229-1235, 2010.

MARTÍNEZ-RAUDALES, I.; DE LA CRUZ-RODRÍGUEZ, Y.; VEGA-ARREGUÍN, J.; ALVARADO-GUTIÉRREZ, A.; FRAIRE-MAYORGA, A.; ALVARADO-RODRÍGUEZ, M.; BALDERAS-HERNÁNDEZ, V.; GÓMEZ-SOTO, J.M.; FRAIRE-VELÁZQUEZ, S. Draft Genome Sequence of *Bacillus velezensis* 3A-25B, a Strain with Biocontrol Activity against Fungal and Oomycete Root Plant Phytopathogens, Isolated from Grassland Soil. **Genome Announc.**; 5(39):e01021-17, 2017.

MASSART, S.; PERAZZOLLI, M.; HOFTE, M.; PERTOT, I.; JIJAKLI, M. H. Impact of the omic technologies for understanding the modes of action of biological control agents against plant pathogens. **BioControl**, v. 60, p.725-746, 2015.

MEIER-KOLTHOFF, J. P.; GÖKER, M. TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy. **Nature Communications**, 10:2182, 2019.

MENG, Q.; JIANG, H.; HAO, J. J. Effects of *Bacillus velezensis* strain BAC03 in promoting plant growth. **Biological Control**, v. 98, p. 18-26, 2016.

MIDIO, A. F.; MARTINS, D. I. Toxicologia de Alimentos. São Paulo: Livraria Varela, 295 p., 2000.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO- MAPA. Balança Comercial do Agronegócio, Outubro/2022. Disponível em: [https://www.gov.br/notaaimprensa10\\_20221](https://www.gov.br/notaaimprensa10_20221). Acesso em dez/2022.

MOHIDIN, F.; KHAN, M. Tolerance of fungal and bacterial biocontrol agents to six pesticides commonly used in the control of soil borne plant pathogens. **African Journal of Agricultural Research**, v. 8(43), p. 5272-5275, 2013.

MOLINA, M. A.; RAMOS, J.; ESPINOSA-URGEL, M. Plant-Associated Biofilms. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, 2, p. 99-108. 2003.

MORCILLO, R. J. L.; MANZANERA, M. The Effects of Plant-Associated Bacterial Exopolysaccharides on Plant Abiotic Stress Tolerance. **Metabolites**. 24,11(6):337, 2021.

MOSTROM, M. S. Fumonisin Toxicosis in Animals - Toxicology - MSD Veterinary Manual. Disponível em: [www.msdsvetmanual.com/toxicology/mycotoxins/fumonisin-toxicosis-in-animals](http://www.msdsvetmanual.com/toxicology/mycotoxins/fumonisin-toxicosis-in-animals). Acesso em dez/2022.

MÜLNER, P.; SCHWARZ, E.; DIETEL, K.; HERFORT, S.; JÄHNE, J.; LASCH, P.; CERNAVA, T.; BERG, G.; VATER, J. Fusaricidins, Polymyxins and Volatiles Produced by *PaeniBacillus polymyxa* Strains DSM 32871 and M1. **Pathogens**, 10(11):1485, 2021.

MULUNDA, M.; DZOMA, B.; NYIRENDA, M.; BAKUNZI, F. Mycotoxins occurrence in selected staple food in main markets from Lubumbashi, Democratic Republic of Congo. **Journal of Food, Agriculture and Environment**, v. 11(3), p.51-54, 2013.

MUNKVOLD, G. P.; DESJARDINS, A. E. Fumonisin in maize can we reduce their occurrence? **Plant Disease**, v. 81, n.6, p. 556-565, 1997.

NAIK, K.; MISHRA, S.; SRICHANDAN, H.; SINGH, P. K.; SARANGI, P. K. Plant growth promoting microbes: Potential link to sustainable agriculture and environment. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 21, 101326, 2019.

NANDINI, M. L. N.; NAIK, SM. R.; RUTH, CH; GOPAL, K. Compatibility of biocontrol agents with fungicides used in turmeric cultivation under *in vitro* conditions. **J Pharmacogn Phytochem**, v. 7(6), p. 1271-1276, 2018.

NAPHADE, B. S.; SHAIKH, S. H. Isolation, characterization and evaluation of *Pseudomonas putida* as a plant growth promoting rhizobacteria. **International Science Journal**, 1(2), p. 30-33, 2014.

NAUTIYAL, C. S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiol Lett.**, 170(1), p. 265-270, 1999.

NDLOVU, T.; RAUTENBACH, M.; VOSLOO, J.A.; KHAN, S.; KHAN, W. Characterisation and antimicrobial activity of biosurfactant extracts produced by *Bacillus*



*amyloliquefaciens* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a wastewater treatment plant. **AMB Express.**, 7(1): 108, 2017.

NGUYEN, P. A.; STRUB, C.; DURAND, N.; ALTER, P.; FONTANA, A. SCHORR-GALINDO, S. Biocontrol of *Fusarium verticillioides* using organic amendments and their actinomycete isolates. **Biological control**, v. 118, p. 55-66, 2017.

NICOLI, A. N.; COSTA, R. V.; COTA, L. V.; SILVA, D. D.; ZAMBOLIM, L.; LANZA, F. E.; GUIMARÃES, D. P.; LANDAU, E. C. Diagrammatic scale validation to quantify the severity of anthracnose stalk in corn. **Ciência Rural**, v.45, n. 10, p.1720-1726, 2015.

NOORDIN, R.; OTHMAN, N. Proteomics Technology - a Powerful tool for the biomedical scientists. **Malays J Med Sci.**, v. 20(2):1-2, 2013.

NOORI, F.; ETESAMI, H.; NOORI, S.; FOROUZAN, E.; JOUZANI, G. S.; MOHAMMAD M.A. Whole genome sequence of *Pantoea agglomerans* ANP8, a salinity and drought stress-resistant bacterium isolated from alfalfa (*Medicago sativa* L.) root nodules, **Biotechnology Reports**, v. 29, e00600, 2021.

NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. The contribution of melanin to microbial pathogenesis. **Cell Microbiol.**, 5(4), p. 203-223, 2003.

O'BRIEN, P. A. Biological control of plant diseases. **Australasian Plant Pathology**, v. 46, p. 293-304, 2017.

OGAZ, A. L. U.; CASTELLANOS, L. N. M.; MOORILLON, G. V. N. Biocontrol of phytopathogens: Antibiotic production as mechanism of control. In: The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs, Méndez-Vilas, A., Ed.; Formatex Research Center: Badajoz, Spain, p. 305-309, 2015.

LOWE, O. M.; OLAWUYI, O. J.; SOBOWALE, A. A.; ODEBODE, A. C. Role of arbuscular mycorrhizal fungi as biocontrol agents against *Fusarium verticillioides* causing ear rot of *Zea mays* L. (Maize). **Current Plant Biology**, v. 15, p. 30-37, 2018.

ONGENA, M.; JACQUES, P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. **Trends Microbiol.**, v. 16(3), p. 115-125, 2008.

ONGENA, M.; JOURDAN, E.; ADAM, A.; PAQUOT, M.; BRANS, A.; JORIS, B.; ARPIGNY, J.L.; THONART, P. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. **Environ Microbiol.**, 9(4):1084-90, 2007.

ONS, L.; BYLEMANS, D.; THEVISSSEN, K.; CAMMUE, B. P. A. Combining Biocontrol Agents with Chemical Fungicides for Integrated Plant Fungal Disease Control. **Microorganisms**; 8(12):1930, 2020.

PACWA-PŁOCINICZAK, M.; PŁAZA, G. A.; PIOTROWSKA-SEGET, Z.; CAMEOTRA, S. S. Environmental applications of biosurfactants: Recent advances, **Int J Mol. Sci.**, 12(1), p. 633-654, 2011.

PADDA, K. P.; PURI, A.; CHANWAY, C. P. *Paenibacillus polymyxa*: A Prominent Biofertilizer and Biocontrol Agent for Sustainable Agriculture. In: MEENA, V., MISHRA, P., BISHT, J., PATTANAYAK, A. (eds) *Agriculturally Important Microbes for Sustainable Agriculture*. Springer, Singapore, 2017.

PALAZZINI, J. M.; DUNLAP, C. A.; BOWMAN, M. J.; CHULZE, S. N. *Bacillus velezensis* RC 218 as a biocontrol agent to reduce *Fusarium* head blight and deoxynivalenol accumulation: Genome sequencing and secondary metabolite cluster profiles. **Microbiol Res.**, v. 192, p.30-36, 2016.

PALMIERI, D.; IANIRI, G.; DEL GROSSO, C.; BARONE, G.; DE CURTIS, F.; CASTORIA, R.; LIMA, G. Advances and Perspectives in the Use of Biocontrol Agents against Fungal Plant Diseases. **Horticulturae**, 8(7), 577, 2022.

PANDIN, C.; LE COQ, D.; CANETTE, A.; AYMERICH, S.; BRIANDET, R. Should the biofilm mode of life be taken into consideration for microbial biocontrol agents? **Microb Biotechnol.**, 10(4), p. 719-734, 2017.

PARASCHIVU, M.; COTUNA, O.; PARASCHIVU, M. Integrated disease management of *Fusarium* head blight, a sustainable option for wheat growers worldwide. *Annals of the University of Craiova - Agriculture, Montanology, Cadastre Series*, 44, p. 183-187, 2014.

PATERSON, J.; JAHANSHAH, G.; LI, Y.; WANG, Q.; MEHNAZ, S.; GROSS, H. The contribution of genome mining strategies to the understanding of active principles of PGPR strains. **FEMS Microbiol Ecol.**, v. 93(3):fiw249, 2017.

PAULO, E. M.; VASCONCELOS, M. P.; OLIVEIRA, I. S.; AFFE, H. M. J.; NASCIMENTO, R., MELO, I. S., ROQUE, M. R. A.; DE ASSIS, S. A. An alternative method for screening lactic acid bacteria for the production of exopolysaccharides with rapid confirmation. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, 32(4), p. 710-714, 2012.

PEDRAZA, L. A.; LÓPEZ, C. E.; URIBE-VELEZ, D. Mecanismos de acción de *Bacillus* spp. (Bacillaceae) contra microorganismos fitopatógenos durante su interacción con plantas. **Acta biol. Colomb.**, 25(1), p. 112-125, 2020.

PEIGHAMI-ASHNAEI, S.; SHARIFI-TEHRANI, A.; AHMADZADEH, M.; BEHBOUDI, K. Interaction of different media on production and biocontrol efficacy of *Pseudomonas fluorescens* P-35 and *Bacillus subtilis* B-3 against grey mould of apple. **Journal of Plant Pathology**, 91(1), p. 65-70, 2009.

PEREIRA, P.; NESCI, A.; CASTILLO, C.; ETCHEVERRY, M. Impact of bacterial biological control agents on fumonisin B1 content and *Fusarium verticillioides* infection of field-grown maize. **Biological Control** 53, p. 258-266, 2010.

PÉREZ, M. A.; T.; CASTILLO, F. D. H.; VALDÉZ, R. A.; ALCALÁ, E. I. L. Antifungal activity of metabolites from *Bacillus* spp. against *Fusarium oxysporum* using micro dilution in plate method. **European Journal of Biotechnology and Genetic Engineering**, v. 5, n. 1, 2018.

PINTO, N. F. J. DE A. Grãos ardidos em milho. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 6p. (Circular Técnica, 66), 2005.

- PITT, J. Mycotoxins: Fumonisin. Encyclopedia of Food Safety, v. 2, p. 299-303, 2014.
- PLAZA, G.; CHOJNIAK, J.; RUDNICKA, K.; PARASZKIEWICZ, K.; BERNAT, P. Detection of biosurfactants in *Bacillus* species: genes and products identification. **J Applied Microbiol**, v. 119(4), p. 1023-1034, 2015.
- PUSZTAHELYI, T.; HOLB, I. J.; PÓSCI, I. Secondary metabolites in fungus-plant interactions. **Frontiers in Plant Science**. v. 6: 573, 2015.
- RAAIJMAKERS, J. M.; DE BRUIJN, I.; NYBROE, O.; ONGENA, M. Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics, **FEMS Microbiology Reviews**, v. 34, 6, p.1037-1062, 2010.
- RADZKI, W.; MANERO, F. G.; ALGAR, E.; GARCIA, J. L.; GARCIA, V. A.; SOLANO, B. R. Bacterial siderophores efficiently provide iron to iron-starved tomato plants in hydroponics culture. **Antonie Van Leeuwenhoek, Amsterdam**, v. 104(3), p. 321-330, 2013.
- RAHMAN, S. F. S. AB.; SINGH, E.; PIETERSE, C. M. J.; SCHENK, P. M. Emerging microbial biocontrol strategies for Plant Pathogens. **Plant Sci.**, v. 267, p. 102-111, 2018.
- RAMYABHARATHI, S. A.; RAGUCHANDER, T. Efficacy of Secondary Metabolites Produced by *Bacillus subtilis* EPCO16 against Tomato Wilt Pathogen *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. **J Mycol Plant Pathol**, v. 44, n.2, 2014.
- RAZA, W.; YUAN, J.; LING, N.; HUANG, Q.; SHEN, Q. Production of volatile organic compounds by an antagonistic strain *PaeniBacillus polymyxa* WR-2 in the presence of root exudates and organic fertilizer and their antifungal activity against *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. **Biological Control**. v. 80, p.89-95, 2015.
- REIS, E. M.; CASA, R. T.; BRESOLIN, A. C. R. Manual de diagnose e controle de doenças do milho, Passo Fundo/RS, Aldeia Norte, 141p., 2004.
- REVA, O. N.; DIXELIUS, C.; MEIJER, J.; PRIEST, F. G. Taxonomic characterization and plant colonizing abilities of some bacteria related to *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis*. **FEMS Microbiol**. v. 48(2), p. 249-259, 2004.
- REZENDE, C. C.; SILVA, M. A.; FRASCA, L. L. de M; FARIA, D. R.; FILIPPI, M. C. C. de; LANNA, A. C.; NASCENTE, A. S. Multifunctional microorganisms: use in agriculture. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 2, p. e50810212725, 2021.
- RICHARD, A. O. Plant Growth-Promoting Potentials of Some Indigenous Bacterial Isolates. **Journal Of Pharmacy And Biological Sciences**, v. 14, p. 5-10, 2019.
- RICHARDSON, A. E.; HADOBAS, P. A.; HAYES, J. E.; O'HARA, C. P.; SIMPSON, R. J. Utilization of phosphorus and pasture plants supplied with myo-inositol hexaphosphate is enhanced by the presence of soil microorganisms. **Plant and Soil**, v. 229, p. 47- 56, 2001.
- ROONEY, A. P.; PRICE, N. P.; EHRHARDT, C.; SWEZEY, J. L.; BANNAN, J. D. Phylogeny and molecular taxonomy of the *Bacillus subtilis* species complex and description of *Bacillus*

*subtilis* subsp. *inaquosorum* subsp. nov. **Int J Syst Evol Microbiol.**, v. 59 (Pt 10), p. 2429-2436, 2009.

ROYCHOWDHURY, R.; QAISER, T. F.; MUKHERJEE, P.; ROY, M. Isolation and Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* Strain PGP for Plant Growth Promotion. **Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences**, v. 89, p. 353-360, 2017.

SAALIM, M.; VILLEGAS-MORENO, J.; CLARK, B. R. Bacterial Alkyl-4-quinolones: Discovery, Structural Diversity and Biological Properties. **Molecules**, 25(23):5689, 2020.

SAGAHÓN, I. P.; REYES, M. A. A.; ROJAS, H. V. S.; CUENCA, A. A.; JURADO, A. T.; ALVAREZ, I. O. C.; FLORES, Y. M. Isolation of bacteria with antifungal activity against the phytopathogenic fungi *Stenocarpella Maydis* and *Stenocarpella macrospora*. **International Journal of Molecular Sciences**, v.12, n.9, p. 5522-5537, 2011.

SAH, S.; KRISHNANI, S.; SINGH, R. *Pseudomonas* mediated nutritional and growth promotional activities for sustainable food security. **Curr Res Microb Sci.**, v. 2, 100084, 2021.

SAHARAN, B. S.; NEHRA, V. Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. **Life Sciences and Medicine Research**, v. 2011:LSMR-21, p. 1-30, 2011.

SALAMONI, S. P. Avaliação da atividade antimicrobiana de isolados de *Streptomyces* e estudo de produção de moléculas bioativas. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2020.

SALVATIERRA-MARTINEZ, R.; ARANCIBIA, W.; AGUILERA, S.; OLALDE, V.; BRAVO, J.; STOLL, A. Colonization ability as an indicator of enhanced biocontrol capacity—An example using two *Bacillus amyloliquefaciens* strains and *Botrytis cinerea* infection of tomatoes. **J Phytotahol.**, v.166, p. 601-612, 2018.

SAMSUDIN, N. I.; MAGAN, N. Efficacy of potential biocontrol agents for control of *Fusarium verticillioides* and fumonisin B1 under different environmental conditions. **World Mycotoxin Journal**, v. 9(2), p. 205-213, 2015.

SANCHES, A.; SALES, C. Expressivo aumento nas exportações brasileiras de milho impõe mudanças na dinâmica do mercado nacional. CEPEA - Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada, ESALQ - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz USP - Universidade de São Paulo Piracicaba, SP. Disponível em: <<https://www.cepea.esalq.usp.br/br>>. Acesso em dez/2022.

SANTOS, V. L.; MONTEIRO, A. S. Strategies based in microbial metabolites for microbial control in agriculture. In: ANA RITA GOMES; TERESA ROCHA-SANTOS; ARMANDO DUARTE. (Org.). Natural Products Discovery. 1ed. Hauppauge NY: NOVA SCIENCE PUBLISHERS, INC. p. 1-600, 2016.

SANTOYO, G.; OROZCO-MOSQUEDA, MA DEL C.; MELAPPA, G. Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: a review. **Biocontrol science and technology**, v. 22, p. 855-872. 2012.

SARANGI, T.; RAMAKRISHNAN, S. Influence of Biomolecules of *Bacillus* spp. against Phytopathogens: A Review. **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.**, v. 5(7), p. 131-134, 2016.

SARWAR, A.; BRADER, G.; CORRETTO, E.; ALETI, G.; ABAIDULLAH, M.; SESSITSCH, A.; HAFEEZ, F. Qualitative analysis of biosurfactants from *Bacillus* species exhibiting antifungal activity. **PLoS ONE**, 13(6): e0198107, 2018.

SARWAR, M.; KREMER, R. J. Determination of bacterially derived auxins using a microplate method. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 20, n. 5, p. 282-285, 1995.

SEEMANN, T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. **Bioinformatics**, v. 30, p. 2068-2069, 2014.

SELEGATO, D. M.; FREITAS, T. R.; PIVATTO, M.; PIVATTO, A. D.; PILON, A. C.; CASTRO-GAMBOA, I. Time-related multivariate strategy for the comprehensive evaluation of microbial chemical data. **Metabolomics**. 18(6), n. 33, 2022.

SHAHEEN, M.; LI, J.; ROSS, A. C.; VEDERAS, J. C.; JENSEN, S. E. *Paenibacillus polymyxa* PKB1 produces variants of polymyxin B-type antibiotics. **Chem Biol.**, 18(12):1640-8, 2011.

SHAHID, I.; HAN, J.; HANOOQ, S.; MALIK, K.A.; BORCHERS, C.H.; MEHNAZ, S. Profiling of Metabolites of *Bacillus* spp. and Their Application in Sustainable Plant Growth Promotion and Biocontrol. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 5:605195, 2021.

SHARMA, R.; PAL, J.; KAUR, M. Isolation of phosphate solubilizing *Pseudomonas* strains from apple rhizosphere in the Trans Himalayan region of Himachal Pradesh, India. **BioRxiv**, 193672, 2017.

SHTARK, O. Y.; SHAPOSHNIKOV, A. I.; KRAVCHENKO, L. V. The Production of Antifungal Metabolites by *Pseudomonas chlororaphis* Grown on Different Nutrient Sources. **Microbiology**, v. 72, p. 574-578, 2003.

SIDDIQUI, I.; SARWAT, S. *Trichoderma harzianum* enhances the production of nematicidal compounds *in vitro* and improves biocontrol of *Meloidogyne javanica* by *Pseudomonas fluorescens* in tomato. **Lett Appl Microbiol.**, v. 38(2), p. 169-175, 2004.

SIDDIQUI, I.; SHAUKAT, S.; EHTESHAMUL-HAQUE, S.; KHAN, S. Effect of systemic fungicides on the efficacy of *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter) migula in the control of root-infecting fungi of wheat. **Acta Agrobotanica**, v. 53, p. 39-46, 2000.

SILVA, D. D.; COSTA, R. V.; COTA, L. V.; LANZA, F. E.; GUIMARÃES, E. A. Micotoxinas em Cadeias Produtivas do Milho: Riscos à Saúde Animal e Humana. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 27p. (Documentos, 193), 2015.

SILVA, E. R. L.; ALVES, L. F. A.; SENE, L.; SANTOS, J.; BONINI, A. K.; POTRICH, M. NEVES, P. M. O. J. Técnicas para a avaliação do efeito *in vitro* de fungicidas sobre *Bacillus Thuringiensis* var. *Kurstaki*. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.73, n. 4, p. 429-437, 2006.

SILVA, J. J.; VIARO, H. P.; FERRANTI, L. S.; OLIVEIRA, A. L. M.; FERREIRA, J. M.; RUAS, C. F.; ONO, E. Y. S.; FUNGARO, M. H. P. Genetic structure of *Fusarium*

*verticillioides* populations and occurrence of fumonisins in maize grown in Southern Brazil. **Crop Protection**, v. 99, p.160-167, 2017.

SILVA, J. T. Genetic transcript analyzer- Ferramenta computacional para análise de transcrição gênica por RNA-Seq. [dissertação] Curitiba: Programa de Pós-Graduação em Bioinformática, Universidade Federal do Paraná, 2012.

SILVA, M. A.; NASCENTE, A. S.; REZENDE, C. C.; FRASCA, L. L. de M.; FILIPPI, M. C. C. de; LANNA, A. C.; FERREIRA, E. P. de B.; CRUZ, D. R. C.; LACERDA, M. C.; FERREIRA, E. A. S. Multifunctional rhizobacteria: use in agriculture. *Research, Society and Development*, [S. l.], v. 11, n. 4, p. e3111426971, 2022.

SINGH, P.; SINGH, R.K.; GUO, D-J.; SHARMA, A.; SINGH, R. N.; LI, D-P.; MALVIYA, M. K.; SONG, X-P.; LAKSHMANAN, P.; YANG, L-T; LI, Y-R. Whole Genome Analysis of Sugarcane Root-Associated Endophyte *Pseudomonas aeruginosa* B18—A Plant Growth-Promoting Bacterium with Antagonistic Potential against *Sporisorium scitamineum*. **Frontiers in Microbiology**, v. 12:628376, 2021.

SLININGER, P. J.; SHEA-WILBUR, M. A. Liquid-culture pH, temperature, and carbon (not nitrogen) source regulate phenazine productivity of the take-all biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* 2-79. **Appl Microbial Biotechnol.**, v. 43, p. 794-800, 1995.

SLININGER, P. J.; VAN CAUWENBERGE, J. E.; BOTHAST, R. J.; WELLER, D. M.; THOMASHOW, L. S.; COOK, R. J. Effect of growth culture physiological state, metabolites and formulation on the viability, phytotoxicity and efficacy of the take-all biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* 2-79 stored encapsulated on wheat seeds. **Appl Microbiol Biotechnol.**, v. 45, p. 391-398, 1996.

SOOD, S.; STEINMETZ, H.; BEIMS, H.; MOHR, K. I.; STADLER, M.; DJUKIC, M.; VON DER OHE, W.; STEINERT, M.; DANIEL, R.; MÜLLER, R. Paenilarvins: iturin family lipopeptides from the honey bee pathogen *Paenibacillus larvae*. **Chembiochem**, v. 15(13), p.1947-1955, 2014.

SOUZA, C. G.; MARTINS, F. I. C. C.; ZOCCOLO, G. J.; FIGUEIREDO, J. E. F.; CANUTO, K. M.; DE BRITO, E. S. Simultaneous quantification of lipopeptide isoforms by UPLC-MS in the fermentation broth from *Bacillus subtilis* CNPMS22. **Anal Bioanal Chem**, 410(26), p. 6827-6836, 2018.

SOUZA, L. L.; RHODEN, S. A.; PAMPHILE, J. A. A importância das ômicas como ferramentas para o estudo da prospecção de microrganismos: perspectivas e desafios. **Revista UNINGÁ Review**, v.18, n.2, p. 16-21, 2014.

SPADOTTO, C. A.; GOMES, M. A. F.; LUCHINI, L. C.; ANDRÉIA, M. M. Monitoramento de risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. 29p. (Documentos, 42), 2004.

STEFANELLO, J.; BACHI, L. M. A.; GAVASSONI, W. L.; HIRATA, L. M.; PONTIM, B. C. A. Incidência de fungos em grãos de milho em função de diferentes épocas de aplicação foliar de fungicida. **Pesq. Agropecu. Trop.**, Goiânia, v. 42, n. 4, p. 476-481, 2012.

STEINBORN, G.; HAJIREZAEI, M-R.; HOFEMEISTER J. bac genes for recombinant bacilysin and anticapsin production in *Bacillus* host strains. **Arch Microbiol.**, v.183(2), p. 71-79, 2005.

STEPANOVIĆ, S.; VUKOVIĆ, D.; HOLA, V.; BONAVENTURA; G. D., DJUKIĆ, S.; ĆIRKOVIĆ, I.; RUZICKA, F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **Apmis**, v. 115(8), p. 891-899, 2007.

STOCKWELL, V. O.; JOHNSON, K. B.; SUGAR, D.; LOPER, J. E. Mechanistically compatible mixtures of bacterial antagonists improve biological control of fire blight of pear. **Phytopathology**, v. 101, p. 113-123, 2011.

STOLL, A.; SALVATIERRA-MARTÍNEZ, R.; GONZÁLEZ, M.; ARAYA, M. The Role of Surfactin Production by *Bacillus velezensis* on Colonization, Biofilm Formation on Tomato Root and Leaf Surfaces and Subsequent Protection (ISR) against *Botrytis cinerea*. **Microorganisms**. v. 9(11):2251, 2021.

SUN, D.; LIAO, J.; SUN, L.; WANG, Y.; LIU, Y.; DENG, Q.; ZHANG, N.; XU, D.; FANG, Z.; WANG, W.; GOONERATNE, R. Effect of media and fermentation conditions on surfactin and iturin homologues produced by *Bacillus natto* NT-6: LC-MS analysis. **AMB Express**, v. 9, n.120, 2019.

SYDENHAM, E. W.; THIEL, P. G.; MARASAS, W. F. O.; SHEPHARD, G. S.; VAN SCHALKWYK, D. J.; KOCH, K. R. Natural occurrence of some *Fusarium* mycotoxins in corn from low and high esophageal cancer prevalence areas of the Transkei, Southern Africa. **J. Agric. Food Chem.**, v. 38(10), p. 1900-1903, 1990.

TESSARI, E. N. C.; KOBASHIGAWA, E.; CARDOSO, A. L. S. P.; LEDOUX, D. R.; ROTTINGHAUS, G. E.; OLIVEIRA, C. A. F. Effects of Aflatoxin B1 and Fumonisin B1 on Blood Biochemical Parameters in Broilers. **Toxins**, v. 2(4), p. 453-460, 2010.

THAKUR, P.; SAINI, N. K.; THAKUR, V. K.; GUPTA, V. K.; SAINI, R. V.; SAINI, A. K. Rhamnolipid the Glycolipid Biosurfactant: Emerging trends and promising strategies in the field of biotechnology and biomedicine. **Microbial Cell Factories**, v.20, n.1, 2021.

THOUDAM, R.; DUTTA, B. K. Compatibility of *Trichoderma atroviride* with fungicides against blackrot disease of tea: an *in vitro* study. **Journal of International Academic Research for Multidisciplinary**, v. 2, p. 25-33, 2014.

TSUGAWA, H.; CAJKA, T.; KIND, T.; MA, Y.; HIGGINS, B.; IKEDA, K.; KANAZAWA, M.; VANDERGHEYNST, J.; FIEHN, O.; ARITA, M. MS-DIAL: data-independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis. **Nature Methods**, v. 12(6), p. 523-526, 2015.

TULP, M.; BOHLIN, L. Rediscovery of known natural compounds: nuisance or goldmine? **Bioorg Med Chem**, v. 13(17), p. 5274-82, 2005.

USDA- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Grain: World Markets and Trade. Dec 10. Disponível em: <<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production.pdf>>. Acesso em dez/2022.

VANITTANAKOM, N.; LOEFFLER, W.; KOCH, U.; JUNG, G. Fengycin – A novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis* F-29-3. **Journal of Antibiotics**, v. 39, p. 888-901, 1986.

VATSA, P.; SANCHEZ, L.; CLEMENT, C.; BAILLIEUL, F.; DOREY, S. Rhamnolipid biosurfactants as new players in animal and plant defense against microbes. **Int J Mol Sci**, v. 11(12), p. 5095-5108, 2010.

VILLEGAS-ESCOBAR, V.; GONZÁLEZ-JARAMILLO, L. M.; RAMÍREZ, M.; MONCADA, R. N.; SIERRA-ZAPATA, L.; ORDUZ, S.; ROMERO-TABAREZ, M. Lipopeptides from *Bacillus* sp. EA-CB0959: Active metabolites responsible for *in vitro* and *in vivo* control of *Ralstonia solanacearum*. **Biological Control**, v. 125(3), 2018.

VINCELLI, P.; PARKER, G. ID-121: Fumonisin, Vomitoxin, and Other Mycotoxins in Corn Produced by *Fusarium* Fungi. In: Cooperative Extension Service. Frankfurt: University of Kentucky, College of Agriculture, 2002.

VOS, C. M. F.; CREMER, K. D.; CAMMUE, B. P. A.; CONINCK, B. D. The toolbox of *Trichoderma* spp. in the biocontrol of *Botrytis cinerea* disease. **Mol Plant Pathol.**, v. 16(4), p. 400-412, 2015.

VURUKONDA, S. S. K. P.; GIOVANARDI, D.; STEFANI, E. Plant growth promoting and biocontrol activity of *Streptomyces* spp. as endophytes. **Int J Mol Sci.**, v.19(4):952, 2018.

WAGI, S.; AHMED, A. *Bacillus* spp.: potent microfactories of bacterial IAA. *PeerJ*, v.7: e7258, 2019.

WARFIELD, C. Y.; DAVIS, R. M. Importance of the husk covering on the susceptibility of corn hybrids to *Fusarium* ear rot. **Plant Disease**, v. 80, p. 208-210, 1996.

WEDAJO, B. Compatibility studies of fungicides with combination of *Trichoderma* species under *in vitro* conditions. **Virology & Mycology**, v. 4(2):149, 2015.

WU, G.; LIU, Y.; XU, Y.; ZHANG, G.; SHEN, Q.; ZHANG, R. Exploring Elicitors of the Beneficial Rhizobacterium *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to Induce Plant Systemic Resistance and Their Interactions With Plant Signaling Pathways. **Mol Plant Microbe Interact.**, v. 31(5), p. 560-567, 2018.

XU, S. J.; KIM, B. S. Biocontrol of *Fusarium* Crown and Root Rot and Promotion of Growth of Tomato by *PaeniBacillus* Strains Isolated from Soil. **Mycobiology**, v. 42(2), p. 158-166, 2014.

XU, Y.; LIN, J.; CUI, T.; SRINIVAS, S.; FENG, Y. J. Mechanistic insights into transferable polymyxin resistance among gut bacteria. **J Biol Chem.**, v. 293(12), p. 4350-4365, 2018.



YE, YUN-FENG; LI, QI-QIN; FU, GANG; YUAN, GAO-QING; MIAO, JIAN-HUA; LIN, WEI. Identification of Antifungal Substance (Iturin A2) Produced by *Bacillus subtilis* B47 and Its Effect on Southern Corn Leaf Blight, **Journal of Integrative Agriculture**, v. 11, p. 90-99, 2012.

YONG-KI, K.; SUNG-JUN, H.; CHANG-KI, S.; MIN-JEONG, K.; EUN-JUNG, C.; MIN-HO, L.; JONG-HO, P.; EUN-JUNG, H.; NAN-HEE, A.; HYEONG-JIN, J. Functional Analysis of *Bacillus subtilis* Isolates and Biological Control of Red Pepper Powdery Mildew Using *Bacillus subtilis* R2-1. **Research in Plant Disease**, v. 18(3), p. 201-209, 2012.

YOUSUF, J.; THAJUDEEN, J.; RAHIMAN, M.; KRISHNANKUTTY, S.; ALIKUNJ, A. P.; ABDULLA, M. H. A. Nitrogen fixing potential of various heterotrophic *Bacillus* strains from a tropical estuary and adjacent coastal regions, **J Basic Microbiol**, v.57(11), p.922-932, 2017.

YU, C.; LIU, X.; ZHANG, X.; ZHANG, M.; GU, Y.; ALI, Q.; MOHAMED, M.S.R.; XU, J.; SHI, J.; GAO, X.; WU, H.; GU, Q. Mycosubtilin Produced by *Bacillus subtilis* ATCC6633 Inhibits Growth and Mycotoxin Biosynthesis of *Fusarium graminearum* and *Fusarium verticillioides*. **Toxins**, v. 13(11):791, 2021.

YUAN, J.; LI, B.; ZHANG, N.; WASEEM, R.; SHEN, Q.; HUANG, Q. Production of Bacillomycin- and Macrolactin-Type Antibiotics by *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 for Suppressing Soilborne Plant Pathogens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 60 (12), p. 2976-2981, 2012.

ZAID, D. S.; CAI, S., HU, C.; LI, Z.; LI Y. Comparative Genome Analysis Reveals Phylogenetic Identity of *Bacillus velezensis* HNA3 and Genomic Insights into Its Plant Growth Promotion and Biocontrol Effects. **Microbiology Spectrum**, v. 10(1):e0216921, 2022.

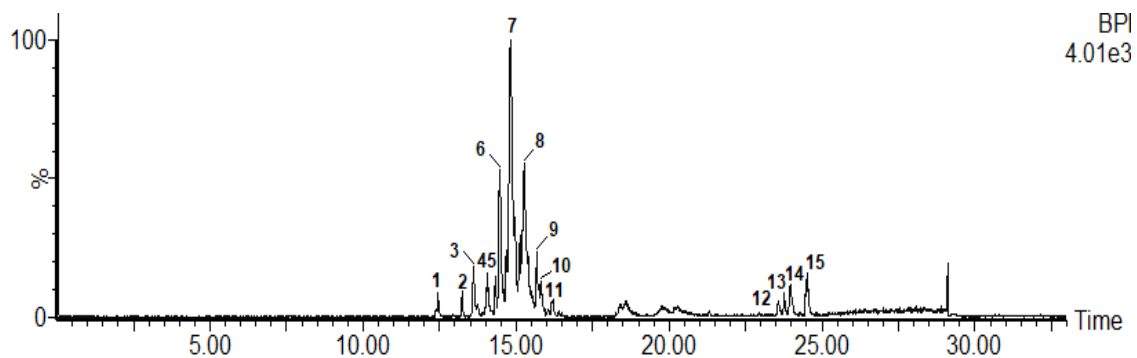
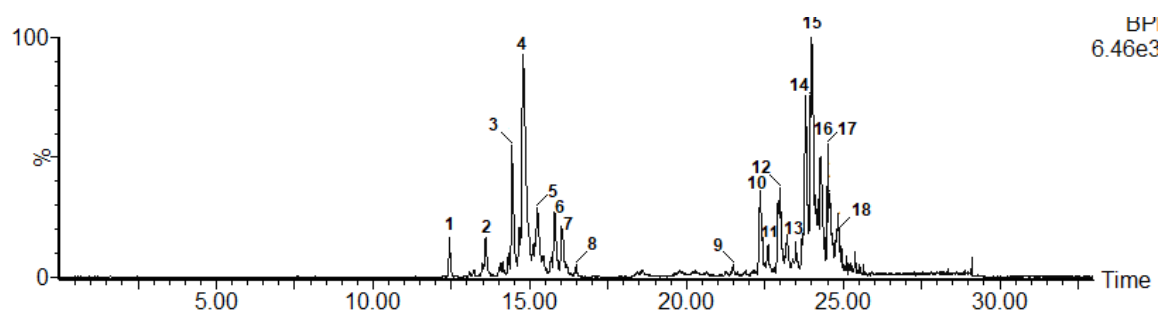
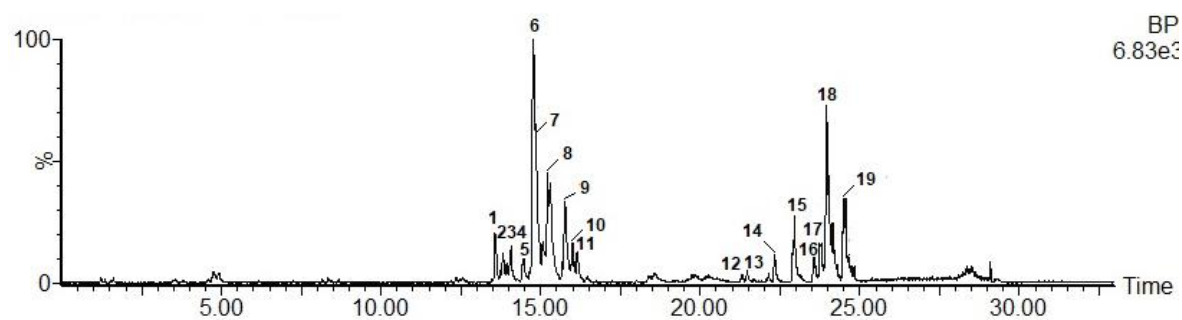
ZALILA-KOLSI, I.; MAHMOUD, H.; ALI, S.; SELLAMI, Z.; NASFI, S.; TOUNSI, K.; JAMOSSI. Antagonist effects of *Bacillus* spp. strains against *Fusarium graminearum* for protection of durum wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. *durum*), **Microbiological Research**, v. 192, p. 148-158, 2016.

ZALTE, A.; GADE, R. M.; SHITOL, A. V.; BELKAR, Y. K. Management of tomato damping off by using plant growth promoting microorganisms. **J. Pl. Dis. Sci.**,v. 8(2), p. 200-203, 2013.

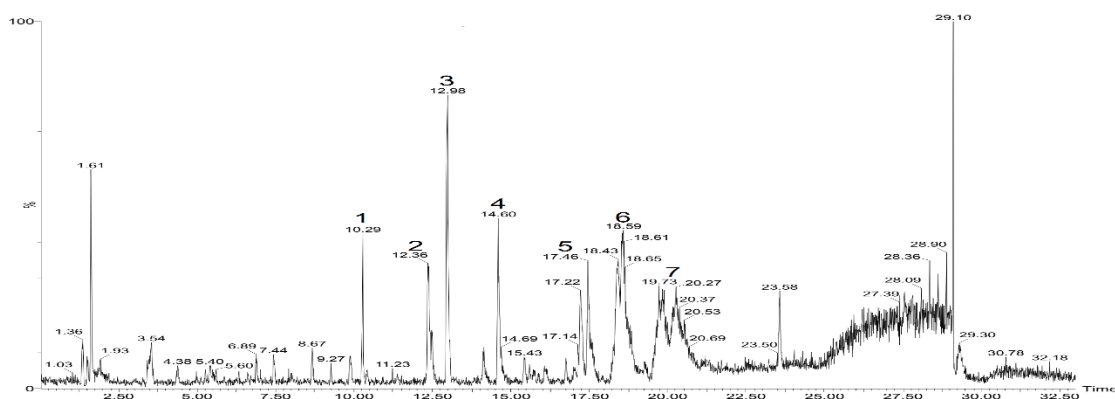
ZERIOUH, H.; DE VICENTE, A.; PÉREZ-GARCÍA, A.; ROMERO, D. Surfactin triggers biofilm formation of *Bacillus subtilis* in melon phylloplane and contributes to the biocontrol activity. **Environ. Microbiol**; v. 16(7), p. 2196-2211, 2014.

ZHU, Z.; PENG, Q.; MAN, Y.; LI, Z.; ZHOU, X.; BAI, L.; PENG, D. Analysis of the Antifungal Properties of *Bacillus velezensis* B-4 Through a Bioassay and Complete-Genome Sequencing. **Frontiers in Genetics**, 11:703, 2020.

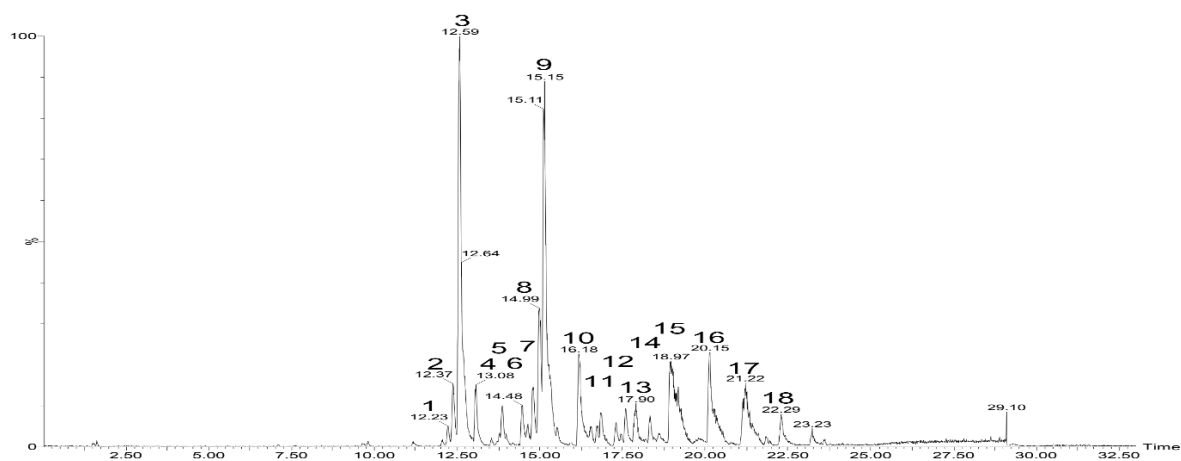
## 8 APÊNDICES

**APÊNDICE A - Análise por cromatografia líquida de alta eficiência de lipopeptídeos produzidos por *Bacillus velezensis* IM14****APÊNDICE B - Análise por cromatografia líquida de alta eficiência de lipopeptídeos produzidos por *Bacillus* sp. LIS05****APÊNDICE C - Análise por cromatografia líquida de alta eficiência de lipopeptídeos produzidos por *Bacillus velezensis* CT02**

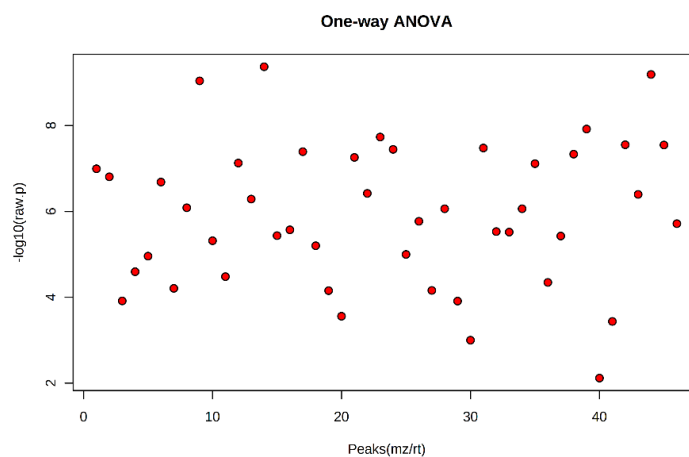
### APÊNDICE D - Análise por cromatografia líquida de alta eficiência de lipopeptídeos produzidos por *Paenibacillus* sp. LIS04



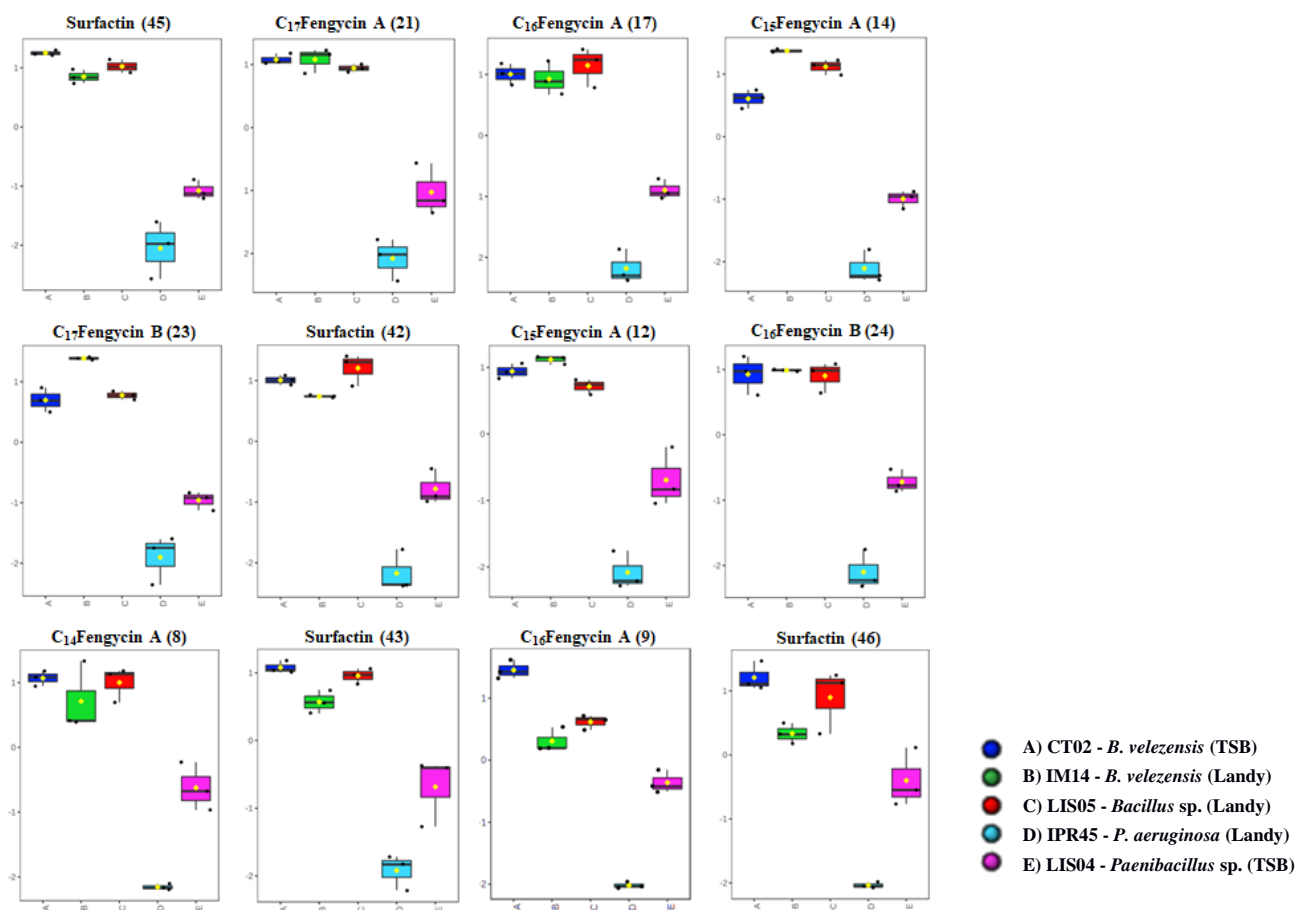
### APÊNDICE E - Análise por cromatografia líquida de alta eficiência de lipopeptídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* IPR45



### APÊNDICE F - Análise de ANOVA unidirecional. Os pontos em vermelho são os compostos significativos dispostos com base no valor de $p < 0,05$ .



**APÊNDICE G - Boxplot das concentrações relativas de doze compostos significativamente relevantes para a atividade antifúngica, discriminadas na análise de VIP ( $VIP > 1,0$  e  $p < 0,05$ ).**



## 9 ANEXO

### **Artigo: Isolation and characterization of antifungal molecules and genes of *Bacillus*, *Paenibacillus* and *Pseudomonas* from maize and sorghum**

Gisele de Fátima Dias Diniz<sup>1</sup>, Sylvia Morais de Souza Tinoco<sup>2</sup>, Maria Lúcia Ferreira Simeone<sup>3</sup>, Kirley Marques Canuto<sup>4</sup>, José Edson Fontes Figueiredo<sup>5</sup>, Christiane Abreu de Oliveira<sup>6\*</sup>, Vera Lúcia dos Santos<sup>1\*</sup>

#### **ORCID ID**

Gisele de Fátima Dias Diniz: <https://orcid.org/0000-0001-7018-6574>

Sylvia Morais de Souza Tinoco <https://orcid.org/0000-0002-8030-1385>

Maria Lúcia Ferreira Simeone <https://orcid.org/0000-0002-2003-0341>

Kirley Marques Canuto <https://orcid.org/0000-0003-3194-6125>

José Edson Fontes Figueiredo: <https://orcid.org/0000-0002-9542-2315>

Christiane Abreu de Oliveira: <https://orcid.org/0000-0002-1874-2489>

Vera Lúcia dos Santos: <https://orcid.org/0000-0001-5815-5652>

<sup>1</sup>Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Av. Pres. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha, Belo Horizonte, 31270-901, Minas Gerais, Brasil

<sup>2</sup>Laboratório de Biologia Molecular, Embrapa Milho e Sorgo, Rod MG 424 Km 45, Zona Rural, Sete Lagoas, 35701-970, Minas Gerais, Brasil

<sup>3</sup>Laboratório de Agroquímica, Embrapa Milho e Sorgo, Rod MG 424 Km 45, Zona Rural, Sete Lagoas, 35701-970, Minas Gerais, Brasil

<sup>4</sup>Laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais, Embrapa Agroindústria Tropical, Rua Dra. Sara Mesquita, 2.270, Bairro Planalto do Pici, 60511-110, Fortaleza, CE

<sup>5</sup>Laboratório de Bioquímica Molecular, Embrapa Milho e Sorgo, Rod MG 424 Km 45, Zona Rural, Sete Lagoas, 35701-970, Minas Gerais, Brasil

<sup>6</sup>Laboratório de Microbiologia e Bioquímica do Solo, Embrapa Milho e Sorgo, Rod MG 424 Km 45, Zona Rural, Sete Lagoas, 35701-970, Minas Gerais, Brasil

#### **Corresponding author:**

Christiane Abreu de Oliveira [christiane.paiva@embrapa.br](mailto:christiane.paiva@embrapa.br)

Vera Lúcia dos Santos [verabio@gmail.com](mailto:verabio@gmail.com)

## Abstract

The fungus *Fusarium verticillioides* is one of the primary pathogens of corn in tropical soils. The use of resistant varieties and fungicides are the leading measures to control this phytopathogen. However, the excessive and indiscriminate use of fungicides in crops poses severe risks to the environment and human beings. Biological control is one of the alternative methods to minimize the problem. This work used three bacteria isolated from corn and two isolated from sorghum. *In vitro* confrontation tests in solid media (PDA) and culture filtrates inhibited the growth of *Fusarium verticillioides*. The partial sequencing of the 16S gene indicated that these bacteria belong to the genera *Bacillus* sp. (isolated CT02 and IM14 and LIS05), *Paenibacillus* sp. (LIS04), and *Pseudomonas aeruginosa* (strain IPR45). Genomic sequencing revealed that the isolates belong to the species *Bacillus velezensis* (LIS05, IM14, and CT02), *Paenibacillus ottowii* (LIS04), and *Pseudomonas aeruginosa* (IPR45). UPLC-MS identified the antifungal metabolites as iturin, fengycin, and surfactin (*B. velezensis*), quinolone, and rhamnolipid biosurfactant (*P. aeruginosa*), and polymyxin (*P. ottowii*). These results were confirmed by genomic analysis. In addition, these genomes showed other putative genes involved in biocontrol mechanisms, including siderophores, resistance-inducing genes (ISR), and enzymes. The potential of these isolates as biocontrol agents will be validated by greenhouse experiments and field trials.

## Resumo

O fungo *Fusarium verticillioides* é um dos principais patógenos do milho em solos tropicais. O uso de variedades resistentes e fungicidas são as principais medidas de controle desse fitopatógeno. No entanto, o uso excessivo e indiscriminado de fungicidas nas lavouras traz sérios riscos ao meio ambiente e ao ser humano. O controle biológico é um dos métodos alternativos para minimizar o problema. Este trabalho utilizou três bactérias isoladas de milho e duas isoladas de sorgo. Testes de confrontação *in vitro* em meio sólido (PDA) e filtrados de cultura inibiram o crescimento de *Fusarium verticillioides*. O sequenciamento parcial do gene 16S indicou que essas bactérias pertencem ao gênero *Bacillus* sp. (isolados CT02 e IM14 e LIS05), *Paenibacillus* sp. (LIS04) e *Pseudomonas aeruginosa* (estirpe IPR45). O sequenciamento genômico revelou que os isolados pertencem às espécies *Bacillus velezensis* (LIS05, IM14 e CT02), *Paenibacillus ottowii* (LIS04) e *Pseudomonas aeruginosa* (IPR45). UPLC-MS identificou os metabólitos antifungais como iturina, fengicina e surfactina (*B.*

*velezensis*), quinolona e biossurfactante ramnolipídio (*P. aeruginosa*) e polimixina (*P. ottowii*). Esses resultados foram confirmados por análise genômica. Além disso, esses genomas mostraram outros genes putativos envolvidos em mecanismos de biocontrole, incluindo sideróforos, genes indutores de resistência (ISR) e enzimas. O potencial desses isolados como agentes de biocontrole será validado por experimentos em casa de vegetação e em campo.

## **Introduction**

Maize is Brazil's second most important crop in the agricultural scenario, surpassed only by soybean (CONAB, 2020). However, different factors affect corn yield, including soil type, water stress, sowing time, hybrid yield potential, competition for weeds, insect attack, and diseases caused by microorganisms (Barroso et al., 2017). In addition, the post-harvest losses account for direct physical and quality losses reducing the economic value of the crop (Kumar & Kalita, 2017). Pathogenic fungi can also produce toxins that may accumulate within the plants and their commercial products (Perincherry et al., 2019). The possible accumulation of toxins during and after the cropping season may make the crop product unsuitable for human and animal consumption (Savary et al., 2012; Borràs-Vallverdú et al., 2022).

Over 19,000 fungi species worldwide cause diseases in crop plants (Jain et al., 2019). The fungus *Fusarium verticillioides* (Saccardo) Nirenberg) is one of the most common pathogens associated with the maize crop in temperate and humid tropical to subtropical climate areas (Gomes et al., 2020; Sousa et al., 2022). The fungus infects the maize plants at all stages of development, causing seedling decay, stalk rot, ear rot, and mycotoxin contamination (Murillo-Williams and Munkvold, 2008).

The traditional control strategies for *F. verticillioides* in the field relies on integrated management strategies, which include crop rotation, sanitation, and the use of resistant cultivars and chemical fungicides (Olowe et al., 2018; Czarnecka et al., 2022; Islam et al., 2022). The indiscriminate use of fungicides has generated significant concern due to damage to the environment and human and animal health. In addition, increasing evidence suggests that chemical control might not efficiently reduce toxin production by the fungus (Marin et al., 2013). Therefore, the European Union has set the maximum residue level (MRL) on maize and other cereals at 0.2 µg/kg (Commission Regulation EU No 524/2011; Marin et al., 2013). Moreover, Fungi have plastic genomes and reproduce rapidly (Perlin et al., 2017; Fisher et al., 2018). Thus, antifungal drugs used in agriculture can develop fungicide-resistant fungal strains besides acting as stress factors that induce toxin biosynthesis (Verweij et al., 2009; Edwards and Godley, 2010; Brauer et al., 2019).

Given these complex factors, scientists are looking for alternative technologies to reduce or replace the use of fungicides in the field. Alternative microbial based-methods for disease control aiming to minimize the harmful effects of chemical fungicides and increase food production and quality have been studied and tested (Adetunji et al., 2019). The use of bacteria for controlling fungal pathogens has been recognized as a promising environmentally friendly and low-cost approach compared to conventional methods (van Lenteren et al., 2018; Rahman, 2018; Diniz et al., 2022). Thus, biological control using antagonistic bacteria can be an efficient alternative for plant disease management, aiming at sustainable agriculture (Tariq et al., 2020). Among the main bacterial genera used as biological control agents are *Bacillus* sp., *Paenibacillus* sp., and *Pseudomonas* sp. (O'Brien, 2017; Padda et al., 2017). These bacteria have characteristics that offer them advantages as biological control agents. They produce secondary metabolites with antagonistic activity against pathogenic fungi and bacteria (Saharan and Nehra, 2011). Many *Bacillus* spp. produce many volatile and non-volatile antimicrobial compounds with antifungal effects and active peptides with fungicidal activity, such as iturin, fengycin, and surfactin (Asari et al., 2016; Sarangi and Ramakrishnan, 2016). In fact, in this genus, genes coding for the biosynthesis of different antibiotics such as iturin, bacilisin, bacillomycin, fengicin, surfactin, mersacidin, ericin, subtilin, subtilisin, and mycosubtiline (Chung et al., 2008) represent 4 to 8% of the genome. Among the primary antimicrobial metabolites of *Bacillus*, cyclic lipopeptides, such as iturin A, fengycin, and surfactin, stand out. Fengycin has fungitoxic activity against filamentous fungi and can induce plant resistance. Surfactin acts as a biosurfactant and induces systemic resistance in plants by activating many plant protection genes against viruses or enhancing plant growth for better nutrient and water acquisition (Gong et al., 2015; Vejan et al., 2016; Kim et al., 2017b; Abdelkhalek et al., 2020). Iturin shows intense antifungal activity against yeasts and fungi and has been reported to act on the cytoplasmic membrane, causing leakage of vital substances that eventually leads to cell death (Ongena and Jacques, 2008).

Concerning *Paenibacillus*, its species are efficient producers of secondary metabolites, mainly fusaricidins and polymyxins, potent lipopeptides with activity against fungal and bacterial pathogens (Mülner et al., 2021).

Bacteria of the *Pseudomonas* genus are also extensively investigated for antagonist activity because they can produce a wide range of active compounds against various phytopathogenic fungi (Bhattacharyya and Jha, 2012). Primary antifungal metabolites produced by *Pseudomonas* include peptides such as viscosinamide; antibiotics such as phloroglucinols, phenazines, pyoluteorin, and pyronitrile; enzymes; hydrocyanide gas; siderophores, such as



salicylic acid, pyoverdines (PVDs). *Pseudomonas* also produces pyoqueline, responsible for chelating iron and other metals, which confers a competitive advantage to biocontrol agents by limiting essential minerals in natural habitats (Radzki, 2013). *Pseudomonas* species also produces rhamnolipid compounds with great biopesticide activity, potentially valuable for agriculture due to their inhibitory activity against different microbial diseases. In addition, many of these compounds stimulate plant defense responses (Vatsa et al., 2010).

The identification of bioactive molecules can be implemented by different approaches, including gas chromatography–mass and mass spectrometry techniques, metagenome, and genome-mining to increase the probability of finding new bioactive molecules. In addition, screening techniques have proven highly useful for screening and analyzing active components in complex mixtures, which rely on cell culture, dialysis, ultrafiltration, chromatographic methods, and target molecule immobilization, using biological targets to identify the active compounds (Pliego et al., 2011; Fu et al., 2019; Armengol et al., 2021).

We isolated and selected fungal antagonist bacteria in the present study, detect antifungal molecules by HPLC, and identified other potential molecules through complete genome sequencing.

## **Material and Methods**

### **Microbial strains**

In this study, one endophytic bacteria (*Pseudomonas aeruginosa*, strain IPR45), two epiphytic strains of corn (*Bacillus velezensis*, IM14, and CT02), (Diniz et al., 2022) and two new sorghum isolates (*Paenibacillus* sp, LIS04, and *Bacillus* sp., LIS05) were tested *in vitro* for antifungal activity against a phytopathogenic strain (CML 2778) of *Fusarium verticillioides*.

### **Molecular identification of LIS04 and LIS05 isolates through partial sequencing of the 16S ribosomal gene**

Total genomic DNA was PCR amplification, and partial sequencing of the 16S rRNA gene was performed as described in Diniz et al. (2022). The identity of the isolates was made by comparing the bacterial nucleotide sequences deposited in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database using the BLASTN program (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

### **Production and detection of secondary metabolites with antifungal activity**

The isolates were grown in four culture media: 1- Trypticase Soy Broth (TSB) formulated with 17 g/L casein peptone, 3 g/L soy peptone, 2.5 g/L glucose, 5 g/L sodium chloride, 2.5 g/L dipotassium phosphate g/L, pH 7.3); 2- Potato Dextrose Broth (PDB) formulated with potato infusion 200 g/L, glucose 20 g/L, pH 7.0); 3- Luria-Bertani (LB) with glucose (20 g/L glucose, 10 g/L tryptone, 5 g/L yeast extract, 5 g/L NaCl, pH =7.0), and Landy medium (LM) consisting of 20 g/L glucose, L- glutamic 5 g/L, MgSO<sub>4</sub> 0.5 g/L, KCl 0.5 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0 g/L, Fe<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 0.0012 g/L, MnSO<sub>4</sub> 0.0014 g/L, CuSO<sub>4</sub> 0.0016 g/L, pH 7.6), aiming to increase the probability of detecting secondary metabolites with antifungal activity. After incubation at 28°C at 160 rpm for 72 h, the supernatant was collected by centrifugation at 12,000 g for 10 minutes, filtered through 0.22 µm membranes, and used in *in vitro* tests.

### **Broth microdilution susceptibility test**

The antifungal activity of the crude bacterial extracts was evaluated by the adapted method described in the NCCLS document M38-A (CLSI, 2002) in 96-well U-bottom microdilution plates (Costar, Corning, USA) containing extract concentrations ranging from 0.3% to 100% and negative (without fungus) and positive (with fungus) controls.

A solution of *F. verticillioides* spores at a concentration of  $1 \times 10^4$  was added to each test well, and the microplates were incubated at 28°C without shaking for 96 h. After this period, the absorbance reading was performed at 490 nm using a digital spectrophotometer (Biospectro). Each microplate was considered a replica, and the test was performed in triplicate. To calculate the inhibition percentage, Pérez et al. (2018) described the formula:

$$\% \text{ growth} = \frac{A - B}{C} (100)$$

being:

A = absorbance of treatment; B = absorbance of negative control; C = absorbance of positive control; and the formula (100 - % growth) determined the percentage of inhibition.

### **Identification of secondary metabolites by UPLC-MS**

For the separation of metabolites, each bacterium was grown in the culture medium in which it produced the highest antifungal activity, as determined by the microdilution test. After incubating the isolated colonies at 28 °C and 160 rpm for 72 hours, the supernatant was collected by centrifugation (9,000 rpm for 10 min). Extraction of compounds was carried out

by acid precipitation adding 6M HCl until the pH was reduced to 2.0. Then, the acidic supernatants were stored in the refrigerator for 24 h, and after that, each suspension was centrifuged (9,000 rpm for 10 min), and the pellets were lyophilized. Chromatographic analysis was performed on an Acquity UPLC system coupled to a Quadrupole/Time of Flight (UPLC-QTOF-MSE) Xevo System (Waters Corp, Milford, MA, USA), and high-resolution mass conditions were processed according to the standardized methodology described in Souza et al. (2018) following the method recommended by the International Conference Harmonization (ICH, 2015), and Brazilian Ministry of Agriculture Livestock and Food Supply Brazil (MAPA, Brasil, 2011). Chromatographic runs were performed on a Waters Acquity UPLC BEH column (150 x 2.1 mm, 1.7  $\mu$ m). The fixed temperature was 40 °C, mobile phases water with 0.1% formic acid (A), and acetonitrile with 0.1% formic acid (B). The gradient ranges from 2% to 95% B (15 min), the flow rate was 0.4 mL/min, and the injection volume of 5  $\mu$ l.

The ESI+ mode was acquired in the range of 110-1180 Da, fixed source temperature of 120 °C, desolvation temperature of 350 °C, desolvation gas flow of 500 L/h, and capillary voltage of 3.2 kV. Leucine enkephalin was used as a lock mass, and the acquisition mode was MS E. The instrument was controlled by Masslynx 4.1 software (Waters Corporation).

### **Data processing and quimimetry**

Initially, the data acquired by the UPLC-QTOF-MSE (.raw format) were converted to the Analysis Base File (.abf) format using the Abf Converter software (<http://www.reifycs.com/AbfConverter>) and, later, were processed using the MS-DIAL v. 4.70 (Tsubawa et al., 2015). The processing parameters were: mass range m/z 50-1180; MS1 tolerance of 0.01 and MS2 tolerance of 0.05; minimum peak height of 50; mass slice width of 0.1 Da; linear-weighted moving average as a smoothing method, using level 3 and minimum peak width of 5; sigma window value of 0.5 for deconvolution, and peak alignment, tolerance of 0.05 min and MS1 of 0.01 Da.

The aligned data matrix for the 46 characterized compounds was exported from MS-DIAL as a .txt file, and loaded into the Metaboanalyst 5.0 platform, following the standard protocol described by Chong et al. (2018). Initially, one-way analysis of variance (ANOVA) was applied to identify statistically significant compounds among the five samples, adjusting the p-value according to FDR (False Discovery Rate) < 0.05 and Fisher's LSD post hoc test (Least Significant Difference). Additionally, unsupervised PCA (Principal Component Analysis), HCA (Hierarchical Cluster Analysis), Heat map, and chemometric analysis were performed to detect separation trends between samples based on the relative intensity of the compounds.

Then, Pearson's measure and the Ward clustering algorithm were used to build the HCA-Heat map model. In contrast, supervised analysis of PLS-DA (Discriminant Analysis by Partial Least Squares) was performed to obtain the maximum separation between groups and predict which variables were discriminating for antifungal activity through the analysis of the Variable of Importance in Projection (VIP) > 1.0 (Selegado et al., 2022).

### **Sequencing and analysis of the complete genome of antagonistic bacteria**

The bacteria were inoculated in Tryptone Soy Broth (TSB) and incubated at 28°C for 24 h. According to the manufacturer's recommendations, genomic DNA extraction was performed using the Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA) and quantified on the Qubit® 2.0 fluorometer (Life Technologies). The genomes of *Bacillus* sp. (IM14, LIS05 and CT02), *Paenibacillus* sp. (LIS04), and *Pseudomonas aeruginosa* (IPR45) strains were sequenced on the Illumina HiSeq 4000 platform (Illumina, San Diego, CA, USA) at Beijing Genomics Institute – BGI (Shenzhen, China), using the 150-paired end strategy.

The sequenced reads were prepared for assembly using the Illumina NGS data program Trimmomatic (Galaxy Version 0.38.0). After trimming, the quality of the reads was verified using the FastQC software (Galaxy Version 0.73+galaxy0), eliminating reads with a quality lower than 20 in the Phred quality index. Next, the reads were assembled using the SPAdes software, and the assembly quality and genome completeness analysis were performed using the QUAST (<https://quast.sourceforge.net/quast>) and BUSCO (Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs – <https://gitlab.com/ezlab/busco>), respectively (Noori et al. 2021).

The pre-assembled genomic sequences were annotated using PROKKA version 1.8 (Seemann, 2014) and RAST version 2.0 (Rapid Annotation using Subsystem Technology) software (Aziz et al., 2008).

### **Phylogenetic analysis of bacterial strains**

Phylogenetic analysis was performed based on the complete genome using the Type Strain. Genome Server TYGS software (Meier-Kolthoff & Göker, 2019). Genome contigs were reordered according to reference genomes, extracted from the NCBI database using the MAUVE program version 2.4.0 (Darling et al., 2004).

## **RESULTS**

### **Antifungal activity against *Fusarium verticillioides* and identification of bacteria isolated from sorghum seeds**

The selected strains LIS05 and LIS04 were preliminarily identified based on partial sequencing of the 16S rRNA as *Bacillus* sp. and *Paenibacillus* sp., respectively. In the paired culture test, the isolates LIS04 and LIS05 showed inhibition values for mycelial growth of *F. verticillioides* of 67.5 and 57.5%, respectively.

### Antifungal activity of secondary metabolites produced by bacteria

The five isolates (LIS04, LIS05, CT02, IM14, and IPR45) showed antifungal activity against *F. verticillioides* in all four culture media used (Table S1).

The antifungal activity of the crude extracts of the five bacteria by the microdilution plate method made it possible to establish the lowest concentration capable of inhibiting the growth of *F. verticillioides* by at least 50%.

The lowest inhibitory concentrations of the crude extracts are shown in Table 1. The lowest concentration of crude extracts of each isolate, capable of inhibiting the growth of the phytopathogen by at least 50%, showed significant variation, both among the isolates and in the culture media used. The lowest values were those produced by CT02 isolates grown in the TSB medium (0.7%) and by isolates IM14 (1.5%), LIS05 (3.1%), and IPR45 (6.2%) grown in the Landy medium. Regardless of the culture medium, the LIS04 extract concentration of 100% was necessary to inhibit at least 50% of the *F. verticillioides* growth.

**Table 1** - Lower concentrations of the crude bacterial extracts necessary to reduce the growth of *Fusarium verticillioides* above 50% in the microdilution plate test.

Isolate	Minimum inhibitory concentration of crude extract (%)			
	TSB	PDB	LB+G	Landy
LIS04 ( <i>Paenibacillus</i> sp.)	100	100	100	100
LIS05 ( <i>Bacillus</i> sp.)	50,0	25,0	50,0	3,1
CT02 ( <i>B. velezensis</i> )	0,7	50,0	50,0	1,5
IM14 ( <i>B. velezensis</i> )	3,1	50,0	50,0	1,5
IPR45 ( <i>P. aeruginosa</i> )	25,0	100,0	25,0	6,2

TSB = Trypticase Soy Broth, PDB = Potato Dextrose Broth, LB+G = Luria-Bertani (LB) with glucose

### Identification of secondary metabolites by UPLC-MS

The result of the UPLC-QTOF-MSE analysis are shown in Supporting information.

The samples of the *Bacillus* isolate IM14 showed 15 spectra being, two of iturin, nine of fengycin, and four spectra for surfactin (Table S2 and Figure S1-A).

For isolate LIS05 18 the spectra were divided into one for iturin, seven for fengycin, and ten for surfactin (Table S3 and Figure S1-B). Concerning CT02, the nineteen spectra corresponded to eleven fengycin and an eighth surfactin (Table S4 and Figure S1-C). Seven peaks were observed for *Paenibacillus*, corresponding to polymyxin (Table S5 and Figure S2). For *Pseudomonas aeruginosa*, twelve peaks were quinolone, five rhamnolipid, and one unidentified molecule (Table S6 and Figure S3). As expected, the crude extracts of *Paenibacillus* sp. and *Pseudomonas aeruginosa* applied to chromatographic columns did not show lipopeptides peaks (Figure S4).

### Data processing and chemometric analysis

The UPLC QTOF.MS analyzed the data presented in Table S7.

In the PLS-DA analysis, the samples were classified according to the values of minimum inhibitory concentration capable of reducing at least 50% of the growth of *Fusarium verticillioides*. Thus, the lower the inhibitory concentration of bacterial extract, the greater the antifungal action. In this sense, the extracts obtained from bacteria of the genus *Bacillus* showed the best performance, emphasizing *B. velezensis* grown in a TSB medium.

In Figure 1, the 3D PLS-DA score plot represents 91.2% of the total variance explained by three latent variables (LV1 x LV2 x LV3), resulting in greater separation between groups of bacteria, especially between *Bacillus* species. For minimizing overfitting errors, cross-validation was applied using the leave-one-out cross-validation (LOOCV) model, in which cumulative values of  $R^2 = 0.98706$  and  $Q^2 = 0.92167$  indicated a four-component model as ideal (Figure S5). In general, the LV1 axis explains 72.4% of the observed variance, marking the grouping of *Bacillus* samples in negative values without overlap. At the same time, *P. aeruginosa* and *Paenibacillus* sp. species were arranged in positive values of LV1. Examining the LV2 axis (10.8%), one observes the separation of samples of *Bacillus* sp. (positive values), from the other species of *B. velezensis* (negative values).

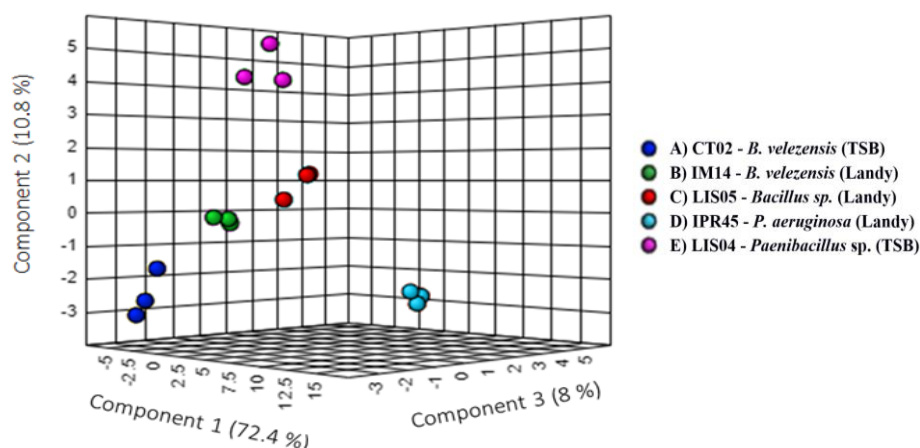
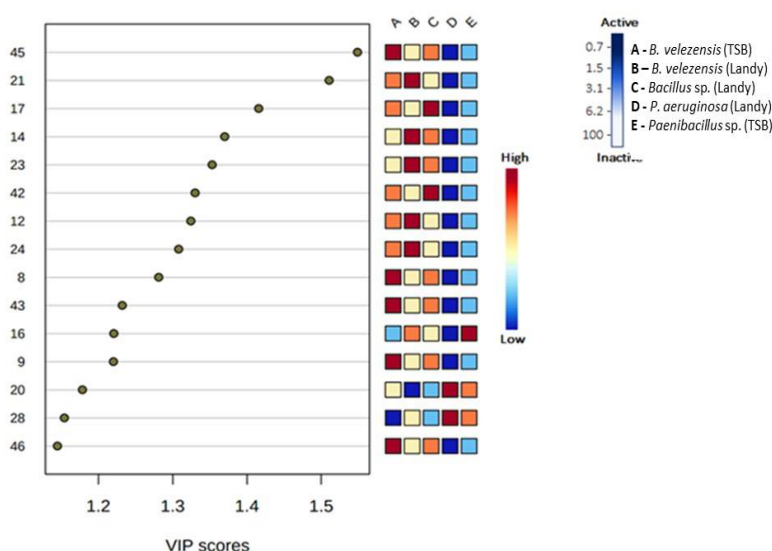


Figure 1. 3D PLS-DA scores. Discrimination was characterized by 72.4% for LV1, 10.8% for LV2, and 8% for LV3.

After constructing the PLS-DA model, it was possible to identify which compounds were most relevant for separating the samples, according to the minimum inhibitory concentration, employing the VIP analysis (Figure 2). Thus, it was possible to identify the 15 compounds (Table S8) that contributed the most to antifungal activity ( $VIP > 1.0$ ), 12 of which were more expressive in *Bacillus* extracts, including surfactin 45 ( $VIP = 1.5488$ ), whose intensity is higher in the extract of *B. velezensis*, cultivated in TSB medium. In general, surfactins (45, 42, 43, and 46) and fengycins (21, 17, 14, 23, 12, 24, 8, and 9) were mainly discriminated for the more significant antifungal potential of bacterial extracts of *Bacillus*. Figure S4 shows the boxplot plots for the 12 compounds identified in the *Bacillus* extracts.



**Figure 2.** VIP scores of discriminating compounds among bacterial extracts. The higher the VIP score, the better the ability to discriminate between groups. The mini heat map on the right illustrates the relative intensity of the compounds. The samples were classified in ascending order of the minimum inhibitory concentration value, with the lowest values considered more active (represented by the intense blue color on the activity scale). The most relevant compounds were surfactins (45, 42, 43, and 46) and fengycins (21, 17, 14, 23, 12, 24, 8, and 9)

### Analysis of the complete genome of antagonistic bacteria

The genes controlling the synthesis of eleven compounds directly or indirectly involved in antifungal and bacterial activity in plants were detected in the genomes of the three strains of *Bacillus velezensis* (CT02, IM14 and LIS05). The similarity analysis, using the Blastn program (GenBank), showed that the 61 genes involved in the synthesis of the different antifungal compounds presented variation in the nucleotide sequences, which varied from 74% to 100% of similarity with previously described genes (Table 2).

In *Paenibacillus ottowii*, eight genes are involved in the synthesis of fusaricidin, two genes are involved in the synthesis of polymyxin, nine genes are involved in the synthesis of volatile compounds, and seven enzymes with antifungal activities. These genes showed more than 87% similarity with gene sequences deposited in GenBank. Furthermore, genes for the synthesis of 2,3-butanediol, methanethiol, and isoprene (Table 3).

The genome analysis of *P. aeruginosa* IPR45 revealed the presence of seven genes for the phenazine biosynthetic pathway, 13 genes for the pyoverdinin pathway, and 8 genes for rhamnolipids. Other genes related to the synthesis of bioactive metabolites useful in biological control of fungi such as hydrogen cyanide (*hcnABC*), quinolone and salicylate (*pchA*) were found (Table 4).

Genes that encode enzymes related to biocontrol activity such as cellulase (LIS05, IM14 and CT02), glucanases and glycosyl hydrolases (LIS04) and chitinase (IPR45) were also found in the isolates genome, these enzymes degrade and lyse cell wall components of fungi affecting their growth and in some cases leading to cell death (Jadhav et al., 2017; Mabood et al., 2014).

**Tabela 2** - List of genes involved in the synthesis of bioactive metabolites found in the isolates genome of the genus *Bacillus* IM14, CT02 and LIS05

Gene	Metabolite	Function	Similarity (Genbank)			Reference Genbank
			CT02	IM14	LIS05	
<i>fenB</i>	Fengycin	Antifungal,	97.94	97.72	97.94	MT386612.1
<i>fenA</i>		ISR	92.61	92.61	92.61	AB973486.1
<i>fenC</i>			97.65	98.12	97.65	KU504270.1
<i>srfAA</i>	Surfactin	Antifungal,	98.12	98.24	98.12	CP040881
<i>srfAB</i>		ISR	98.02	97.98	98.02	CP040881
<i>srfAC</i>			97.86	97.86	97.86	CP040881
<i>srfAD</i>			99.18	99.18	99.18	CP040881
<i>ituD</i>	Iturin	Antifungal	96.51	96.67	96.51	KT781919.1



<i>ItuA</i>			98.11	97.53	98.11	KT781919.1
<i>ItuB</i>			96.76	96.79	96.76	KT781919.1
<i>ItuC</i>			97.18	97.13	97.18	KT781919.1
<i>ppsA</i>	Pliplastatin	Antifungal,	100.0	100.0	100.0	JQ073773.1
<i>ppsB</i>		Antibacterial	100.0	99.03	100.0	CP079719.1
<i>ppsC</i>			92.30	92.30	92.30	JQ073773.1
<i>ppsD</i>			86.36	72.07	86.36	JQ073773.1
<i>ppsE</i>			100.0	98.71	100.0	CP079719.1
<i>mycA</i>	Mycosubtilin	Antifungal,	81.20	80.96	81.20	AF184956.1
<i>mycB</i>		ISR	79.93	80.00	79.93	AF184956.1
<i>mycC</i>			80.89	80.75	80.89	AF184956.1
<i>bmyC</i>	Bacillomycin D	Antifungal,	89.00	88.85	89.00	JQ271536.1
<i>bmyB</i>		ISR	97.67	97.64	97.67	JQ271536.1
<i>bmyA</i>			97.09	98.21	97.09	JQ271536.1
<i>bmyD</i>			98.08	98.25	98.08	JQ271536.1
<i>bacA</i>	Bacilysin	Antifungal,	98.86	99.35	98.86	AF396778.1
<i>bacB</i>		Antibacterial	98.31	98.17	98.31	AF396778.1
<i>bacC</i>		ISR	98.42	98.95	98.42	AF396778.1
<i>bacD</i>			98.45	98.37	98.45	AF396778.1
<i>bacE</i>			99.32	99.15	99.32	AF396778.1
<i>pkS2A</i>	Macrolactin	Antifungal,	98.91	98.87	98.91	AJ634061.2
<i>pkS2B</i>		Antibacterial	99.17	99.24	99.17	AJ634061.2
<i>pkS2C</i>		ISR	99.05	99.14	99.05	AJ634061.2
<i>pkS2D</i>			99.06	99.17	99.06	AJ634061.2
<i>pkS2E</i>			99.10	98.87	99.10	AJ634061.2
<i>pkS2F</i>			98.82	98.77	98.82	AJ634061.2
<i>pkS2G</i>			98.99	98.66	98.99	AJ634061.2
<i>pkS2H</i>			98.83	99.06	98.83	AJ634061.2
<i>pkS2I</i>			99.64	99.46	99.64	AJ634061.2
<i>pdhA</i>			99.82	99.91	99.82	AJ634061.2
<i>FHJ82_09330</i>	Paenilarvins	Antifungal	96.00	95.95	96.00	CP040881.1
<i>FHJ82_09335</i>			97.13	97.16	72.32	CP040881.1
<i>FHJ82_09340</i>			97.18	98.34	97.18	CP040881.1
<i>FHJ82_09345</i>			98.08	98.42	98.08	CP040881.1
<i>baeB</i>	Bacillaene	Antibacterial	99.71	99.56	99.71	AJ634060.2
<i>baeC</i>		ISR	99.09	99.20	99.09	AJ634060.2
<i>baeD</i>			99.20	99.29	99.20	AJ634060.2
<i>baeE</i>			99.15	99.19	99.15	AJ634060.2
<i>baeI</i>			99.06	99.86	99.06	AJ634060.2
<i>baeG</i>			98.12	98.43	98.12	AJ634060.2
<i>baeH</i>			98.46	98.72	98.46	AJ634060.2
<i>baeL</i>			97.86	98.63	97.86	AJ634060.2
<i>baeJ</i>			98.61	98.65	98.61	AJ634060.2
<i>baeM</i>			98.46	98.93	98.46	AJ634060.2
<i>baeN</i>			98.89	98.71	98.89	AJ634060.2
<i>baeR</i>			98.27	98.51	98.27	AJ634060.2
<i>baeS</i>			98.87	99.03	98.87	AJ634060.2
<i>dhbF</i>	Bacillibactin	Siderophore	74.72	74.48	74.72	AL009126.3
<i>dhbB</i>			100.0	99.03	100.0	CP039297.1
<i>dhbE</i>			74.64	74.52	74.64	AL009126.3
<i>dhbA</i>			99.11	100.0	99.11	CP102511.1
<i>dhbC</i>			100.0	100.0	100.0	CP079719.1

<i>Eg</i>	Cellulase	Lytic enzymes	93.46	93.60	93.46	AB695293.1
-----------	-----------	---------------	-------	-------	-------	------------

**Tabela 3** - List of genes involved in the synthesis of bioactive metabolites found in the genome of *Paenibacillus* sp. LIS04

Gene	Metabólito	Função	Similaridade Genbank (%)	Referência Genbank
<i>fusE</i>	Fusaricidin	Antifungal	87.24	CP025957
<i>fusA</i>			88.88	CP025957
<i>fusB</i>			87.50	CP025957
<i>fusC</i>			88.08	CP025957
<i>fusD</i>			91.91	CP025957
<i>fusE</i>			91.91	CP025957
<i>fusF</i>			90.06	CP025957
<i>fusG</i>			89.23	CP025957
<i>pmxA</i>	Polymyxin	Antibacterial	87.95	FR727736.1
<i>pmxE</i>		Antifungal	92.00	FR727736.1
<i>mtnE</i>	Methanethiol	ISR	95.17	CP025957
<i>mmuM</i>	Methanethiol		93.90	CP025957
<i>metE</i>	Methanethiol		91.28	CP025957
<i>metH</i>	Methanethiol		93.98	CP025957
<i>LytB</i>	Isoprene	ISR	94.78	CP025957
<i>gcpE</i>	Isoprene		94.01	CP025957
<i>ispE</i>	Isoprene		94.03	CP025957
<i>ispF</i>	Isoprene		93.08	CP025957
<i>alsD</i>	2,3- Butanediol		92.90	CP025957
<i>CIA50_2532</i>	beta- glucanase		Lytic enzymes	85.15
<i>CIA50_3796</i>	1,4-beta-glucanase	92.63		CP025957
<i>CIA50_3836</i>	endo-1,3-beta-glucanase	91.41		CP025957
<i>CIA50_1100</i>	exoglucanase A	94.42		CP025957
<i>CIA50_0229</i>	glycosyl hydrolase	93.11		CP025957
<i>CIA50_0827</i>	glycosyl hydrolase	91.17		CP025957
<i>CIA50_0421</i>	glycosyl hydrolase	93.26		CP025957

**Tabela 4** - List of genes involved in the synthesis of bioactive metabolites found in the genome of *Pseudomonas aeruginosa* IPR45

Gene	Metabólito	Atividade	Similaridade Genbank (%)	Referência Genbank
<i>hcnA</i>	Hydrogen cyanide HCN	Antifungal	99.04	CP007224.1
<i>hcnB</i>			98.92	CP007224.1
<i>hcnC</i>			97.61	CP007224.1
<i>phzM</i>	Phenazine	Antifungal	99.90	CP007224.1
<i>phzA</i>		Antibacterial		
<i>phzB</i>		ISR		
<i>phzD</i>		100.0		
<i>phzE</i>		98.16		
<i>phzF</i>		99.76		
<i>phzG</i>		99.69		
<i>phzS</i>		99.22		
		98.59	CP007224.1	

<i>pchA</i>	Salicylate	ISR	98.81	CP007224.1
<i>pvdA</i>	Pyoverdin	Siderophore	82.90	CP053028.1
<i>pvdE</i>			73.00	CP053028.1
<i>pvdH</i>			99.43	CP007224.1
<i>pvdL</i>			99.40	CP007224.1
<i>pvdG</i>			99.37	CP007224.1
<i>pvdS</i>			100.0	CP007224.1
<i>pvdJ</i>			85.17	CP053028.1
<i>pvdO</i>			98.36	CP007224.1
<i>pvdN</i>			99.68	CP007224.1
<i>pvdM</i>			93.56	CP007224.1
<i>pvdP</i>			84.88	CP053028.1
<i>pvdI</i>			97.52	CP053028.1
<i>pvdQ</i>	99.51	CP007224.1		
<i>RhlB</i>	Rhamnolipids	Antifungal	99.66	CP007224.1
<i>RhlB</i>			99.61	CP007224.1
<i>RhlE</i>			99.32	CP000438.1
<i>RhlA</i>			99.77	CP007224.1
<i>RhlI</i>			99.83	CP007224.1
<i>rhlG</i>			98.96	CP007224.1
<i>rhlC</i>			99.28	CP007224.1
<i>rhlR</i>			99.86	CP007224.1
<i>pqsE</i>			Quinolone	Antifungal
<i>nagA</i>	Chitinase	Lytic enzyme	99.93	CP058332.1

## Discussion

The growing search for sustainable agriculture, with a reduction in the use of pesticides, has driven the interest in discovering beneficial microorganisms with multiple functions that can contribute to the health and growth of plants.

In this study, we tested two *Bacillus* sp. (CT02 and IM14) and *Pseudomonas aeruginosa* IPR45 previously isolated from maize, that inhibited the growth of *F. verticillioides* in 62.5%, 58.5%, and 61.5% , respectively (Diniz et al., 2022) and two new sorghum isolates, identified by sequencing the 16S rRNA gene as *Bacillus* sp. and *Paenibacillus* sp.

First, the isolates were evaluated for antagonistic activity against *Fusarium verticillioides*. In the *in vitro* confrontation tests in solid media (PDA), the isolates strongly inhibited the growth of *F. verticillioides*, indicating their potential role as biocontrol agents. Next, the isolates were tested with different media formulations to establish the best medium for metabolite production (Slininger & Shea-Wilbur, 1995; Slininger et al., 1995; 1996). The crude bacterial extracts showed variable inhibition effects on the growth of *F.*

*verticillioides*. *Bacillus* sp. (CT02 and IM14) produced the extracts with the highest antifungal activity in TSB and Landy media. This result confirmed the findings of several authors who demonstrated that the medium formulation could increase or suppress the bacterial production of bioactive compounds (Slininger & Shea-Wilbur, 1995; Slininger et al., 1995; 1996; Borowicz & Omer, 2000; Peighami-Ashnaei et al., 2009; Kilani-Feki et al., 2016; Sun et al., 2019; Khan et al., 2020). Similar results on the culture medium effect in bacterial bioactive compound production were described by Sun et al. (2019). These authors obtained the maximum production of two potent antifungal substances (iturin and surfactin) using Landy culture medium and potato dextrose broth (PDB), respectively. However, Sarwar et al. (2018) and Kilani-Feki et al. (2016) reported that crude extracts of *Bacillus* species grown in LB and M13 media also effectively augment the production of antifungal molecules against different fungal pathogens. In our study, the crude extract of the three *Bacillus* grown in the TSB and Landy medium was more effective for inducing higher antifungal activity against *F. verticillioides*.

Identifying the bacterial molecules with antifungal activity is an essential step for determining the potential role of each molecule isolated. The isolation of molecules enables studies to evaluate, individually, their antagonistic potential. This strategy is also crucial, as it allows the identification of genes and metabolic pathways involved in their synthesis, which is a crucial step for metabolic pathway engineering. Furthermore, identifying bioactive molecules enables chemical synthesis for the commercial development of biofungicides. Different approaches, including gas chromatography-mass and mass spectrometry techniques, metagenome, and genome-mining, can allow the identification of bioactive molecules. In addition, these approaches increase the probability of finding new bioactive molecules. In the present study, the samples of the five isolates were submitted to the UPLC-MS method for identifying the primary molecules involved in the antifungal activity as widely described in the literature (Beatty & Jensen, 2002; Tendulkar et al., 2007; Passera et al., 2017; Sass et al., 2020; Xiong et al., 2022). Two *Bacillus* isolates (LIS05 and IM14) secreted fengycin A and B, surfactin, and iturin in the culture medium. In contrast, *Bacillus* isolate CT02 secreted fengycin and surfactin but not iturin. The isolate LIS04 of *Paenibacillus* sp. produced polymyxin B and isoleucinpolymyxin B. Finally, the isolate of *Pseudomonas aeruginosa* secreted isomers of quinolone and Rhamnolipids. The chemometric analysis showed that the extracts obtained from bacteria of the genus *Bacillus* showed the best performance according to the values of minimum inhibitory concentration reduced, at least, 50% of the growth of

*Fusarium verticillioides*. However, the present results of HPLC-MS are incomplete since a myriad of other bacterial compounds, like extracellular lytic enzymes, siderophores, salicylic acid, antibiotics, nitric oxide dioxygenase, and volatile organic compounds (VOCs), such as hydrogen cyanide also exert antifungal activity (Manwar et al., 2004; Petatán-Sagahón et al., 2011; Diniz et al., 2022; Soliman et al., 2022).

Thus, bacterial antifungal activity may result from different molecules acting synergistically. Also, It is important to emphasize that only a fraction of the biosynthetic capabilities suggested by genomic analyses have been observed under laboratory conditions because the expression of many, perhaps even most biosynthetic pathways, depends strongly on environmental conditions. To clarify this possibility, we performed whole-genome sequencing of the five isolates.

The genome analysis of the three *Bacillus* isolates demonstrated that they belong to the *Bacillus velezensis* species of the *Bacillus amyloliquefaciens* group, composed of *B. amyloliquefaciens*, *B. velezensis*, *B. nakamurai*, and *B. siamensis*. Lipopeptides are among the most effective antifungal agent in many *Bacillus* species. The three types of lipopeptides, Surfactin, Iturin, and Fengycin, are produced by various bacterial species (Meena & Kanwar, 2015). The iturinic lipopeptide is a multigene family encompassing mycosubtilin, bacillomycin (L, D, and F), and mojavensin A. The genomic analysis of the three isolates confirmed the presence of the various genes involved in lipopeptide synthesis and other genes with antifungal activity. However, the iturin lipopeptide was not detected by UPLC-MS isolate CT02. However, the DNA sequence analysis demonstrated that the ORFs of the four genes of the iturin cluster were intact. It is important to emphasize that while the two iturin-producing isolates were cultured in the Landy medium, the isolate CT02, which did not produce iturin, was cultured in the TSB medium. Only a fraction of the biosynthetic capabilities suggested by genomic analysis has been observed under laboratory conditions because the expression of many, perhaps even most biosynthetic pathways, depends strongly on environmental conditions. Thus, it is reasonable to assume that the biosynthetic pathways of iturin depend strongly on environmental conditions.

In this work, relevant results on bacteria isolated from plants aiming the control of the primary phytopathogens, *Fusarium verticillioides*, and opening new perspectives for the chemical synthesis using the molecules isolated from these microorganisms for developing synthetic fungicides.

## REFERENCES

ABDELKHALEK, A.; AL-ASKAR, A.A.; BEHIRY, S.I. 2020. *Bacillus licheniformis* strain POT1 mediated polyphenol biosynthetic pathways genes activation and systemic resistance in potato plants against Alfalfa mosaic virus. *Sci Rep.* 10, 16120. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72676-2>.

ADETUNJI, C. O.; KUMAR, D.; RAINA, M.; AROGUNDADE, O.; SARIN, N. B. 2019. Endophytic Microorganisms as Biological Control Agents for Plant Pathogens: A Panacea for Sustainable Agriculture. *Plant Biotic Interaction.* Pp. 1-20. [http://doi.org/10.1007/978-3-030-26657-8\\_1](http://doi.org/10.1007/978-3-030-26657-8_1).

ARMENGOL, E.S.; HARMANCI, M.; LAFFLEUR, F. 2021. Current strategies to determine antifungal and antimicrobial activity of natural compounds. *Microbiological Research*, 252, 126867. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126867>.

ASARI, S.; MATZÉN, S.; PETERSEN, M. A.; BEJAI, S.; MEIJER, J. 2016. Multiple effects of *Bacillus amyloliquefaciens* volatile compounds: plant growth promotion and growth inhibition of phytopathogens. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 92, No. 6.

BARROSO, V. M.; ROCHA, L. O.; REIS, T. A.; REIS, G. M.; DUARTE, A. P.; MICHELOTTO, M. D.; CORREA, B. 2017. *Fusarium verticillioides* and fumonisin contamination in Bt and non-Bt maize cultivated in Brazil. *Mycotoxin Res.*, v, 33, p. 121-127. <https://doi.org/10.1007/s12550-017-0271-4>.

BEATTY, P.H.; JENSEN, S.E. 2002. *Paenibacillus polymyxa* produces fusaricidin-type antifungal antibiotics active against *Leptosphaeria maculans*, the causative agent of blackleg disease of canola. *Can J Microbiol.* 48(2): 159-169. <http://doi.org/10.1139/w02-002>.

BHATTACHARYYA, P. N.; JHA, D. K. 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 28, p. 1327-1350.

BOROWICZ, J.; SAAD OMER, Z. 2000. Influence of rhizobacterial culture media on plant growth and on inhibition of fungal pathogens. *BioControl* 45, 355-371.

BORRÀS-VALLVERDÚ, B.; RAMOS, A.J.; CANTERO-MARTÍNEZ, C.; MARÍN, S.; SANCHIS, V.; FERNÁNDEZ-ORTEGA, J. 2022. Influence of agronomic factors on mycotoxin contamination in maize and changes during a 10-Day harvest-till-drying simulation period: A different perspective. *Toxins*, 14, 620. <https://doi.org/10.3390/toxins14090620>.

BRAUER, V.S.; REZENDE, C.P.; PESSONI, A.M.; DE PAULA, R.G.; RANGAPPA, K.S.; NAYAKA, S.C.; GUPTA, V.K.; ALMEIDA, F. 2019. Antifungal agents in agriculture: Friends and foes of public health. *Biomolecules* vol. 9, 521. <http://doi.org/10.3390/biom9100521>.

CHONG, J.; SOUFAN, O.; LI, C.; CARAUS, I.; LI, S.; BOURQUE, G.; WISHART, D. S.; XIA, J. 2018. Using MetaboAnalyst 4.0 for comprehensive and integrative metabolomics data analysis. *Nucleic Acids Res.*, 46, 128.

CHUNG, S.; KONG, H.; BUYER, J. S.; LAKSHMAN, D. K.; LYDON, J.; KIM, S. D.; ROBERTS, D. P. 2008. Isolation and partial characterization of *Bacillus subtilis* ME488 for suppression of soil borne pathogens of cucumber and pepper. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 80, p. 115-123.

CLSI - CLINICAL and Laboratory Standards Institute. 2002. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica de Fungos Filamentosos; Norma Aprovada. Documento M38-A do NCCLS [ISBN 1-56238-470-8]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos

CONAB- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. 2010. Acompanhamento da safra brasileira de grãos: Safra 2020/21: Primeiro levantamento: outubro 2020. Brasília.p.1-77. Disponível em: <<https://www.https://www.conab.gov.br/index.php/info-agro/safra/gaos/boletim-da-safra-de-graos>>Aceso em: out. 2020.

CZARNECKA, D.; CZUBACKA, A.; AGACKA-MOŁDOCH, M.; TROJAK-GOLUCH, A.; KSIĘŻAK, J. 2022. The Occurrence of Fungal Diseases in Maize in Organic Farming Versus an Integrated Management System. *Agronomy* 2022, 12, 558. <https://doi.org/10.3390/agronomy12030558>

DARLING, A.C.; MAU, B.; BLATTNER, F.R.; PERNA, N.T. 2004. Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. *Genome Res.* 14(7):1394-403.

DINIZ, G.F.D., COTA, L.V., FIGUEIREDO, J.E.F., AGUIAR, F.M., SILVA, D.D., LANA, U.G.P., SANTOS, V.L., MARRIEL, I.E. and OLIVEIRA-PAIVA, C.A., 2021. Antifungal activity of bacterial strains from maize silks against *Fusarium verticillioides*. *Archives of Microbiology*, vol. 204, no. 1, pp. 89. <http://dx.doi.org/10.1007/s00203-021-02726-4>. doi.org/10.1007/s00203-021-02726-4

DINIZ, G.F.D.; FIGUEIREDO, J.E.F.; DE PAULA LANA, U.G.; MARINS, M.S.; DA SILVA, D.D.; COTA, L.V.; MARRIEL, I.E.; DE OLIVEIRA-PAIVA. 2022. Microorganisms from corn stigma with biocontrol potential of *Fusarium verticillioides*. *Brazilian Journal of Biology*;82:e262567. DOI: 10.1590/1519-6984.262567. PMID: 36043660. Brazilian

EDWARDS, S.G.; GODLEY, NP. 2010. Reduction of *Fusarium* head blight and deoxynivalenol in wheat with early fungicide applications of prothioconazole. *Food Additives & Contaminants: Part A.* 27(5): 629-635. <https://doi.org/10.1080/19440040903515942>.

FISHER, M.C.; HAWKINS, N.J.; SANGLARD, D.; GURR, S.J. 2018. Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. *Science*, 360, 739-742. <http://doi.org/10.1126/science.aap7999>.

- FU, Y.; LUO, J.; QIN, J.; YANG, M. 2019. Screening techniques for the identification of bioactive compounds in natural products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 168: 189-200. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.02.027>.
- GOMES, A.A.M.; DE MELO, M.P.; TESSMANN, D.J.; LIMA, C.S. 2020. Sexual reproduction parameters in *Fusarium verticillioides* populations from maize in Brazil. *European Journal of Plant Pathology*, vol. 156, no. 1, pp. 317-323. <http://dx.doi.org/10.1007/s10658-019-01881-1>.
- GONG, Z.; PENG, Y.; ZHANG, Y.; SONG, G.; CHEN, W.; JIA, S.; WANG, Q. 2015. Construction and optimization of *Escherichia coli* for producing rhamnolipid biosurfactant. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*. 31(7): 1050-1062.
- ISLAM, M.N.; BANIK, M.; SUR, S.; TUCKER, J.R.; WANG, X. 2022. Implications of Crop Rotation and Fungicide on *Fusarium* and Mycotoxin Spectra in Manitoba Barley, 2017-2019. *Toxins (Basel)*. 2022;14(7):463. <http://doi.org/10.3390/toxins14070463>.
- JAIN, A.; SARSAIYA, S.; WU, Q.; LU, Y.; SHI, J. 2019. A review of plant leaf fungal diseases and its environment speciation. *Bioengineered*. 10(1): 409-424. <http://doi.org/10.1080/21655979.2019.1649520>.
- KHAN, R. A. A.; NAJEEB, S.; MAO, Z.; LING, J.; YANG, Y.; LI, Y.; XIE, B. 2020. Bioactive Secondary Metabolites from *Trichoderma* spp. against Phytopathogenic Bacteria and Root-Knot Nematode. *Microorganisms*, 8, 401. <doi.org/10.3390/microorganisms8030401>.
- KILANI-FEKI, O.; KHEDHER, S.B.; DAMMAK, M.; KAMOUN, A.; JABNOUN-KHIAREDDINE, H.; DAAMI-REMADI, M.; TOUNSI S. 2016. Improvement of antifungal metabolites production by *Bacillus subtilis* V26 for biocontrol of tomato postharvest disease. *Biol Control*;95:73–82. doi: 10.1016/j.biocontrol.2016.01.005
- KIM, Y.T.; PARK, B.K.; KIM, S.E.; LEE, W.J.; MOON, J.S.; CHO, M.S.; PARK, H.Y.; HWANG, I.; KIM, S.U. 2017. Organization and characterization of genetic regions in *Bacillus subtilis* subsp. *krietiensis* ATCC55079 associated with the biosynthesis of iturin and surfactin compounds. *PLoS One*. 12(12): e0188179. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0188179>.
- KUMAR, D. AND KALITA, P. 2017. Reducing Postharvest Losses during Storage of Grain Crops to Strengthen Food Security in Developing Countries. *Foods*, 6, Article No. 7. <https://doi.org/10.3390/foods6010008>
- LI, J.; SUN, W.; SAALIM, M.; WEI, G.; ZALETA-PINET, D.A.; CLARK, B.R. 2020. Isolation of 2-Alkyl-4-quinolones with Unusual Side Chains from a Chinese *Pseudomonas aeruginosa* Isolate. *Journal of Natural Products*, v. 83(7), p. 2294-2298.
- MANWAR, A.V.; KHANDELWAL, S.R.; CHAUDHARI, B.L.; MEYER, J.M.; CHINCHOLKAR, S.B. 2004. Siderophore production by a marine *Pseudomonas*



*aeruginosa* and its antagonistic action against phytopathogenic fungi. *Appl Biochem Biotechnol.* 118: 243-251. <http://doi.org/10.1385/abab:118:1-3:243>.

MARIN, S.; RAMOS, A.J.; CANO-SANCHO, G.; SANCHIS V. 2013. Mycotoxins: occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food Chem Toxicol.* Oct;60:218-37. doi: 10.1016/j.fct.2013.07.047. Epub 2013 Jul 29. PMID: 23907020.

MEENA, K.R.; KANWAR, S.S. 2015. Lipopeptides as the antifungal and antibacterial agents: applications in food safety and therapeutics. *Biomed Res Int.* 2015: 473050. <http://doi.org/10.1155/2015/473050>.

MEIER-KOLTHOFF, J.P.; GÖKER, M. 2019. TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy. *Nat Commun* 10, 2182. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10210-3>

MÜLNER, P.; SCHWARZ, E.; DIETEL, K.; HERFORT, S.; JÄHNE, J.; LASCH, P.; CERNAVA, T.; BERG, G.; VATER, J. 2021. Fusaricidins, Polymyxins and Volatiles Produced by *PaeniBacillus polymyxa* Strains DSM 32871 and M1. *Pathogens*, 10, 1485. <https://doi.org/10.3390/pathogens10111485>

MURILLO-WILLIAMS AND MUNKVOLD, G.P. (2008). Systemic infection by *Fusarium verticillioides* in maize plants grown under three temperature regimes. *Plant Disease*, 92(12): 1695-1700. <http://doi.org/10.1094/PDIS-92-12-1695>.

NOORI, F.; ETESAMI, H.; NOORI, S.; FOROUZAN, E.; JOUZANI, G. S.; MOHAMMAD M.A. 2021. Whole genome sequence of *Pantoea agglomerans* ANP8, a salinity and drought stress-resistant bacterium isolated from alfalfa (*Medicago sativa* L.) root nodules, *Biotechnology Reports*, Volume 29. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00600>.

O'BRIEN, P. A. 2017. Biological control of plant diseases. *Australasian Plant Pathology*. 46. DOI 10.1007/s13313-017-0481-4.

LOWE, O. M.; OLAWUYI, O. J.; SOBOWALE, A. A.; ODEBODE, A. C. 2018. Role of arbuscular mycorrhizal fungi as biocontrol agents against *Fusarium verticillioides* causing ear rot of *Zea mays* L. (Maize). *Current Plant Biology*, v. 15, p. 30-37. <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2018.11.005>.

ONGENA, M.; JACQUES, P. 2008. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology*, v.16, p. 115-125.

PADDA, K. P.; PURI, A.; CHANWAY, C. P. 2017. *PaeniBacillus polymyxa*: A Prominent Biofertilizer and Biocontrol Agent for Sustainable Agriculture. *Agriculturally Important Microbes for Sustainable Agriculture*, v. 2, p. 165-191.

PASSERA, A.; VENTURINI, G.; BATTELLI, G.; CASATI, P.; PENACA, F.; QUAGLINO, F.; BIANCO, P.A. 2017. Competition assays revealed *Paenibacillus pasadenensis* strain R16 as a novel antifungal agent. *Microbiological Research*. vol. 98: 16-26. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.02.001>.

- PEIGHAMI-ASHNAEI, S.; SHARIFI-TEHRANI, A.; AHMADZADEH, M.; BEHBOUDI, K. 2009. Interaction of different media on production and biocontrol efficacy of *Pseudomonas fluorescens* P-35 and *Bacillus subtilis* B-3 against grey mould of apple. *Journal of Plant Pathology*, 91(1), 65-70. <http://www.jstor.org/stable/41998575>.
- PÉREZ, M.A.; T.; CASTILLO, F.D.H.; VALDÉZ, R.A.; ALCALÁ, E.I.L. 2018. Antifungal activity of metabolites from *Bacillus* spp. against *Fusarium oxysporum* using micro dilution in plate method. *European Journal of Biotechnology and Genetic Engineering*, Vol. 5 No. 1
- PERINCHERRY, L.; LALAK-KAŃCZUGOWSKA, J.; STĘPIEŃ Ł. 2019. *Fusarium*-Produced Mycotoxins in Plant-Pathogen Interactions. *Toxins (Basel)*. 14; 11(11): 664. <http://doi.org/10.3390/toxins11110664>.
- PERLIN, D.S.; RAUTEMAA-RICHARDSON, R.; ALASTRUEY-IZQUIERDO, A. 2017. The global problem of antifungal resistance: Prevalence, mechanisms, and management. *Lancet Infect. Dis.*, 17, e383-e392. [http://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30316-X](http://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30316-X).
- PETATÁN-SAGAHÓN, I.; ANDUCHO-REYES, M.A.; SILVA-ROJAS, H.V.; ARANA-CUENCA, A.; TELLEZ-JURADO, A.; CÁRDENAS-ÁLVAREZ, I.O.; MERCADO-FLORES, Y. 2011. Isolation of bacteria with antifungal activity against the phytopathogenic fungi *Stenocarpella maydis* and *Stenocarpella macrospora*. *Int J Mol Sci*. 12(9): 5522-5537. <http://doi.org/10.3390/ijms12095522>.
- PLIEGO, CF.; RAMOS, C.; VICENTE, A.; CAZORLA, FM. 2011. Screening for candidate bacterial biocontrol agents against soilborne fungal plant pathogens. *Plant Soil*, 340: 505-520. <http://doi.org/10.1007/s11104-010-0615-8>.
- RADZKI, W.; MANERO, F. G.; ALGAR, E.; GARCIA, J. L.; GARCIA, V. A.; SOLANO, B. R. 2013. Bacterial siderophores efficiently provide iron to iron-starved tomato plants in hydroponics culture. *Antonie Van Leeuwenhoek*, Amsterdam, v. 104, p. 321-330
- RAHMAN, S. F. S. AB.; SINGH, E.; PIETERSE, C. M. J.; SCHENK, P. M. 2018. Emerging microbial biocontrol strategies for Plant Pathogens. *Plant Sci.*, v. 267, p. 102-111.
- SAHARAN, B. S.; NEHRA, V. 2011. Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. *Life Sciences and Medicine Research*, v. 21, p. 1-30.
- SARANGI, T. AND RAMAKRISHNAN, S. 2016. Influence of Biomolecules of *Bacillus* spp. against Phytopathogens: A Review. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, v. 5(7), p. 131-134.
- SARWAR, A.; BRADER, G.; CORRETTO, E.; ALETI, G.; ABAIDULLAH, M.; SESSITSCH, A.; HAFEEZ, F. 2018. Qualitative analysis of biosurfactants from *Bacillus* species exhibiting antifungal activity. *PLoS ONE*, 13(6): e0198107.

SASS, G.; NAZIK, H.; CHATTERJEE, P.; STEVENS, D.A. 2021. Under nonlimiting iron conditions pyocyanin is a major antifungal molecule, and differences between prototypic *Pseudomonas aeruginosa* strains, *Medical Mycology*, v 59(5): 453-464. <https://doi.org/10.1093/mmy/myaa066>

SAVARY, S.; FICKE, A.; AUBERTOT, JN.; HOLLIER, C. ET AL. 2012. Crop losses due to diseases and their implications for global food production losses and food security. *Food Sec.* 4, 519–537. <https://doi.org/10.1007/s12571-012-0200-5>.

SEEMANN, T. 2014. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, 30, 2068-2069. doi: 10.1093/bioinformatics/btu153.

SLININGER, P. J.; SHEA-WILBUR, M. A. 1995. Liquid culture pH, temperature carbon and nitrogen source regulate phenazine productivity of the take all biocontrol agent *Pseudomonas fluorescence*. *Appl. Microbial. Biotechnol.* 37:388–392. doi: 10.1007/BF00210998.

SLININGER, P. J.; VAN CAUWENBERGE, J. E.; BOTHAST, R. J.; WELLER, D. M.; THOMASHOW, L. S.; COOK, R. J. 1996. Effect of growth culture physiological state, metabolites and formulation on the viability, phytotoxicity and efficacy of the take-all biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* 2-79 stored encapsulated on wheat seeds. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45: 391–398.

SOLIMAN, S.A.; KHALEIL, M.M.; METWALLY, R.A. 2022. Evaluation of the antifungal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* and *B. velezensis* and characterization of the bioactive secondary metabolites produced against plant pathogenic fungi. *Biology*, 11, 1390. <https://doi.org/10.3390/biology11101390>.

SOUSA, R.R.; OSÓRIO, P.R.A.; PINTO, NOSÉ, N.; ARRUDA, G.L.; FERREIRA, T.P.S.; HAESBAERT, F.M.; SANTOS, G.R. 2022. Detection and transmission of *Fusarium verticillioides* in corn seeds according to the plant stage. *Acta Scientiarum. Agronomy*, v. 44, e53213. <http://doi.org/10.4025/actasciagron.v44i1.53213>.

TARIQ, M.; KHAN, A.; ASIF, M.; KHAN, F.; ANSARI, T.; SHARIQ, M.; SIDDIQUI, M. A. 2020. Biological control: a sustainable and practical approach for plant disease management, *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B. Soil & Plant Science*, 70:6, 507-524. <https://doi.org/10.1080/09064710.2020.1784262>.

TENDULKAR, S.R.; SAIKUMARI, Y.K.; PATEL, V.; RAGHOTAMA, S.; MUNSHI, T.K.; BALARAM, P.; CHATTOO1, B.B. 2007. Isolation, purification and characterization of an antifungal molecule produced by *Bacillus licheniformis* BC98, and its effect on phytopathogen *Magnaporthe grisea*. *Journal of Applied Microbiology* 103 (2007) 2331–2339. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03501.x>.

TSUGAWA H, CAJKA T, KIND T, MA Y, HIGGINS B, IKEDA K, KANAZAWA M, VANDERGHEYNST J, FIEHN O, ARITA M. 2015. MS-DIAL: data-independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis. *Nat Methods*. Jun;12(6):523-6. doi: 10.1038/nmeth.3393. Epub 2015 May 4. PMID: 25938372; PMCID: PMC4449330

VAN LENTEREN, J. C.; BOLCKMANS, K.; KÖHL, J.; RAVENSBERG, W. J.; URBANEJA, A. 2018. Biological control using invertebrates and microorganisms: plenty of new opportunities. *BioControl* 63, 39-59, 2018. <http://doi.org/10.1007/s10526-017-9801-4>.

VATSA P.; SANCHEZ, L.; CLEMENT, C.; BAILLIEUL, F.; DOREY, S. 2010. Rhamnolipid biosurfactants as new players in animal and plant defense against microbes. *Int J Mol Sci*, v. 11(12), p. 5095-5108.

VEJAN, P.; ABDULLAH, R.; KHADIRAN, T.; ISMAIL, S.; BOYCE A. N. 2016. Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability - a review. *Molecules* 21:573. <http://doi.org/10.3390/molecules21050573>.

VERWEIJ, P.E.; SNELDERS, E.; KEMA, G.H.; MELLADO, E.; MELCHERS, W.J. 2009. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: A side-effect of environmental fungicide use? *Lancet Infect. Dis.* 2009, 9, 789-795. [http://doi.org/10.1016/S1473-3099\(09\)70265-8](http://doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70265-8).

XIONG, Z.R.; COBO, M; WHITTAL, R.M.; SNYDER, A.B.; WOROBO, R.W. 2022. Purification and characterization of antifungal lipopeptide produced by *Bacillus velezensis* isolated from raw honey. *PLOS ONE*. 17(4): e0266470. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0266470>.

## Supplementary Material

**Table S1** - Percentage of inhibition of *Fusarium verticillioides* by different concentrations of crude extracts of bacterial isolates in TSB, PDB, LB+G and Landy medium.

Medium	Bacteria	Different concentrations of crude extracts								
		0,3%	0,7%	1,5%	3,1%	6,2%	12,5%	25%	50%	100%
<b>TSB</b>	LIS04	4,1	4,1	4,3	4,3	4,3	5,1	6,4	15,0	53,9
	LIS05	21,2	35,1	39,5	42,0	43,6	46,6	47,0	50,6	76,8
	CT02	45,3	53,1	53,3	55,4	58,9	60,5	61,4	61,8	84,6
	IM14	27,8	41,4	49,8	51,2	54,3	56,9	57,0	61,0	85,5
	IPR45	10,7	12,7	19,3	21,2	31,1	46,1	74,4	94,0	94,1
<b>PDB</b>	LIS04	2,3	2,6	2,6	5,0	9,2	17,6	28,7	48,9	60,0
	LIS05	13,9	18,6	30,6	38,0	41,9	47,4	62,2	64,5	75,7
	CT02	1,0	5,3	10,0	11,7	22,2	33,5	49,0	55,6	81,0
	IM14	0,0	4,6	14,1	21,5	30,7	40,1	43,8	81,7	97,4
	IPR45	3,7	8,1	12,8	19,7	22,6	25,2	31,5	43,3	51,3
<b>LB+G</b>	LIS04	6,2	6,9	8,1	9,4	9,7	11,1	11,3	26,9	62,5
	LIS05	26,6	27,8	36,8	37,3	43,0	43,4	48,4	57,7	63,4
	CT02	14,5	24,0	24,2	25,5	26,3	27,9	39,9	58,6	65,3
	IM14	15,4	17,9	19,4	23,0	23,3	23,3	45,6	63,1	71,5
	IPR45	12,3	13,0	13,7	14,2	23,4	38,7	56,5	83,9	98,4
<b>Landy</b>	LIS04	8,4	9,8	11,2	11,6	11,6	19,9	33,6	44,9	76,1
	LIS05	38,2	44,7	49,9	52,7	59,1	60,4	66,4	98,7	100,0
	CT02	35,5	44,8	50,9	55,7	61,3	67,7	70,2	80,5	96,7
	IM14	36,3	43,5	51,1	57,8	60,6	64,5	76,5	100,0	100,0
	IPR45	22,4	24,0	24,4	39,0	52,9	59,2	73,8	87,0	87,0

LIS04: *Paenibacillus* sp.; LIS05: *Bacillus* sp.; IM14 e CT02: *Bacillus velezensis*; IPR45: *Pseudomonas aeruginosa*. TSB = Trypticase Soy Broth, PDB = Potato Dextrose Broth, LB+G = Luria-Bertani (LB) with glucose

**Tabela S2** - Chemical identification of lipopeptides from *Bacillus velezensis* IM14 in Landy medium by UPLC-qTOF-MS. Identified classes: iturins, fengycins and surfactins

Nº peak	(min)	Compounds	Molecular fórmula	ion <i>m/z</i>	Erro (ppm)	Fragment ions <i>m/z</i>	References
1	12,44	Iturin A2	C <sub>48</sub> H <sub>74</sub> N <sub>12</sub> O <sub>14</sub>	1043,5535	0,4	299, 801, 915	YE et al., 2012
2	13,25	Iturin A3–A5	C <sub>49</sub> H <sub>76</sub> N <sub>12</sub> O <sub>14</sub>	1057,5995	1.2	-	SOUZA et al., 2018
3	13,61	C <sub>14</sub> Fengycin A	C <sub>70</sub> H <sub>107</sub> N <sub>12</sub> O <sub>20</sub>	718,3786[M+2H] <sup>+</sup>	1,4	966, 1080	Villegas-Escobar et al., 2018; SOUZA et al., 2018
4	14,06	C <sub>15</sub> Fengycin A	C <sub>71</sub> H <sub>108</sub> N <sub>12</sub> O <sub>20</sub>	725,3978[M+2H] <sup>+</sup>	-1.1	966, 1080	Villegas-Escobar et al., 2018; SOUZA et al., 2018
5	14,33	C <sub>15</sub> fengycin A	C <sub>71</sub> H <sub>108</sub> N <sub>12</sub> O <sub>20</sub>	725,3876[M+2H] <sup>+</sup>	0,7	966, 1080	Villegas-Escobar et al., 2018; SOUZA et al., 2018
6	14,47	C <sub>15</sub> fengycin A	C <sub>71</sub> H <sub>108</sub> N <sub>12</sub> O <sub>20</sub>	725,3871[M+2H] <sup>+</sup>	0,6	966, 1080	Villegas-Escobar et al., 2018; SOUZA et al., 2018
7	14,68	C <sub>16</sub> Fengycin A	C <sub>73</sub> H <sub>112</sub> N <sub>12</sub> O <sub>20</sub>	732,3933[M+2H] <sup>+</sup>	0,4	966, 1080	Villegas-Escobar et al., 2018; SOUZA et al., 2018
8	14,81	C <sub>16</sub> fengycin A	C <sub>73</sub> H <sub>112</sub> N <sub>12</sub> O <sub>20</sub>	732,3951[M+2H] <sup>+</sup>	0,9	966, 1080	Villegas-Escobar et al., 2018; SOUZA et al., 2018
9	15,04	C <sub>17</sub> Fengycin A	C <sub>72</sub> H <sub>110</sub> N <sub>12</sub> O <sub>20</sub>	739,3989[M+2H] <sup>+</sup>	1,8	966, 1080	Villegas-Escobar et al., 2018; SOUZA et al., 2018
10	15,11	C <sub>16</sub> Fengycin B	C <sub>74</sub> H <sub>114</sub> N <sub>12</sub> O <sub>20</sub>	746,4099[M+2H] <sup>+</sup>	0,2	994, 1108	Villegas-Escobar et al., 2018; SOUZA et al., 2018
11	15,26	C <sub>16</sub> fengycin B	C <sub>74</sub> H <sub>114</sub> N <sub>12</sub> O <sub>20</sub>	746,4023[M+2H] <sup>+</sup>	2,0	994, 1108	Villegas-Escobar et al., 2018; SOUZA et al., 2018
12	23,57	Surfactin	C <sub>51</sub> H <sub>89</sub> N <sub>7</sub> O <sub>13</sub>	1008,6647	-0,1	455, 667, 895	SOUZA et al., 2018
13	23,77	Surfactin	C <sub>52</sub> H <sub>91</sub> N <sub>7</sub> O <sub>13</sub>	1022,6728	2,1	582, 796, 909	SOUZA et al., 2018
14	23,96	Surfactin	C <sub>52</sub> H <sub>91</sub> N <sub>7</sub> O <sub>13</sub>	1022,6743	-0,8	582, 796, 909	SOUZA et al., 2018
15	24,53	Surfactin	C <sub>53</sub> H <sub>93</sub> N <sub>7</sub> O <sub>13</sub>	1036,6910	0,1	441, 685, 923	SOUZA et al., 2018

**Tabela S3** - Chemical identification of lipopeptides from *Bacillus velezensis* LIS05 in Landy medium by UPLC-qTOF-MS. Identified classes: iturins, fengycins and surfactins

Nº peak	(min)	Compounds	Molecular fórmula	ion <i>m/z</i>	Erro (ppm)	Fragment ions <i>m/z</i>	References
1	12,44	Iturin A2	C <sub>48</sub> H <sub>74</sub> N <sub>12</sub> O <sub>14</sub>	1043,5519 [M+H] <sup>+</sup>	-0,7	299, 801, 915	YE et al., 2012
2	13,59	C <sub>14</sub> Fengycin A	C <sub>70</sub> H <sub>107</sub> N <sub>12</sub> O <sub>20</sub>	718,3793 [M+2H] <sup>+</sup>	2,4	966, 1080	Villegas-Escobar et al., 2018; SOUZA et al., 2018
3	14,44	C <sub>15</sub> Fengycin A	C <sub>71</sub> H <sub>108</sub> N <sub>12</sub> O <sub>20</sub>	725,3832 [M+2H] <sup>+</sup>	-0,3	966, 1080	Villegas-Escobar et al., 2018; SOUZA et al., 2018
4	14,79	C <sub>16</sub> Fengycin A	C <sub>73</sub> H <sub>112</sub> N <sub>12</sub> O <sub>20</sub>	732,3924 [M+2H] <sup>+</sup>	-1,1	966, 1080	Villegas-Escobar et al., 2018; SOUZA et al., 2018
5	15,05	C <sub>17</sub> Fengycin A	C <sub>72</sub> H <sub>110</sub> N <sub>12</sub> O <sub>20</sub>	739,4003 [M+2H] <sup>+</sup>	1,8	966, 1080	Villegas-Escobar et al., 2018; SOUZA et al., 2018
6	15,24	C <sub>16</sub> Fengycin B	C <sub>74</sub> H <sub>114</sub> N <sub>12</sub> O <sub>20</sub>	746,4094 [M+2H] <sup>+</sup>	0,7	994, 1180	Villegas-Escobar et al., 2018; SOUZA et al., 2018
7	15,79	C <sub>17</sub> Fengycin B	C <sub>75</sub> H <sub>116</sub> N <sub>12</sub> O <sub>20</sub>	753,4125 [M+2H] <sup>+</sup>	1,2	994, 1180	Villegas-Escobar et al., 2018; SOUZA et al., 2018
8	16,02	C <sub>16</sub> Fengycin B	C <sub>74</sub> H <sub>114</sub> N <sub>12</sub> O <sub>20</sub>	746,4079[M+2H] <sup>+</sup>	-1,3	994	Villegas-Escobar et al., 2018; SOUZA et al., 2018
9	21,49	C <sub>14</sub> Surfactin	C <sub>45</sub> H <sub>97</sub> N <sub>7</sub> O <sub>19</sub>	1040,6824 [M+H] <sup>+</sup>	0,6	685, 909, 1022	MA et al., 2016
10	22,35	C <sub>12</sub> Surfactin	C <sub>43</sub> H <sub>91</sub> N <sub>7</sub> O <sub>18</sub>	994,6488 [M+H] <sup>+</sup>	-1.1	685, 976	MA et al., 2016; Tang et al., 2010
11	22,61	Surfactin	C <sub>56</sub> H <sub>91</sub> N <sub>7</sub> O <sub>12</sub>	1054,6807 [M+H] <sup>+</sup>	0.3	441, 554	MA et al., 2016
12	22,98	Surfactin	C <sub>51</sub> H <sub>89</sub> N <sub>7</sub> O <sub>13</sub>	1008,6595 [M+H] <sup>+</sup>	-0,2	455, 667, 895	SOUZA et al., 2018
13	23,23	Surfactin	C <sub>51</sub> H <sub>89</sub> N <sub>7</sub> O <sub>13</sub>	1008,6614 [M+H] <sup>+</sup>	1,7	455, 667, 895	SOUZA et al., 2018
14	23,79	Surfactin	C <sub>52</sub> H <sub>91</sub> N <sub>7</sub> O <sub>13</sub>	1022,6766 [M+H] <sup>+</sup>	1,3	582, 796, 909	SOUZA et al., 2018
15	23,97	Surfactin	C <sub>52</sub> H <sub>91</sub> N <sub>7</sub> O <sub>13</sub>	1022,6741 [M+H] <sup>+</sup>	-1,2	582, 796, 909	SOUZA et al., 2018
16	24,28	Surfactin	C <sub>51</sub> H <sub>89</sub> N <sub>7</sub> O <sub>13</sub>	1008,6581 [M+H] <sup>+</sup>	-1,6	455, 667, 895	SOUZA et al., 2018
17	24,51	Surfactin	C <sub>53</sub> H <sub>93</sub> N <sub>7</sub> O <sub>13</sub>	1036,6913 [M+H] <sup>+</sup>	0,3	441, 685, 923	SOUZA et al., 2018
18	24,88	Surfactin	C <sub>53</sub> H <sub>93</sub> N <sub>7</sub> O <sub>13</sub>	1036,6910 [M+H] <sup>+</sup>	0,8	441, 685, 923	SOUZA et al., 2018

**Tabela S4** - Chemical identification of lipopeptides from *Bacillus velezensis* CT02 in TSB medium by UPLC-qTOF-MS. Identified classes: fengycins and surfactins

Nº peak	(min)	Compounds	Molecular fórmula	ion <i>m/z</i>	Erro (ppm)	Fragment ions <i>m/z</i>	References
1	13,57	C <sub>14</sub> Fengycin A	C <sub>70</sub> H <sub>107</sub> N <sub>12</sub> O <sub>20</sub>	718,3788 [M+2H] <sup>+</sup>	1,7	966, 1080	Villegas-Escobar et al., 2018; SOUZA et al., 2018
2	13,79	Linear C <sub>16</sub> Fengycin A	C <sub>72</sub> H <sub>114</sub> N <sub>12</sub> O <sub>20</sub>	741,3965 [M+2H] <sup>+</sup>	3.9	966, 1080	MA et al., 2016
3	13,94	Linear C <sub>16</sub> Fengycin A	C <sub>72</sub> H <sub>114</sub> N <sub>12</sub> O <sub>20</sub>	741,3937 [M+2H] <sup>+</sup>	0,1	966, 1080	MA et al., 2016
4	14,06	C <sub>15</sub> Fengycin A	C <sub>71</sub> H <sub>108</sub> N <sub>12</sub> O <sub>20</sub>	725,4003 [M+2H] <sup>+</sup>	2.3	966, 1080	Villegas-Escobar et al., 2018; SOUZA et al., 2018
5	14,47	C <sub>15</sub> Fengycin A	C <sub>71</sub> H <sub>108</sub> N <sub>12</sub> O <sub>20</sub>	725,3986 [M+2H] <sup>+</sup>	-3.7	966, 1080	Villegas-Escobar et al., 2018; SOUZA et al., 2018
6	14,77	C <sub>16</sub> Fengycin A	C <sub>72</sub> H <sub>110</sub> N <sub>12</sub> O <sub>20</sub>	732,3915 [M+2H] <sup>+</sup>	-2.3	966, 1080	Villegas-Escobar et al., 2018; SOUZA et al., 2018
7	15,09	C <sub>17</sub> Fengycin A	C <sub>72</sub> H <sub>110</sub> N <sub>12</sub> O <sub>20</sub>	739,3990 [M+2H] <sup>+</sup>	3.9	966, 1080	Villegas-Escobar et al., 2018; SOUZA et al., 2018
8	15,22	C <sub>16</sub> Fengycin B	C <sub>74</sub> H <sub>114</sub> N <sub>12</sub> O <sub>20</sub>	746,4111 [M+2H] <sup>+</sup>	2.9	966, 1080	Villegas-Escobar et al., 2018; SOUZA et al., 2018
9	15,77	C <sub>17</sub> Fengycin B	C <sub>75</sub> H <sub>116</sub> N <sub>12</sub> O <sub>20</sub>	753,4147 [M+2H] <sup>+</sup>	3.6	994, 1180	Villegas-Escobar et al., 2018; SOUZA et al., 2018
10	15,99	C <sub>16</sub> Fengycin B	C <sub>74</sub> H <sub>114</sub> N <sub>12</sub> O <sub>20</sub>	746,4069 [M+2H] <sup>+</sup>	-2,0	994	Villegas-Escobar et al., 2018; SOUZA et al., 2018
11	16,14	C <sub>17</sub> Fengycin A	C <sub>72</sub> H <sub>110</sub> N <sub>12</sub> O <sub>20</sub>	739,4049 [M+2H] <sup>+</sup>	-2.3	966, 1080	Villegas-Escobar et al., 2018; SOUZA et al., 2018
12	21,30	C <sub>14</sub> Surfactin	C <sub>45</sub> H <sub>97</sub> N <sub>7</sub> O <sub>19</sub>	1040,6825	0,7	685, 909, 1022	MA et al., 2016
13	21,46	C <sub>14</sub> Surfactin	C <sub>45</sub> H <sub>97</sub> N <sub>7</sub> O <sub>19</sub>	1040,6917	-0,1	685, 909, 1022	MA et al., 2016
14	22,32	C <sub>12</sub> Surfactin	C <sub>43</sub> H <sub>91</sub> N <sub>7</sub> O <sub>18</sub>	994,6500	0.1	685, 873, 976	MA et al., 2016; Tang et al., 2010



15	22,96	Surfactin	C <sub>51</sub> H <sub>89</sub> N <sub>7</sub> O <sub>13</sub>	1008,6611	1,4	455, 667, 895	SOUZA et al., 2018
16	23,58	Surfactin	C <sub>51</sub> H <sub>89</sub> N <sub>7</sub> O <sub>13</sub>	1008,6600	0,3	455, 667, 895	SOUZA et al., 2018
17	23,79	Surfactin	C <sub>52</sub> H <sub>91</sub> N <sub>7</sub> O <sub>13</sub>	1022,6726	-2,6	582, 796, 909	SOUZA et al., 2018
18	23,95	Surfactin	C <sub>52</sub> H <sub>91</sub> N <sub>7</sub> O <sub>13</sub>	1022,6714	-3,8	582, 796, 909	SOUZA et al., 2018
19	24,51	Surfactin	C <sub>53</sub> H <sub>93</sub> N <sub>7</sub> O <sub>13</sub>	1036,6929	1.8	441, 685, 923	SOUZA et al., 2018

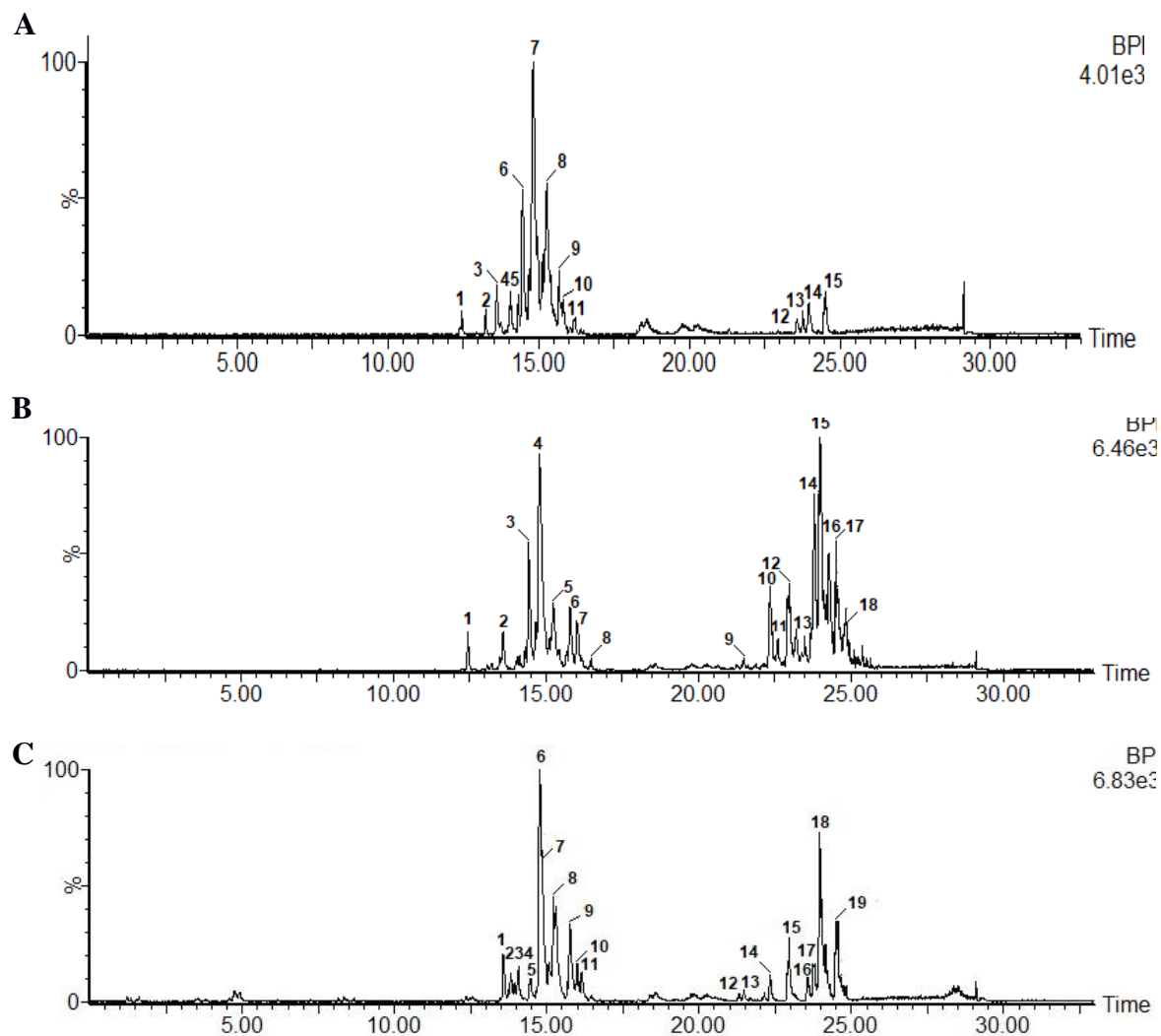
**Tabela S5** - Chemical identification of cyclopeptides from *Paenibacillus* sp. in TSB medium by UPLC-qTOF-MS. Identified classes: cyclopeptides.

Nº peak	(min)	Compounds	Molecular fórmula	ion <i>m/z</i>	Erro (ppm)	Fragment ions <i>m/z</i>	References
1	10,29	Polymyxin B <sub>4</sub>	C <sub>54</sub> H <sub>94</sub> N <sub>16</sub> O <sub>13</sub>	588,4128[M+2H] <sup>+</sup>	0,3	863,4481; 662,1880	Govaerts et al., 2002; Choi e al., 2009
2	12,36	Polymyxin B <sub>6</sub>	C <sub>56</sub> H <sub>98</sub> N <sub>16</sub> O <sub>14</sub>	610,4254[M+2H] <sup>+</sup>	1,2	461,3480; 762,3284	Govaerts et al., 2002; Choi e al., 2009
3	12,95	Polymyxin B <sub>2</sub>	C <sub>55</sub> H <sub>96</sub> N <sub>16</sub> O <sub>13</sub>	595,4012[M+2H] <sup>+</sup>	-0,9	863,5214; 662,2843	Govaerts et al., 2002; Choi e al., 2009
4	14,60	Polymyxin B <sub>3</sub>	C <sub>55</sub> H <sub>96</sub> N <sub>16</sub> O <sub>13</sub>	595,4024[M+2H] <sup>+</sup>	-1,9	863,5263; 662,2541	Govaerts et al., 2002; Choi e al., 2009
5	17,46	Isoleucinapolymyxin B <sub>1</sub>	C <sub>56</sub> H <sub>98</sub> N <sub>16</sub> O <sub>13</sub>	602,4215[M+2H] <sup>+</sup>	2,3	562,2509; 662,3380	Govaerts et al., 2002; Choi e al., 2009
6	18,59	Polymyxin B <sub>1</sub>	C <sub>56</sub> H <sub>98</sub> N <sub>16</sub> O <sub>13</sub>	602,4301[M+2H] <sup>+</sup>	1,7	542,3284; 662,3248	Govaerts et al., 2002; Choi e al., 2009
7	19,73	Polymyxin B <sub>5</sub>	C <sub>56</sub> H <sub>98</sub> N <sub>16</sub> O <sub>13</sub>	602,4286[M+2H] <sup>+</sup>	2,9	461,3014; 562,3881	Govaerts et al., 2002; Choi e al., 2009

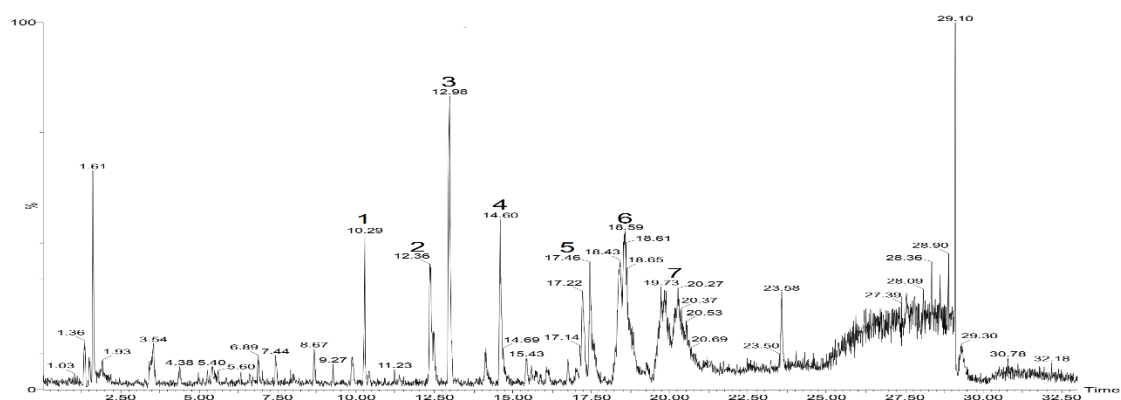
**Tabela S6** – Chemical identification of metabolites from *Pseudomonas aeruginosa* IPR45 in Landy medium by UPLC-qTOF-MS. Identified classes: quinolones e rhamnolipids.

Nº peak	(min)	Compounds	Molecular fórmula	ion <i>m/z</i>	Erro (ppm)	Fragment ions <i>m/z</i>	References
1	12,23	Isomer 2-( <i>E</i> -Non-4-enil)-4-quinolone	C <sub>16</sub> H <sub>19</sub> NO	242,1549	0,7	159	Saalim et al., 2020
2	12,37	Isomer 2-( <i>E</i> -non-4-enil)-4-quinolone	C <sub>16</sub> H <sub>19</sub> NO	242,1543	-0,8	159	Saalim et al., 2020; Li et al., 2020
3	12,59	2-heptil-quinolone	C <sub>16</sub> H <sub>21</sub> NO	244,1539	-2,5	159, 172	Saalim et al., 2020
4	13,08	2-heptil-3-hidroxi-4-quinolone	C <sub>16</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>2</sub>	260,1642	-3,5	159, 186	Saalim et al., 2020; Li et al., 2020
5	13,87	2-(6-metil)-heptil-4-quinolone	C <sub>17</sub> H <sub>23</sub> NO	258,1854	1,9	159, 172	Saalim et al., 2020; Li et al., 2020
6	14,48	Derivativ of quinolone	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> N <sub>2</sub> O	325,3218	-0,3	159	Saalim et al., 2020
7	14,80	2-(( <i>E</i> )-Non-4'-enil)-4-quinolone	C <sub>18</sub> H <sub>23</sub> NO	270,1853	-1,9	159	Saalim et al., 2020; Li et al., 2020
8	14,99	Isomer 2-(( <i>E</i> )-Non-4'-enil)-4quinolone	C <sub>18</sub> H <sub>23</sub> NO	270,1864	2,2	159, 184	Saalim et al., 2020; Li et al., 2020
9	15,15	2-Nonil-4-quinolinol	C <sub>18</sub> H <sub>25</sub> NO	272,2023	3,3	159	Saalim et al., 2020; Li et al., 2020
10	16,18	2-undecen-18-il-4-quinolone	C <sub>20</sub> H <sub>27</sub> NO	298,2165	-2,0	159, 172	Saalim et al., 2020; Bultel-Poncé et al., 1998
11	17,31	Not identified	C <sub>21</sub> H <sub>29</sub> NO	312,2325	-0,7	159, 172	Saalim et al., 2020; Bultel-Poncé et al., 1998
12	17,59	2-undecil-4-quinolone	C <sub>20</sub> H <sub>29</sub> NO	300,2334	2,3	159	Saalim et al., 2020; Bultel-Poncé et al., 1998
13	17,90	di-RhamnolipidsRha <sub>2</sub> -C10-C8	C <sub>30</sub> H <sub>54</sub> O <sub>13</sub>	623,3643	1,0	171, 313	Christova et al., 2011

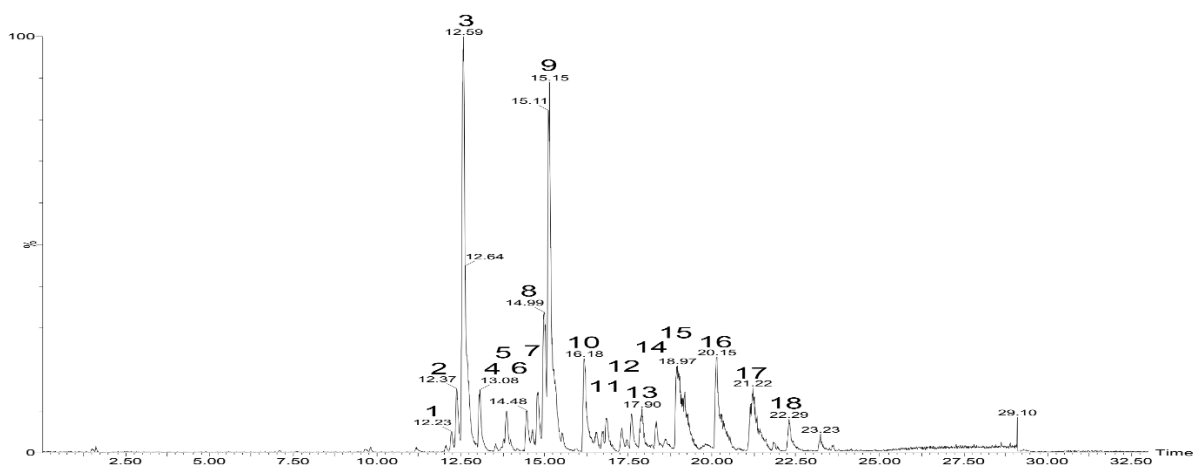
14	18,33	Derivative of quinolone	$C_{22}H_{31}NO$	326,2474	-3.1	159, 172	-
15	18,97	di-Rhamnolipids Rha <sub>2</sub> -C10–C10	$C_{32}H_{58}O_{13}$	651,3958	0,3	359, 505	Christova et al., 2011; Ndlovu et al., 2017
16	20,15	Isomer di-Rhamnolipids Rha <sub>2</sub> -C10–C10	$C_{32}H_{58}O_{13}$	651,3937	-2,9	359, 505	Christova et al., 2011
17	21,22	di-Rhamnolipids Rha <sub>2</sub> C10–C12	$C_{34}H_{62}O_{13}$	679,4290	3,1	387, 533	Christova et al., 2011
18	22,29	Isomer di-Rhamnolipids Rha <sub>2</sub> C10–C12	$C_{34}H_{62}O_{13}$	679,4278	1,3	387, 533	Christova et al., 2011



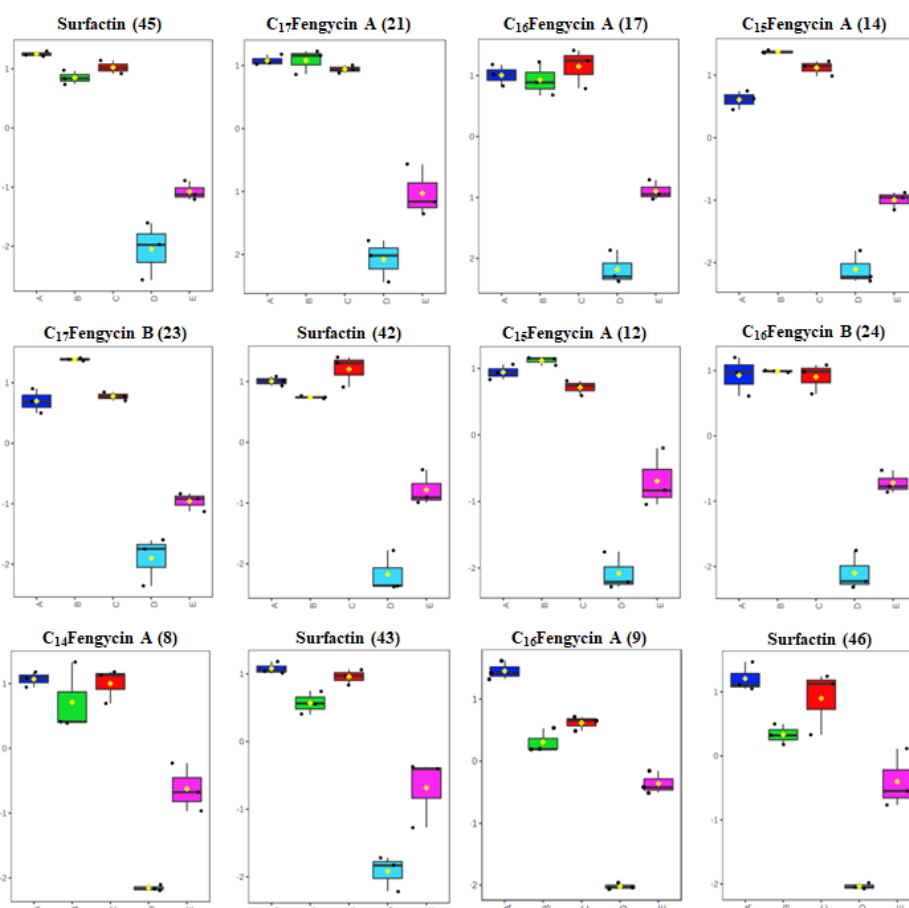
**Figure S1** – High performance liquid chromatography analysis of lipopeptides produced by *Bacillus* isolates IM14 (A), LIS05 (B) and CT02 (C).



**Figure S2.** High performance liquid chromatography analysis of lipopeptides produced by *Paenibacillus* sp. LIS04



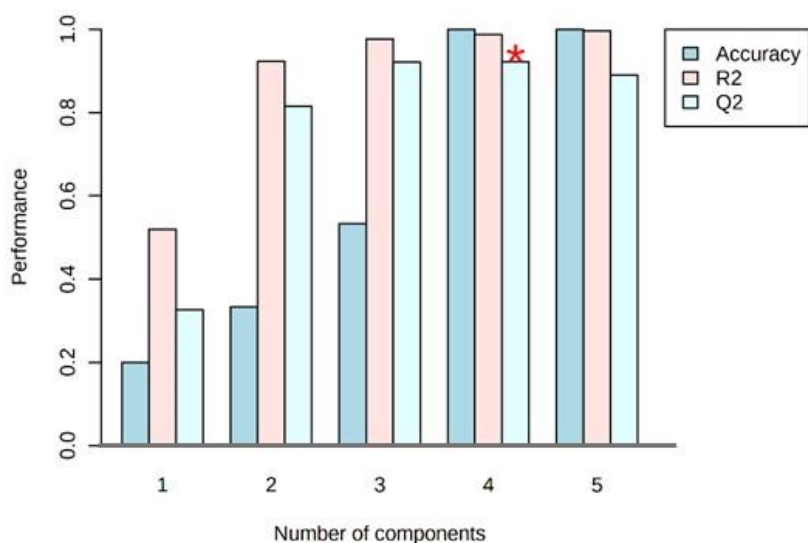
**Figure S3.** High performance liquid chromatography analysis of lipopeptides produced by *Pseudomonas aeruginosa* IPR45



**Figure S4.** Figure S4. Boxplot of concentrations for twelve compounds significantly relevant for antifungal activity, as broken down in the VIP analysis (VIP > 1.0 and p < 0.05).

**Tabela S7** - Table used in the chemometric analysis of the data obtained from the HPLC-MS of the compounds characterized in the bacterial crude extract and the retention time

<b>Nº</b>	<b>Tempo (min)</b>	<b>Compostos</b>	<b>Nº</b>	<b>Tempo (min)</b>	<b>Compostos</b>
1	10,29	Polymyxin B <sub>4</sub>	24	16,02	C <sub>16</sub> Fengycin B
2	12,37	2-(E-non-4-enil)-4-quinolone	25	16,14	C <sub>17</sub> Fengycin A
3	12,44	Iturin A <sub>2</sub>	26	16,18	2-undecen-18-il-4-quinolone
4	12,59	2-heptil-quinolone	27	16,42	C <sub>18</sub> Fengycin B
5	12,95	Polymyxin B <sub>2</sub>	28	17,31	Não identificado
6	13,08	2-heptil-3-hidroxi-4-quinolone	29	17,46	Isoleucinapolymyxin B <sub>1</sub>
7	13,25	Iturin A <sub>3</sub> -A <sub>5</sub>	30	17,59	2-undecil-4-quinolone
8	13,59	C <sub>14</sub> Fengycin A	31	17,90	di-RhamnolipidsRha2-C <sub>10</sub> -C <sub>8</sub>
9	13,79	C <sub>16</sub> Fengycin A	32	18,33	Derivado da quinolone
10	13,87	2-(6-metil)-heptil-4-quinolone	33	18,59	Polymyxin B <sub>1</sub>
11	13,94	C <sub>16</sub> Fengycin A	34	18,97	di-Rhamnolipids Rha2-C <sub>10</sub> -C <sub>10</sub>
12	14,06	C <sub>15</sub> Fengycin A	35	20,15	di-Rhamnolipids Rha2-C <sub>10</sub> -C <sub>10</sub>
13	14,33	C <sub>15</sub> Fengycin A	36	21,22	di-Rhamnolipids Rha2C <sub>10</sub> -C <sub>12</sub>
14	14,44	C <sub>15</sub> Fengycin A	37	21,49	C <sub>14</sub> Surfactin
15	14,48	Derivative of quinolone	38	22,35	C <sub>12</sub> Surfactin
16	14,60	Polymyxin B <sub>3</sub>	39	22,61	Surfactin
17	14,79	C <sub>16</sub> Fengycin A	40	22,98	Surfactin
18	14,80	2-((E)-Non-4'-enil)-4-quinolone	41	23,58	Surfactin
19	14,99	Isomer 2-((E)-Non-4'-enil)-4-quinolone	42	23,79	Surfactin
20	15,15	2-Nonil-4-quinolinol	43	23,97	Surfactin
21	15,20	C <sub>17</sub> Fengycin A	44	24,28	Surfactin
22	15,24	C <sub>16</sub> Fengycin B	45	24,51	Surfactin
23	15,79	C <sub>17</sub> Fengycin B	46	24,88	Surfactin



**Figure S5.** Cross-validation graph using the leave-one-out cross-validation (LOOCV) method applied to partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) data. The red star above the  $Q^2$  column indicates that the four component model is optimal

**Tabela S8 -** Compounds identified in the VIP analysis.

Compound	VIP	<i>p</i> -value
Surfactin (45)	1.5488	2.84E-08
C <sub>17</sub> Fengycin A (21)	1.5107	5.53E-08
C <sub>16</sub> Fengycin A (17)	1.4158	4.07E-08
C <sub>15</sub> Fengycin A (14)	1.37	4.27E-10
C <sub>17</sub> Fengycin B (23)	1.3531	1.85E-08
Surfactin (42)	1.3302	2.80E-08
C <sub>15</sub> Fengycin A (12)	1.3244	7.48E-08
C <sub>16</sub> Fengycin B (24)	1.308	3.59E-08
C <sub>14</sub> Fengycin A (8)	1.2812	8.22E-07
Surfactin (43)	1.232	4.02E-07
Polymyxin B <sub>3</sub> (16)	1.2207	2.69E-06
C <sub>16</sub> Fengycin A (9)	1.2201	9.09E-10
2-Nonil-4-quinolinol (20)	1.1784	0.000277
Not identified (28)	1.1541	8.69E-07
Surfactin (46)	1.1447	1.93E-06

VIP: Variable Importance in Projection