



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

FERNANDA MOREIRA CARDOSO

***TRICHODERMA E BACILLUS NO CONTROLE DE
PATÓGENOS DE SEMENTES, NA GERMINAÇÃO E
CRESCIMENTO DE PLÂNTULAS DE MILHO DOCE***

Londrina
2022

FERNANDA MOREIRA CARDOSO

***TRICHODERMA E BACILLUS NO CONTROLE DE
PATÓGENOS DE SEMENTES, NA GERMINAÇÃO E
CRESCIMENTO DE PLÂNTULAS DE MILHO DOCE***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós
graduação em Agronomia da Universidade
Estadual de Londrina, como requisito parcial à
obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Maria Isabel Balbi- Peña

Londrina
2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

C268t Cardoso, Fernanda Moreira.
Trichoderma e Bacillus no controle de patógenos de sementes, na germinação e crescimento de plântulas de milho doce / Fernanda Moreira Cardoso. - Londrina, 2022.
69 f. : il.

Orientador: Maria Isabel Balbi-Peña.
Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2022.
Inclui bibliografia.

1. Controle biológico - Tese. 2. Promoção de crescimento - Tese. 3. Tratamento de sementes - Tese. 4. Zea mays l. - Tese. I. Balbi-Peña, Maria Isabel . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. III. Título.

CDU 63

FERNANDA MOREIRA CARDOSO

***TRICHODERMA E BACILLUS NO CONTROLE DE
PATÓGENOS DE SEMENTES, NA GERMINAÇÃO E
CRESCIMENTO DE PLÂNTULAS DE MILHO DOCE***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós
graduação em Agronomia da Universidade
Estadual de Londrina, como requisito parcial à
obtenção do título de Mestre em Agronomia.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^a. Dra. Maria Isabel Balbi-
Peña
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a. Dra Kátia Regina Freitas Schwan-
Estrada
Universidade Estadual de Maringá - UEM

Prof^a. Dra. Gislaine Gabardo
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 06 de Junho de 2022.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela minha fé e força de vontade de conseguir chegar até aqui, sem ELE, eu não seria capaz.

À Universidade Estadual de Londrina, por mais um desafio proporcionado, ao seu corpo docente, que oportunizaram a aspiração de um horizonte superior.

À Capes pela concessão da bolsa.

A minha orientadora Maria Isabel Balbi Peña, por ter me orientado até aqui, pela paciência, pelos ensinamentos acadêmicos e de vida e pela amizade. Você realmente faz o que ama e espero um dia ser um décimo da mulher e profissional que você é.

À Prof^a. Dra Kátia Regina Freitas Schwan-Estrada, pelas correções, pela participação na qualificação e na defesa e por ter tornado isso possível, obrigada pela colaboração e tempo.

À Prof^a. Dra Gislaine Gabardo pela participação na defesa, obrigada pela colaboração e tempo.

Aos meus pais Geraldo Francisco Cardoso e Luciana Cardoso Moreira, pela vida, pelo apoio, amor e dedicação durante todos esses anos, sem vocês nada disso seria possível.

Ao Vitor Henrique Rambaldo Benedetti, que está presente em todos os meus desafios, sempre me proporcionando o amor e suporte necessários para toda a trajetória. Obrigado pela paciência durante todos esses anos.

Aos meus segundos pais Ana Estela e Vanderlei Benedetti, que estiveram me apoiando de longe e acreditaram no meu potencial.

Aos meus amigos Ana Paula, Ana Luiza e Luiz Abilio que me apoiaram desde o dia que eu decidi fazer mestrado, vocês foram essenciais. Obrigada por tanto.

Aos meus amigos e colegas de laboratório Renata Thomé e Maicon Petry, obrigada pela amizade, por toda a ajuda durante os experimentos, pelas dicas e correções, vocês foram incríveis.

E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte dessa etapa acadêmica. Obrigada.

CARDOSO, Fernanda Moreira. ***Trichoderma e Bacillus no controle de patógenos de Sementes, na germinação e crescimento de plântulas de milho doce.*** 2022. 67 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

RESUMO

O milho doce possui grãos com pericarpo mais fino, maior teor de açúcar e menor teor de amido do que os grãos de milho comum e por isso suas sementes são mais susceptíveis ao ataque de fitopatógenos tornando importante o tratamento de sementes para implantação da cultura. Com o aumento da procura pelos consumidores por produtos livres de agrotóxicos, o controle biológico tem se tornado uma alternativa aos fungicidas químicos pois é um método de controle mais seguro de para a saúde humana e o meio ambiente. Fungos do gênero *Trichoderma* e bactérias do gênero *Bacillus* são amplamente empregados no controle de fitopatógenos, inclusive no tratamento de sementes. Neste sentido, o objetivo deste trabalho, foi avaliar dez isolados de *Trichoderma asperellum* (T2, T7, T20, T26, T37, T38, T41 e T70), um de *Trichoderma asperelloides* (T25), um de *Trichoderma* sp. (T24) e três cepas de *Bacillus* (LAFUEL 01, LAFUEL 02 e LAFUEL 03) no controle de fitopatógenos da semente, bem como o efeito dos agentes de controle biológico sobre a germinação e o crescimento inicial de plântulas de milho doce. O antagonismo de isolados de *Trichoderma* sp. e *Bacillus* sp. foi avaliado através de testes de confronto direto e teste de difusão em ágar de sobrenadante livre de células (SLC) das cepas de *Bacillus*. Os agentes de controle biológico também foram testados em experimentos de casa de vegetação via microbiolização de semente, para avaliação dos efeitos sobre a germinação e o crescimento inicial de plântulas de milho doce. Os experimentos *in vitro* foram em delineamento inteiramente casualizado e os experimentos *in vivo* foram em delineamento de blocos casualizados. Os patógenos de semente (*Fusarium* sp., *Acremonium strictum*, dois isolados de *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp.) foram isolados de maneira direta de sementes de milho doce. Os dados foram avaliados quanto a normalidade dos dados (teste de Shapiro-Wilk) e homogeneidade das variâncias (teste de Bartlett) e submetidos à análise de variância e se constatado efeitos significativos, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ou Scott Knott a 5% de probabilidade. Nos testes de confronto direto todos os isolados de *Trichoderma* apresentaram fungitoxicidade variando de 31 a 59,8% de inibição no experimento 1 e de 45,8 a 73,8% no experimento 2, dependendo dos patógenos confrontados. As cepas de *Bacillus* inibiram o crescimento dos patógenos de semente em níveis entre 44,7 e 76 % (exp.1) e entre 47,6 e 78,5 (exp. 2) dependendo da cepa e o fungo confrontado. No teste de difusão em ágar o SLC do isolado LAFUEL 03 foi o que obteve melhores resultados, entretanto, nos testes *in vivo*, foi responsável por prejudicar a germinação das sementes tratadas. Sementes de milho doce tratadas com o isolado de *T. asperellum* T41, apresentaram maior germinação considerando todos os patógenos inoculados e as plântulas oriundas dessas sementes, apresentaram maior crescimento de raiz e planta inteira nos testes de promoção de crescimento.

Palavras-chave: controle biológico; promoção de crescimento; tratamento de sementes; *zea mays* l.; grupo saccharata.

CARDOSO, Fernanda Moreira. ***Trichoderma* and *Bacillus* in the control of seed pathogens, germination and growth of sweet corn seedlings.** 2020. 67 p. Dissertation (Master's degree in Agronomy) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

ABSTRACT

Sweet corn has grains with thinner pericarp, higher sugar content and lower starch content than common corn grains and therefore its seeds are more susceptible to phytopathogen attack, making seed treatment important for crop implantation. With the increase in consumer demand for pesticide-free products, biological control has become an alternative to chemical fungicides as it is a safer control method for human health and the environment. Fungi of the genus *Trichoderma* and bacteria of the genus *Bacillus* are widely used in the control of phytopathogens, including at the treatment in seeds. In this sense, the objective of this work was to evaluate ten isolates of *Trichoderma asperellum* (T2, T7, T20, T26, T37, T38, T41 and T70), one from *Trichoderma asperelloids* (T25), one from *Trichoderma* sp. (T24) and three strains of *Bacillus* (LAFUEL 01, LAFUEL 02 and LAFUEL 03) in the control of seed phytopathogens, as well as the effect of biological control agents on germination and growth Resumen initial in seedlings in corn sweet. The antagonism of isolates of *Trichoderma* sp. and *Bacillus* sp. was evaluated through direct confrontation tests and cell-free supernatant (SLC) agar diffusion test of *Bacillus* strains. Biological control agents were also tested in greenhouse experiments via seed microbiolization to evaluate the effects on germination and initial growth of sweet corn seedlings. The *in vitro* experiments were in a completely randomized design and the *in vivo* experiments were in a randomized block design. Seed pathogens (*Fusarium* sp., *Acremonium striticum*, two isolates of *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp.) were isolated directly from sweet corn seeds. Data were evaluated for data normality (Shapiro-Wilk test) and homogeneity of variances (Bartlett 's test) and submitted to analysis of variance and if significant effects were found, the means were compared by Tukey 's or Scott Knott 's test at 5 % probability. In direct confrontation tests, all *Trichoderma* isolates showed fungitoxicity ranging from 31 to 59,8% inhibition in experiment 1 and from 45,8 to 73,8% in experiment 2 depending on the pathogens confronted. *Bacillus* strains inhibited the growth of seed pathogens at levels between 44,7 and 76 % (exp.1) and between 47,6 and 78,5 (exp. 2) depending on the strain and the fungus challenged. In the agar diffusion test, the SLC of the isolated LAFUEL 03 was the one that obtained the best results, however, in the *in vivo* tests, it was responsible for harming the germination of the treated seeds. Sweet corn seeds treated with the *T. asperellum* T41 isolate showed higher germination considering all inoculated pathogens and seedlings from these seeds showed higher root and whole plant growth in the growth promotion tests.

Key words: biological control; growth promotion; seed treatment; *zea mays* L.; group saccharate.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - *Fusarium* sp. (FUS), *Acremonium striticum* (ACR), *Aspergillus* sp. (AP1), *Aspergillus* sp. (AP2) e *Penicillium* sp. (PEN) em confrontação direta com *Trichoderma asperellum* (T2, T7, T20, T26, T37, T38, T41 e T70), *T. asperelloides* (T25) e *Trichoderma* sp. (T24).....41
- Figura 2** - Confronto direto de *Fusarium* sp. (FUS), *Acremonium striticum* (ACR), *Aspergillus* sp. (AP1), *Aspergillus* sp. (AP2) e *Penicillium* sp. (PEN) em confronto direto com *Bacillus* sp. LAFUEL 01, LAFUEL 02 e LAFUEL 0345
- Figura 3** - Teste de difusão em ágar do sobrenadante livre de células (SLC) de LAFUEL 01, LAFUEL 02 e LAFUEL 03 *Bacillus* sp. sobre o crescimento micelial de *Fusarium* sp. (FUS), *Acremonium striticum* (ACR), *Aspergillus* sp. (AP1), *Aspergillus* sp. (AP2) e *Penicillium* sp. (PEN).....49

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Inibição do crescimento micelial (%) de *Fusarium* sp. (FUS), *Acremonium striticum* (ACR), *Aspergillus* sp. (AP1), *Aspergillus* sp. (AP2) e *Penicillium* sp. (PEN) em confrontação direta com *Trichoderma asperellum* (T2, T7, T20, T26, T37, T38, T41 e T70), *T. asperelloides* (T25) e *Trichoderma* sp. (T24).....40
- Tabela 2** – Classificação na Escala de Bell dos isolados de *Trichoderma asperellum* (T2, T7, T20, T26, T37, T38, T41 e T70), *T. asperelloides* (T25) e *Trichoderma* sp. (T24) em confrontação direta com *Fusarium* sp. (FUS), *Acremonium striticum* (ACR), *Aspergillus* sp. (AP1), *Aspergillus* sp. (AP2) e *Penicillium* sp. (PEN). Resultados de dois experimentos.....42
- Tabela 3** – Inibição do crescimento micelial (%) de *Fusarium* sp. (FUS), *Acremonium striticum* (ACR), *Aspergillus* sp. (AP1), *Aspergillus* sp. (AP2) e *Penicillium* sp. (PEN) em confrontação direta com *Bacillus* sp. LAFUEL 01, LAFUEL 02 e LAFUEL 03.....44
- Tabela 4** – Índice de velocidade do crescimento micelial de *Fusarium* sp. (FUS), *Acremonium striticum* (ACR), *Aspergillus* sp. (AP1), *Aspergillus* sp. (AP2) e *Penicillium* sp. (PEN) em confrontação direta com *Bacillus* sp. LAFUEL 01, LAFUEL 02 e LAFUEL 0346
- Tabela 5** – Diâmetro de halo de inibição (cm) no crescimento micelial de *Aspergillus* sp (AP2) e *Penicillium* sp. (PEN). em confrontação direta com *Bacillus* sp. LAFUEL 01, LAFUEL 02 e LAFUEL 0347
- Tabela 6** – Diâmetro do crescimento micelial (cm) de *Fusarium* sp. (FUS), *Acremonium striticum* (ACR), *Aspergillus* sp. (AP1), *Aspergillus* sp. (AP2) e *Penicillium* sp. (PEN). sob influência de sobrenadante livre de células (SLC) de *Bacillus* sp. LAFUEL 01, LAFUEL 02 e LAFUEL 0348
- Tabela 7** – Germinação (%) de sementes de milho doce em microbiolizadas com isolados de *Trichoderma asperellum* (T2, T7, T20, T37, T38, T41), *T. asperelloides* (T25) e *Trichoderma* sp. (T24) e ECOTRICH® à base de *T. harzianum* IBLF 006 em rolos de papel germitest.....51

- Tabela 8** – Germinação (%) aos sete dias de semente de milho doce inoculada artificialmente com *Fusarium* sp. (FUS), *Acremonium strictum* (ACR), *Aspergillus* sp. (AP1), *Aspergillus* sp. (AP2) e *Penicillium* sp. (PEN) e tratada com produtos à base de *Trichoderma asperellum* (T20 e T41), *Bacillus* sp. LAFUEL 03, fungicida microbiológico (SERENADE® à base de *B. subtilis* QST 713 e ECOTRICH® à base de *T. harzianum* IBLF 006) e químico (VITAVAX® Thiram + carboxina)52
- Tabela 9** – Germinação (GER), comprimento parte aérea (CPA), comprimento raiz (CRA), matéria seca parte aérea (MSP), matéria seca raiz (MSR), matéria seca total (MST), matéria seca raiz\massa seca total (MST\MSR) de plântulas de milho oriundas de semente tratada com produtos à base de *Bacillus* sp. e *Trichoderma* sp55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP1	<i>Aspergillus</i> sp.
AP2	<i>Aspergillus</i> sp.
ACS	<i>Acremonium strictum</i>
BCA	Agente de biocontrole
BDA	Batata-dextrose-ágar
FUS	<i>Fusarium</i> sp.
GD	Graus dias
ICMB	Inibição do crescimento micelial por <i>Bacillus</i>
ICMT	Inibição o crescimento micelial por <i>Trichoderma</i>
LBA	Lúria Bertani Ágar
NA	Nutriente Ágar
NB	Caldo Nutriente
PEN	<i>Penicillium</i> sp.
SLC	Sobrenadante livre de células

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1	A CULTURA DO MILHO	14
2.1.1	Milho Doce.....	15
2.1.2	Fenologia da Cultura	17
2.1.3	Exigências Edafoclimáticas	18
2.2	FATORES QUE AFETAM A GERMINAÇÃO DO MILHO DOCE	19
2.3	FUNGOS DE ARMAZENAMENTO DE SEMENTES.....	20
2.4	CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS	21
2.4.1	O Gênero <i>Trichoderma</i>	22
2.4.2	O Gênero <i>Bacillus</i>	25
2.5	MICROORGANISMOS PROMOTORES DE CRESCIMENTO.....	27
3	ARTIGO A	30
	RESUMO.....	30
	ABSTRACT	31
	INTRODUÇÃO	32
4	MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1	ORIGEM DOS ISOLADOS FÚNGICOS E BACTERIANOS.....	35
4.2	ENSAIO DE ANTAGONISMO <i>IN VITRO</i>	35
4.3	OBTENÇÃO DA SUSPENSÃO DE BACTÉRIAS E DO SOBRENADANTE LIVRE DE CÉLULAS	36
4.4	TESTE DE DIFUSÃO EM ÁGAR	36
4.5	CONTROLE DOS FUNGOS FITOPATOGÊNICOS.....	37
4.5.1	Inoculação de Sementes com os Fungos Fitopatogênicos.....	37
4.5.2	Tratamento de Sementes	37
4.6	DETERMINAÇÃO DA GERMINAÇÃO DE SEMENTES E DE PARÂMETROS DE CRESCIMENTO DE PLÂNTULAS DE MILHO DOCE	38
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40

6	CONCLUSÃO.....	59
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

1 INTRODUÇÃO

O milho doce (*Zea mays* L. grupo *saccharata*) classifica-se como especial e é considerado uma hortaliça, pois está voltado ao processamento industrial e para o consumo *in natura*, principalmente nos Estados Unidos, México, Nigéria, Indonésia, Hungria, França, África do Sul, Canadá e Peru.

Distingue-se do milho comum pela presença de alelos mutantes que são responsáveis pelo aumento da síntese de carboidratos no endosperma, fazendo com que os grãos apresentem um alto teor de açúcares e, portanto, apresentando um sabor mais adocicado. Apresenta pouco amido no endosperma, o que faz com que os grãos ao secarem fiquem enrugados e tenham uma aparência mais transparente.

O sabor adocicado do milho doce, é a característica mais desejada pela indústria. Além disso, o pericarpo mais fino, que atribui maciez ao grão, o torna mais atrativo ao consumo humano. Porém, o alto teor de açúcar no endosperma e a pouca quantidade de amido na semente, faz com que a camada de aleurona e o pericarpo desenvolvam espaços, após a sua maturação, deixando a semente com o aspecto enrugado e resultando em uma semente de qualidade inferior que a do milho comum. Isso faz com que o pericarpo seja mais delicado, o que facilita danos mecânicos no armazenamento e transporte e colabora para a penetração de fitopatógenos que reduzem a taxa de germinação.

Os patógenos que podem infectar as sementes de milho doce são os mesmos que afetam o milho comum, como por exemplo: *Pythium* spp., *Diplodia maydis*, *Rhizoctonia* sp., *Penicillium oxalicum* e *Fusarium moniliforme*. Esses fitopatógenos são capazes de sobreviver no solo e no interior de sementes e quando presentes provocam a diminuição de plantas na área.

Geralmente essas doenças são controladas através do emprego de tratamento químico nas sementes. As demandas atuais de uma agricultura mais sustentável, com redução do uso de produtos químicos, têm promovido o desenvolvimento do controle biológico de doenças de plantas o qual é uma alternativa menos agressiva ao meio ambiente e menos prejudicial à saúde humana.

Controle biológico é a supressão da doença pela aplicação de um agente de biocontrole (BCA), sendo geralmente leveduras, fungos filamentosos ou bactérias. Dentre os microrganismos mais estudados e utilizados como agentes de

controle biológico, podemos citar os fungos do gênero *Trichoderma* e as bactérias do gênero *Bacillus*.

Fungos do gênero *Trichoderma* apresentam vários mecanismos de ação sobre os fitopatógenos sendo as principais: parasitismo, competição, antibiose e indução de resistência. São considerados competidores agressivos, devido ao seu rápido crescimento vencendo o patógeno na competição por nutrientes, luz, espaço e outros fatores de crescimento.

Existem evidências de controle de vários fungos fitopatogênicos por espécies de *Trichoderma*, tais como *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Alternaria alternata*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium* spp., *Botrytis cinerea*, *Sclerotium rofsii*, *Pythium* spp. e *Ustilago maydis*.

Bactérias do gênero *Bacillus* atuam no controle de patógenos através de mecanismos como parasitismo, predação, produção de antibióticos como os lipopeptídeos cíclicos, que constituem o mecanismo de antagonismo mais importante. Esses estão envolvidos na desintegração de componentes intracelulares, como ácido nucléico e mitocôndria.

As espécies de *Bacillus* sintetizam através de rotas metabólicas secundárias substâncias como as bacilomicinas, iturinas, micoss subtilina, fengicinas ou plipastatina. Estudos provam que esses metabólitos secundários são capazes de inibir o crescimento de fungos como *Ralstonia solanacearum*, *Aspergillus flavus*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Rizoctonia solani* e *Penicillium purpurogenum*.

Com isso, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito de isolados de *Trichoderma* e *Bacillus* no controle de fitopatógenos de sementes, na germinação e crescimento de plântulas de milho doce.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A CULTURA DO MILHO

Pertencente à família Poaceae, o milho (*Zea mays* L.) é uma planta monoica com sua estrutura morfológica composta por uma haste cilíndrica, formada por nós e entrenós, inflorescência masculina e feminina, folhas lanceoladas dispostas de forma alternada e uma raiz fasciculada (BARROS; CALADO, 2014).

Existem três teorias sobre a origem da cultura do milho. A primeira, conhecida como evolução divergente, afirma que o teosinte, do gênero *Tripsacum*, deu origem ao milho que conhecemos hoje. Ambas as culturas apresentam semelhança estrutural e suas diferenças se devem, provavelmente, ao melhoramento. A segunda teoria é que o milho deu origem ao teosinte, por conta das reações de alteração no sabugo, como a diminuição do número de grãos pareados e únicos, endurecimento das glumas e da raque, em resposta ao fotoperiodismo. A terceira e última hipótese propõe que o milho se originou do teosinte por conta da seleção realizada pelo ser humano ao longo dos anos. As mais notáveis modificações foram o aumento da dominância apical, a diminuição da sensibilidade ao fotoperiodismo, a redução no número de perfilhos, o aumento da separação entre as inflorescências masculinas e femininas e o aumento no tamanho das espigas (FORNASIERI FILHO, 2007).

O milho é uma das mais importantes culturas de cereais do mundo devido ao seu valor nutritivo, composição química e produtividade (OLIVEIRA JÚNIOR, et al., 2006). Sua produção mundial em 2020/2021, segundo USDA (2022) foi de 1,12 bilhão de toneladas.

No Brasil, a produção de milho é um gerador de empregos na zona rural e urbana, sendo de grande importância na cadeia de produção de todo o agronegócio (GALVÃO et al., 2014).

O grão de milho é utilizado principalmente na alimentação animal sendo o consumo humano de forma direta com o milho *in natura* e de forma indireta através de produtos como: leite, ovo, carne e outros derivados de animais (ABIMILHO, 2019)

O milho também por ser utilizado como matéria prima na produção do etanol, e de acordo com a CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento (2022), no Brasil, na safra 2020/2021, serão produzidos cerca de 3,5 bilhões de litros de etanol a partir do grão de milho.

Conforme CONAB (2022), em 2020, a produção brasileira de milho foi de 115 milhões de toneladas com uma produtividade próxima a 5.4 mil kg ha⁻¹ em uma área cultivada de 21,2 milhões hectares.

A semente de milho comum pesa aproximadamente 0,3 g e consegue dar origem a uma planta com mais de 2,0 metros de altura em nove semanas. Em poucos meses, a planta produz entre 600 e 1000 sementes semelhantes às que deu origem à planta (ALDRICH et al., 1982). Essa eficiência produtiva deve-se ao metabolismo C4, que permite uma utilização mais eficiente da água, CO₂, nitrogênio e luz solar no processo de fotossíntese, comparadas com plantas com metabolismo C3. A eficiência de utilização de água de uma planta C4 é quase o dobro das plantas C3 e a taxa de transpiração é muito menor (EDWARDS, 2009).

O desenvolvimento do milho se dá em uma ampla gama de condições climáticas, em regiões geográficas que variam de latitude 40° S a 58° N, e em localidades abaixo do nível do mar até regiões de 2500 m de altitude (FANCELLI; DOURADO NETO, 2004). A temperatura ótima para a emergência é de 24 a 30°C, e a necessidade de água é de aproximadamente 600 mm para todo o ciclo (SANGOI et al., 2010).

O ciclo do milho depende de seu destino final de consumo (mini milho, milho verde, silagem ou grão), do genótipo (super precoce, precoce ou tardio) (FORNASIERI FILHO, 2007) e da temperatura a qual afeta a duração dos períodos de desenvolvimento da planta (LOZADA; ANGELOCCI, 1999).

2.1.1 Milho Doce

O milho (*Zea mays* L.), pertence à classe Magnoliopsida, ordem Poales, família Poaceae, tribo *Maydeae*. Seu centro de origem é na América, mais precisamente na região do México. Sua domesticação ocorreu a aproximadamente 7.000 anos.

O milho doce (*Zea mays* L. grupo *saccharata*) comparte a mesma origem geográfica e características botânicas do milho comum, diferindo apenas na composição do grão (PEREIRA FILHO; TEIXEIRA, 2016).

A diferença com o milho comum é a presença de genes mutantes que são responsáveis pela síntese de carboidratos no endosperma, o que determina que os grãos apresentam um alto teor de açúcares e pouco amido no endosperma,

deixando-os com um aspecto enrugado e mais transparente quando secos (DODSON-SWENSONET; TRACY, 2015).

O teor de açúcar no milho comum fica em torno de 3%, já no milho doce esse teor varia de 9 a 14% e de 15 a 25% no milho super doce. O gene responsável por essa característica é de caráter recessivo, razão pela qual essa característica é facilmente controlada pelo melhoramento genético (TEIXEIRA et al., 2014).

O sabor do milho doce é a sua principal qualidade. Outra característica desejada para o consumo *in natura* e para a indústria, é a espessura do pericarpo, que é mais fina que a do milho comum, o que deixa os grãos mais macios (TRACY, 2001). Essas características o tornam mais atrativo ao paladar humano em relação ao milho comum (PEREIRA FILHO; TEIXEIRA, 2016).

No caso do milho doce, os aspectos visuais, como a uniformidade de grãos e de espigas são mais importantes quando comparado ao milho comum, assim como seu ponto de maturação para consumo, que deve ser no estágio de grão leitoso (KWIATKOWSKI; CLEMENTE, 2007). A colheita do milho doce ocorre quando os grãos da espiga apresentam em torno de 70 a 75% de umidade. Nesse ponto, o milho está pronto para ser consumido *in natura* ou para a industrialização (CRUZ; PEREIRA FILHO 2002).

Dados da produção específica de milho doce não são facilmente encontrados. Souza (2018) mostra que no ano de 2014 o cultivo de milho doce no Brasil ocupava 36 mil ha, sendo 90% dessa área localizada no estado de Goiás.

Nos Estados Unidos, o milho doce é muito popular, sendo responsável por 25% da produção mundial da hortaliça em 2015 (SOUZA, 2018). A popularidade do milho doce nos Estados Unidos e o Brasil é muito diferente, pois os estadunidenses consomem o milho *in natura* e os brasileiros em conserva. Além disso, existe uma grande dificuldade de difundir o consumo de milho doce no Brasil devido à falta de cultivares adaptados para o clima brasileiro (PEREIRA FILHO; TEIXEIRA, 2016).

Conforme com a Associação Brasileira de Comércio de Sementes e Mudas (2014) e mencionado no livro: O Cultivo do Milho Doce (PEREIRA FILHO E TEIXEIRA, 2016) o valor gerado pela produção de milho doce ficou próximo a R\$ 302 milhões em 2012.

O estado de Goiás é responsável pela maior parte da produção de milho doce no Brasil, devido à produção na região ser viável o ano todo, o cultivo ser

realizado sob pivô central, e, principalmente pela quantidade de indústrias localizadas no estado, que colaboram financeiramente para a produção da cultura (PEREIRA FILHO E TEIXEIRA, 2016).

A industrialização é o principal destino do milho doce produzido no país com praticamente 100% da produção utilizada para esse fim (PEREIRA FILHO, 2002). A indústria destina o milho doce principalmente para conserva na forma de enlatados e congelados. O milho doce também pode ser utilizado para outros fins, como: minimilho, milho verde para consumo *in natura* e até silagem. Infelizmente, o desconhecimento por parte da população brasileira, torna o produto pouco popular no país (TEIXEIRA et al., 2013).

Embora o custo por hectare de milho doce ser maior que o do milho comum, o preço pago pela indústria torna o cultivo do milho doce uma atividade atrativa (PEREIRA FILHO; TEIXEIRA, 2016).

2.1.2 Fenologia da Cultura

Por ser a mesma espécie do milho comum, o milho doce possui os mesmos estágios fenológicos, apresentando como única diferença o ponto de colheita (PEREIRA FILHO; TEIXEIRA, 2016).

Segundo Pereira Filho e Teixeira (2016), os estágios de desenvolvimento do milho são divididos em vegetativos (V) e reprodutivos (R). Os estágios vegetativos são subdivididos de acordo o número de folhas completas emitidas pela planta (V1, V2, V3... Vn), onde n, é o número de folhas emitidas pela planta antes do florescimento, VE e VT são o primeiro e o último estágio da fase vegetativa, representados por emergência e florescimento, respectivamente.

Nos estágios entre V3 e V5, o número de folhas e espigas são definidos, ocorre a determinação do número potencial de grãos da espiga, ou a sua produção em potencial e pode ser visto o pendão ainda microscópico na extremidade do caule (SANGOI et al, 2010). Em V6, é quando acontece o alongamento acelerado do caule, o ponto de crescimento já se apresenta acima do solo e o sistema radicular está quase completo. Em V9, desenvolvem-se as flores masculinas e femininas e as possíveis espigas já são visíveis ao dissecar o colmo (PEREIRA FILHO; TEIXEIRA, 2016).

No estágio V12, a planta está com 90% de toda a sua área foliar formada, inicia-se o desenvolvimento das raízes adventícias, é definido o número final de grãos da espiga, assim como o tamanho dessas. Em V18 acontece o pendoamento e a espiga continua em ritmo acelerado de desenvolvimento. Em VT, a planta alcança o total do desenvolvimento vegetativo, a inflorescência masculina fica finalmente exposta e poucos dias depois, os estilos-estigmas emergem da planta para que ocorra a polinização (embonecamento), o que caracteriza o estágio R1, (SANGOI, et al, 2010).

A fase R2 é caracterizada pelo grão bolha d'água, a R3 pelo grão leitoso, a R4 pelo grão pastoso, a R5 pela formação do dente e o estágio final R6 pela maturidade fisiológica, quando as sementes chegam em seu peso máximo e começam a perder umidade até que seja possível a colheita sem que ocorra danos às sementes (SANGOI, et al, 2010).

De acordo com Kwiatkowski e Clemente (2007), a colheita do milho doce se dá até o estágio R3, que normalmente se inicia de 19 a 23 dias após a polinização, onde mais de 50% das espigas apresentam grãos leitosos com aproximadamente 80% de umidade.

2.1.3 Exigências Edafoclimáticas

Sobre os requerimentos de solo, o milho requer um solo de textura média com pH entre 5 e 8 (BARROS; CALADO, 2014).

O milho é uma planta de origem tropical, portanto, necessita de calor e umidade em todos os seus estágios vegetativos para que consiga alcançar seu pico de produção. A temperatura é um dos elementos essenciais para o crescimento da cultura. Para cumprir o seu desenvolvimento, o milho precisa das chamadas unidades térmicas, calculadas a partir da temperatura média diária e a temperatura basal, que é de 10°C para a esta cultura (BERGAMASCHI; MATZENAUER 2014).

Para avançar de um estágio de desenvolvimento para outro, a cultura deve fazer uma soma térmica mínima, também chamada de graus-dia (GDs). É necessário que a planta acumule cerca de 1500 GDs em todo o seu estágio vegetativo para completar todas as suas fases, isso pode durar de 60 a 65 dias (MAHANNA, 2014).

A temperatura do solo deve ficar entre 10 e 42°C, com um ótimo para a germinação e emergência entre 25 e 30°C. A temperatura do ar ideal para o florescimento é de 26°C, se superior a isso, pode levar à aceleração do ciclo da cultura, e inferior a essa temperatura, pode retardar o mesmo. O desenvolvimento adequado ocorre, se a temperatura ficar na faixa de 25 a 30°C (SANGOI et al., 2010).

A disponibilidade hídrica também é importante em todas as fases de desenvolvimento do milho, sendo o florescimento e o enchimento de grão as fases mais sensíveis ao estresse hídrico (BERGAMASCHI; MATZENAUER 2014).

2.2 FATORES QUE AFETAM A GERMINAÇÃO DO MILHO DOCE

Existem diversos fatores que podem influenciar o potencial germinativo da semente tais como: vitalidade, viabilidade, longevidade, grau de maturidade, dormência, genótipo, sanidade e fatores do ambiente como água, temperatura e luz (MARCOS FILHO, 2015).

A sanidade envolve fatores bióticos como presença de doenças, pragas e plantas invasoras, e fatores abióticos como toxidez em decorrência do manejo, falta ou excesso de água e nutrientes, entre outros (DOS SANTOS et al., 2019).

Os agentes bióticos que podem estar associados às sementes de milho são: fungos, bactérias, vírus e nematoides, que podem afetar a qualidade fisiológica e o desenvolvimento da cultura (MAPA, 2009). As sementes infectadas são apontadas como a mais importante fonte de inóculo primário de doenças (FERRARI et al., 2015).

O teor de açúcar elevado no endosperma e a baixa quantidade de amido de reserva na semente de milho doce, resulta no desenvolvimento de espaços entre a camada de aleurona e o pericarpo logo após a sua maturação, deixando a semente com o aspecto enrugado e resultando em semente de qualidade inferior ao do milho comum. Essas características fazem com que o pericarpo seja mais delicado, o que determina danos mecânicos no armazenamento e transporte e colabora para a penetração de fitopatógenos, reduzindo a taxa de germinação (ZUCARELI, 2014).

2.3 FUNGOS DE ARMAZENAMENTO DE SEMENTES

Grande parte das doenças que acometem a cultura do milho são transmitidas através das sementes, sendo são consideradas o mais importante meio de disseminação de patógenos para a cultura (PRESTES et al., 2019). Dentre os microrganismos disseminados através sementes, os fungos são os que mais se destacam, são transportados por longas distâncias e levados para áreas onde não há incidência de doenças (COSTA et al., 2020).

Existem diversos fungos e oomicetos que afetam as sementes de milho são: *Aspergillus flavus*, *Fusarium verticillioides*, *F. subglutinans*, *F. proliferatum*, *Stenocarpella maydis* e *S. macrospora* (BENEDIT, 2016). *Pythium* spp., *D. maydis*, *Rhizoctonia* sp., *Penicillium oxalicum*, *F. moniliforme* e *F. graminearum* Schwabe, quando presentes nas sementes do milho afetam a emergência e, por conseguinte a produção. Acarretam danos como podridão radicular, morte de plântulas e podridão de espiga e de colmo, e reduzem a produtividade da cultura e a qualidade dos grãos (DE CARVALHO et al., 2016; KUHNEM, 2013). Os gêneros mais importantes são *Penicillium* e *Aspergillus* (PINTO, 2006).

Um dos fungos que provocam podridão em grãos de milho é o *Aspergillus flavus*, comuns em clima seco e quente. As plantas com deficiência hídrica e nutricional são mais sensíveis. Seu desenvolvimento é favorecido por baixas umidades e geralmente são encontrados na fase de amadurecimento dos grãos, quando a lavoura está mais propensa a ataque de insetos. Seu micélio é e coloração amarelo-esverdeado e visto facilmente na superfície dos grãos (WOLOSHUK; WISE, 2011).

Fusarium moniliforme é o fungo mais frequentemente encontrado disseminado via semente (PRESTES et al., 2019). Na cultura do milho, seus principais sintomas são os colmos podres e mudanças na cor da medula, essas ficam esbranquiçadas ou de cor marrom. Quando a doença já está mais avançada pode ocasionar a quebra do colmo. Esse fungo também produz micotoxinas como a zearalenona, fumonisinas e vomitoxinas, que são prejudiciais as espigas, grãos armazenados e podem provocar a morte da plântula (BENTO et al., 2012).

O fungo *Penicillium* spp. é causador de podridão em diversos vegetais. Quando está nos grãos, também a sintetiza micotoxinas, como a ocratoxina que é nefrotóxica. Esse fungo possui a capacidade de sobreviver no solo ou grãos e é capaz de prejudicar seres humanos e animais (GARVIL; BORGES; GALVÃO, 2014).

A cultura do milho por ser prejudicada pela presença do *Penicillium* acarretando danos como: descolorações nas sementes, redução na germinação, diminui a matéria seca, produção de micotoxinas e alteração do valor nutricional. (DONATI, 2008)

Grãos contaminados com fungos também podem provocar danos à saúde de animais e humanos devido a presença de micotoxinas liberado pelos mesmos (GROMADZKA et al., 2016). Portanto, a presença desses microrganismos desvaloriza lotes de sementes e grãos (PRESTES et. Al 2019).

2.4 CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS

Um dos fatores limitantes da produção agrícola são os danos causados por doenças. Estima-se que as perdas causadas por infecções de microrganismos chegam a aproximadamente 25% por ano em todo o mundo (LUGTENBERG, 2015).

A disseminação de fitopatógenos por sementes acontece quando o patógeno se encontra aderido superficialmente, em meio de restos vegetais e de solo contaminado e aderido aos tecidos internos, infectando o embrião, e pode estar em forma propágulos como esporos, estruturas de resistência, micélio e outros (MEDEIROS et al., 2016).

Uma das medidas mais utilizadas no combate desses fitopatógenos é o controle químico, mas o custo do manejo dessas doenças é muito oneroso na produção agrícola. Além disso, a preocupação com os efeitos dos produtos químicos no ambiente e nos alimentos que serão consumidos vem crescendo, e com isso, acarretando a suspensão do registro de muito desses pesticidas. Atualmente, o interesse em substituí-los vem sendo colocado em pauta (O'BRIEN, 2017).

O mercado de biopesticidas vem crescendo a nível global, estimando-se que até 2024 atinja uma movimentação de US\$8,5 bilhões (MARKETS; MARKETS, 2019).

O controle biológico é a utilização de um organismo que não seja patogênico ao hospedeiro em questão, a fim de controlar um segundo organismo, neste caso, maléfico (MEDEIROS et al., 2018). Vale ressaltar que o biocontrole não possui o objetivo de exterminar o patógeno, mas sim em alcançar o equilíbrio entre a população do microrganismo maléfico e o seu inimigo natural, e com isso diminuir os prejuízos biológicos e econômicos de forma sustentável (GOVINDASAMY et al., 2010).

Os agentes de controle biológico acarretam distúrbios biológicos em outros organismos através de mecanismos como antibiose, competição, parasitismo, predação, entre outros (FERREIRA; BETTIOL, 2019).

A antibiose envolve a síntese por um microrganismo de compostos tóxicos, capazes de inibir a capacidade de crescimento e/ou até de provocar a morte do microrganismo. Atuam de maneira similar à de um fungicida químico, porém um único microrganismo pode produzir mais de uma substância e possui mecanismo de autorregulação (ARIZA, 2012).

Competição é quando dois organismos ocupam o mesmo sítio, ambos competem por espaço e/ou nutrientes, e desta forma um organismo pode sair prejudicado pela ação do outro. A competição pode ser utilizada como uma forma de controle do organismo invasor desde que o agente de controle biológico seja capaz de crescer mais rápido que o patógeno, ocupando o tecido da planta hospedeira impedindo que outro microrganismo o colonize (SHARMA, 2009).

Parasitismo é quando um organismo parasita o outro, obtendo os nutrientes do organismo hospedeiro, podendo ou não ser fatal para o organismo parasitado. Na predação, todo ou parte do organismo é ingerido por outro organismo (WU et al., 2016).

A indução de resistência é basicamente a ativação de formas de resistência na planta por ação de agentes indutores químicos ou físicos. Os agentes biológicos servem como elicitores de moléculas que atuam no mecanismo de defesa da planta (CAWOY et al., 2014).

Em 2018, o mercado brasileiro de controle biológico apresentou um crescimento de 77%. Dentro dos produtos biológicos, os fungicidas biológicos tiveram um crescimento de 148% no mesmo ano. Infelizmente, os biopesticidas ainda representam menos de 20% de todo o mercado de químicos da agricultura (BETTIOL et. al, 2019).

2.4.1 O gênero *Trichoderma*

Os fungos do gênero *Trichoderma* pertencem ao Filo Ascomycota; subfilo: Pezizomycotina; classe: Sordariomycetes; subclasse: Hypocreomycetidae ordem: Hypocreales subordem: Hypocreacea. Atualmente, encontram-se descritas mais de 450 espécies dentro do gênero *Trichoderma* (MYCOBANK, 2021).

Esses fungos são saprófitas, de vida livre e considerados cosmopolitas, podendo sobreviver e se desenvolverem em diversos substratos (ATANASOVA et al., 2013).

Fungos do gênero *Trichoderma* possuem um crescimento micelial rápido, tanto na natureza quanto em laboratório. A colônia apresenta uma coloração branca, e ao se desenvolverem é possível notar o aparecimento de tufos em forma de anéis de coloração verde amarelada a verde escura. Possuem conídios verdes ou hialinos, com paredes rugosas ou lisas, os conidióforos são ramificados e variam de acordo com a espécie (JAKLITSCH; VOGLMAY, 2015).

Os fungos do gênero *Trichoderma* são capazes de controlar diversos organismos fitopatogênicos, como por exemplo bactérias, nematoides e fungos, inibindo seu crescimento de forma direta através de mecanismos como hiperparasitismo, competição e antibiose (ZHANG et. al, 2017), e indiretamente, promovendo o crescimento e o vigor da planta, aumentando a tolerância ao estresse e a absorção de nutrientes, biorremediação de rizosfera contaminada e fornecendo às plantas diversos metabólitos secundários, enzimas e proteínas (KUMAR et. al, 2013).

Trichoderma spp. é considerado um competidor agressivo, devido ao seu rápido crescimento vencendo o patógeno na competição por nutrientes, luz, espaço e outros (SILVA et al. 2020). *Trichoderma* spp. possuem uma grande capacidade de mobilizar e absorver nutrientes do solo em comparação com outros microrganismos. Estudos de Nirmalkar et al., (2017) comprovaram que o uso de *T. harzianum* no tratamento de sementes de grão de bico, foi capaz de controlar patógenos de solo, causadores de murcha como o *F.oxysporum* e *R. solani*.

A antibiose por metabólitos secundários também é um dos mecanismos de controle de *Trichoderma*. Estes compostos de baixo peso molecular são difusíveis e exercem uma atividade inibitória de microrganismos. Já foram encontrados mais de 180 metabólitos secundários isolados de espécies de *Trichoderma* indicando classes distintas de produtos químicos sintetizados pelo fungo (MASI et. al, 2018). Esses metabólitos secundários do gênero *Trichoderma* são uma variedade de moléculas voláteis e não voláteis que agem de forma isolada ou concomitantemente (JELEŃ, BŁASZCZYK, et al., 2014).

Trichoderma spp. possuem a capacidade de sintetizar uma classe de metabólitos defensivos classificados de acordo com o seu local de produção, chamados de policetídeos, peptaibols e terpenos (HU et. al, 2017).

Os compostos produzidos por *Trichoderma*, demonstraram a capacidade de reduzir o crescimento micelial de alguns fitopatógenos de solo como *Sclerotium rofsii* (ABDUL; ALTINOK, 2019). Em estudo de Azevedo et al. (2020), os compostos voláteis apresentados por *Trichoderma* sp. também foram capazes de inibir o crescimento micelial de *Fusarium* spp.

Esses compostos são considerados um importante mecanismo de biocontrole do gênero *Trichoderma* imposto como um dos parâmetros para a determinação de linhagens desses fungos como agentes de biocontrole em produtos comerciais (KADDES et al., 2019).

Diversos estudos mostram que isolados de *Trichoderma* atacam e desintegram fungos fitopatogênicos por meio do micoparasitismo, como por exemplo, *R. solani*, *A. alternata*, *S. sclerotiorum*, *Fusarium* spp., *B. cinerea*, *Pythium* spp. e *U. maydis* (HARWOKO et al, 2021).

O processo do micoparasitismo do *Trichoderma* inclui eventos sequenciais: primeiramente, a identificação entre *Trichoderma* e o fungo a ser parasitado acontece através da ligação de carboidratos presentes na parede celular dos *Trichoderma* e as lectinas presentes no fungo hospedeiro. Em seguida acontece o enovelamento e desenvolvimento do apressório, que envolve um maior número de compostos osmóticos como o glicerol. Após a penetração bem-sucedida, o *Trichoderma* inicia o ataque ao conteúdo celular do hospedeiro através da geração de São enzimas degradadoras de parede celular, como glucanases, quitinases e proteases. A ação simultânea dessas enzimas causa a dissolução das paredes celulares do hospedeiro, o que acaba resultando no parasitismo do fungo alvo. *Trichoderma* spp. não apenas degradam a parede celular do fungo, mas também inativam enzimas, essenciais do fungo fitopatogênico para colonizar e penetrar nos tecidos vegetais (HARMAN et. al, 2004).

A adição de diferentes espécies de *Trichoderma* na rizosfera de uma planta melhorou a defesa da planta contra vários organismos patogênicos, estimulando de diferentes mecanismos de resistência como a resistência sistêmica induzida, resposta de hipersensibilidade e resistência sistêmica adquirida (HARMAN et. al, 2004).

A indução de resistência acontece devido ao aumento das respostas de defesa da planta, como as enzimas quitinases e glucanases e a biossíntese de fitoalexinas (KADDES et. al, 2019).

O tratamento com *Trichoderma longibrachiatum*, cepa H9 em pepineiros inibiu significativamente o fungo patogênico *Botrytis cinerea*. As análises de transcriptoma e proteoma da planta indicaram que muitos genes diferencialmente expressos (DEGs) e proteínas diferencialmente expressas (DEPs) foram identificados em plantas de pepino 96 h após a inoculação. DEGs e DEPs regulados positivamente foram associados principalmente a processos de defesa/estresse, metabolismo secundário e síntese e sinalização de fitohormônios, incluindo ácido jasmônico (JA), etileno (ET) e ácido salicílico (SA) em plantas de pepino microbiolizadas com a cepa H9 em comparação com plantas não tratadas (YUAN et al. 2019).

Os produtos existentes a base de *Trichoderma* no mercado são muito eficazes no combate de fitopatógenos de solo, como por exemplo fungos dos gêneros *Fusarium*, *Rhizoctonia*, dentre outros e oomicetos como *Pythium*. Geralmente esses produtos são empregados no tratamento de semente, apresentando formulações como pó molhável, grânulos dispersáveis em água e líquida (BETTIOL; MORANDI, 2009).

Em abril de 2022, no Brasil, existem registrados um total de 40 produtos à base de *Trichoderma*, 25 desses à base de *T. harzianum*, doze à base de *T. asperellum*, um à base de *T. stromaticum*, um de *T. afroharzianum* e um de *T. endophyticum* (AGROFIT, 2022).

2.4.2 O gênero *Bacillus*

O gênero *Bacillus* pertence ao reino Bactéria, filo Firmicutes, classe Bacilli, ordem Cariofanais, família Bacillaceae. Já foram descritas aproximadamente 614 espécies do Gênero *Bacillus*, conforme o Manual de Bergey's, responsável pela classificação dos procariotos (LPSN, 2022).

O nome *Bacillus*, vem da morfologia da bactéria, que é caracterizada pela forma de bastão ou bastonete. São bactérias gram positivas, aeróbias facultativas ou obrigatórias, possuem a capacidade de sintetizar a enzima catalase. Podem se desenvolver em diferentes fontes de carbono. São capazes de formar endósporos, que são estruturas de resistência responsáveis pela sobrevivência em condições desfavoráveis (MADIGAN et al., 2016).

É possível encontrar espécies de *Bacillus* em diversos nichos ecológicos, como ambientes aquáticos (MIRANDA et al., 2008), em diferentes tecidos de plantas e em ampla gama de temperaturas (LOGAN et al., 2000).

A mais importante e mais estudada aplicação de *Bacillus* na agricultura é como agentes de biocontrole (CLEMENTE et al., 2016).

As bactérias do gênero *Bacillus* destacam-se como agentes de biocontrole, pois além da capacidade de formação de endósporos, possuem diversos mecanismos de ação para o controle de fitopatógenos, tais como, parasitismo, predação, antibiose através da produção de lipopeptídeos cíclicos, e metabólitos secundários (ALI, et al., 2015).

O gênero *Bacillus* sintetizam vários tipos de lipopeptídeos, metabólitos secundários, que atuam contra fitopatógenos de plantas. Entre eles, alguns peptídeos que possuem propriedades antifúngicas. Alguns peptídeos estão envolvidos na desintegração de órgãos intracelulares, como ácido nucléico e mitocôndria (ZHAO et al, 2013).

Além da produção de diferentes materiais surfactantes, as espécies de *Bacillus* produzem muitos lipopeptídeos anfifílicos e surfactantes potentes que compreendem, bacilomicinas, iturinas e micossutilina e também podem produzir fengicinas ou plipastatina (GONG et al, 2015).

Os lipopeptídeos sintetizados por *Bacillus* possuem propriedades físico-químicas que atuam na desestruturação das bicamadas lipídicas e declínio da tensão superficial (SHAFI; TIAN, 2017).

A bacilomicina-D produzida por *Bacillus subtilis* foi considerada eficaz contra *Aspergillus flavus*, provocando lesões graves na parede celular e na membrana celular de esporos e hifas. Em microscopia eletrônica foi possível notar a formação de buracos por exsudação de citoplasma e organelas celulares. A bacilomicina purificada inibiu significativamente a germinação de esporos em 96,63% e a esporulação em 98,10% (GONG et al, 2014).

Uma outra forma das espécies de *Bacillus* atuarem no controle de doenças é através da ativação do mecanismo de resistência sistêmica das plantas. Os *Bacillus* possuem a capacidade de interferir na produção de fitohormônios, que possuem uma importante função de transdução de sinais e ativação dos genes de defesa da planta contra o ataque de fitopatógenos (SHAFI; TIAN, 2017).

A utilização de suspensão de células de *Bacillus* sp. com 72 h de vida foi responsável pelo controle de *C. acutatum* em sementes de trevoço de 8,5-9,4% em sementes não tratadas para 0,4-1,0% nas sementes tratadas (YÁNEZ-MENDIZÁBAL; FALCONÍ, 2018).

Sementes de feijão tratadas com suspensão de células de *Bacillus* sp. cepa B19, *Bacillus* sp. cepa P12 proporcionaram aumento das taxas de germinação em 14,5%, aumentaram o comprimento da raiz entre 10,4 e 15%, o comprimento do caule entre 20,2 e 30% (SABATÉ et al., 2018).

2.5 MICRORGANISMOS PROMOTORES DE CRESCIMENTO

Os microrganismos promotores de crescimento de plantas são um grupo de microrganismos benéficos às plantas em virtude da capacidade de colonizar a rizosfera, a filosfera e os tecidos internos das plantas (DAVISON, 1988; KLOEPPER et al., 1989).

Em geral, acredita-se que os microrganismos promotores de crescimento de plantas beneficiam o crescimento das plantas por uma combinação de diversos mecanismos (DOBBELAERE et al., 2003). A promoção de crescimento é um tipo de interação planta-microrganismo, considerada uma relação simbiótica, as bactérias são beneficiadas, pois se encontram protegidas dentro dos tecidos internos da planta (RAO, 2014) em troca, as bactérias fixam o N₂ da atmosfera para as plantas, produzem fitohormônios como auxinas (SOUZA; AMBROSINI; PASSAGLIA, 2015), produzem sideróforos (PANDEY et al., 2017), solubilizam P e K (MUTHUKUMARASAMY et al., 2017), colaboram no processo de germinação (GAIERO et al., 2013) e aumentam a atividade da redutase do nitrato (CASSÁN et al., 2008).

O gênero *Bacillus*, compreende bactérias gram-positivas, não patogênicas. São microrganismos estudados para promover o crescimento de plantas através da produção de metabólitos secundários, esporulação, desenvolvimento de biofilme, fixação às raízes das plantas e outros (HASHIM, et al., 2019).

Bacillus subtilis possui diversos mecanismos diretos e indiretos para promover o crescimento das plantas e conseqüentemente o rendimento das culturas, através da melhoria da disponibilidade de nutrientes, alterando a homeostase do

hormônio de crescimento das plantas e reduzindo a gravidade dos estresses abióticos (BLAKE et al, 2021).

Bacillus spp. sintetiza metabólitos que possuem a capacidade de aumentar a disponibilidade de nutrientes para as plantas e promove diretamente o crescimento e o rendimento das plantas (SOUZA, 2015).

Bactérias do gênero *Bacillus* produz a enzima nitrogenase, catalizadora da reação que converte o (N₂) presente na atmosfera e não disponível as plantas, em amônia (NH₃) disponível para absorção das plantas, aumentando significativamente o teor de N total e a biomassa seca de plantas de milho (KUAN, 2016).

Bacillus megaterium, *B. subtilis* e *B. simplex*, demonstraram capacidade solubilizante de P através da produção de ácido acético, propiônico, isobutírico, isocapróico, caprúico e heptanóico, e apresentam efeitos positivos na germinação de sementes e parâmetros de crescimento vegetativo de berinjela, pimenta e tomate (BAHADIR, 2018).

A produção de fitohormônios também é uma forma de microrganismos como *Bacillus* spp. promover o crescimento de plantas, como por exemplo com a produção de ácido indol acético, giberelinas, citocininas e etileno (MILJAKOVIĆ, 2020).

O uso de *Bacillus subtilis* aumentou o vigor de plântulas, comprimento de raízes e área foliar de tomate, as plantas tratadas apresentaram altos níveis de giberelinas e de ácido indol acético (CHOWDAPPA, 2013).

Em estudos de Jiang et al. (2018) as cepas de *B. velezensis* 5YN8 e DSN012 aplicados em forma de suspensão de células na raiz, foram capazes de promover o crescimento de mudas de pimenta. as plantas tratadas apresentaram maior número de folhas, diâmetro de caule e também aumentam o teor de clorofila, apresentando plantas mais verdes.

Sementes de feijão tratadas com suspensão de células de *Bacilo* sp. cepa B19, *Bacillus* sp. cepa P12 proporcionaram aumento das taxas de germinação em 14,5%, aumentaram o comprimento da raiz entre 10,4 e 15%, o comprimento do caule entre 20,2 e 30% (SABATÉ et al., 2018).

Os fungos do gênero *Trichoderma* também são capazes de promover o crescimento de plantas estimulando a síntese de ácido indol acético e hormônios semelhantes. Os metabólitos secundários de *Trichoderma* responsáveis pela

promoção de crescimento são koningininas, pironas, peptaibols, dicetopiperazinas, terpenoides, policetídeoostriocaranos A–D, harzianopiridona cicloneerodiol, harzianolide e ácido harziânico (PATIL, et al., 2016).

Devido ao seu rápido crescimento, *Trichoderma* é capaz de colonizar a rizosfera das plantas rapidamente e atuar como estimulante de raízes, promovendo o crescimento vegetal (GOMES et al., 2015). Também atuam na decomposição de matéria orgânica, e na mineralização de nutrientes presentes no solo (MAZA et al., 2014).

As hifas dos *Trichoderma* secretam compostos que promovem a ramificação das raízes, aprimorando assim a absorção de nutrientes e água (GARNICA-VERGARA et al., 2016).

Em estudos de Meng et al., (2019) o isolado de *Trichoderma guizhouense* NJAU4742, se mostrou responsável pela produção de uma proteína TgSWO, envolvida no crescimento e desenvolvimento do sistema radicular. Foi observado modificações na parede celular das raízes de pepino, proporcionando melhor desenvolvimento e crescimento nas plantas tratadas.

Quando presente na rizosfera e nos tecidos internos vegetais *Trichoderma* é capaz de aumentar a tolerância da planta a estresses bióticos e abióticos (VERMA et al., 2021).

Estudos mostraram que plantas de colza (*Brassica napus* L.) microbiolizadas com *Trichoderma parareesei* apresentaram alta tolerância ao estresse oxidativo, salino e hídrico. Através da inoculação radicular, as plantas de colza também obtiveram um rendimento maior em comparação com as plantas não tratadas. O fungo atuou aumentando a expressão de genes relacionados às vias hormonais do ácido abscísico, conseqüentemente melhorando a resistência da planta ao estresse hídrico, uma vez que o ABA é o hormônio responsável pela abertura estomática (POVEDA, 2020).

3. ARTIGO A

EFICIÊNCIA DE *Bacillus* e *Trichoderma* NO TRATAMENTO DE SEMENTES DE MILHO DOCE PARA CONTROLE DE FITOPATÓGENOS E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO

RESUMO

O milho doce possui grãos com pericarpo mais fino, maior teor de açúcar e menor teor de amido do que os grãos de milho comum e por isso suas sementes são mais susceptíveis ao ataque de fitopatógenos tornando importante o tratamento de sementes para implantação da cultura. Com o aumento da procura pelos consumidores por produtos livres de agrotóxicos, o controle biológico tem se tornado uma alternativa aos fungicidas químicos pois é um método de controle mais seguro de para a saúde humana e o meio ambiente. Fungos do gênero *Trichoderma* e bactérias do gênero *Bacillus* são amplamente empregados no controle de fitopatógenos, inclusive no tratamento de sementes. Neste sentido, o objetivo deste trabalho, foi avaliar dez isolados de *Trichoderma asperellum* (T2, T7, T20, T26, T37, T38, T41 e T70), um de *Trichoderma asperelloides* (T25), um de *Trichoderma* sp. (T24) e três cepas de *Bacillus* (LAFUEL 01, LAFUEL 02 e LAFUEL 03) no controle de fitopatógenos da semente, bem como o efeito dos agentes de controle biológico sobre a germinação e o crescimento inicial de plântulas de milho doce. O antagonismo de isolados de *Trichoderma* sp. e *Bacillus* sp. foi avaliado através de testes de confronto direto e teste de difusão em ágar de sobrenadante livre de células (SLC) das cepas de *Bacillus*. Os agentes de controle biológico também foram testados em experimentos de casa de vegetação via microbiolização de semente, para avaliação dos efeitos sobre a germinação e o crescimento inicial de plântulas de milho doce. Os experimentos *in vitro* foram em delineamento inteiramente casualizado e os experimentos *in vivo* foram em delineamento de blocos casualizados. Os patógenos de semente (*Fusarium* sp., *Acremonium strictum*, dois isolados de *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp.) foram isolados de maneira direta de sementes de milho doce. Os dados foram avaliados quanto a normalidade dos dados (teste de Shapiro-Wilk) e homogeneidade das variâncias (teste de Bartlett) e submetidos à análise de variância e se constatado efeitos significativos, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ou Scott Knott a 5% de probabilidade. Nos testes de confronto direto todos os isolados de *Trichoderma* apresentaram fungitoxicidade variando de 31 a 59,8% de inibição no experimento 1 e de 45,8 a 73,8% no experimento 2, dependendo dos patógenos confrontados. As cepas de *Bacillus* inibiram o crescimento dos patógenos de semente em níveis entre 44,7 e 76 % (exp.1) e entre 47,6 e 78,5 (exp. 2) dependendo da cepa e o fungo confrontado. No teste de difusão em ágar o SLC do isolado LAFUEL 03 foi o que obteve melhores resultados, entretanto, nos testes *in vivo*, foi responsável por prejudicar a germinação das sementes tratadas. Sementes de milho doce tratadas com o isolado de *T. asperellum* T41, apresentaram maior germinação considerando todos os patógenos inoculados e as plântulas oriundas dessas sementes, apresentaram maior crescimento de raiz e planta inteira nos testes de promoção de crescimento.

Palavras chave: Antagonismo, biocontrole, promoção de crescimento. tratamento de sementes, *Zea mays* L. group saccharata.

ABSTRACT

Sweet corn has grains with thinner pericarp, higher sugar content and lower starch content than common corn grains and therefore its seeds are more susceptible to phytopathogen attack, making seed treatment important for crop implantation. With the increase in consumer demand for pesticide-free products, biological control has become an alternative to chemical fungicides as it is a safer control method for human health and the environment. Fungi of the genus *Trichoderma* and bacteria of the genus *Bacillus* are widely used in the control of phytopathogens, including at the treatment in seeds. In this sense, the objective of this work was to evaluate ten isolates of *Trichoderma asperellum* (T2, T7, T20, T26, T37, T38, T41 and T70), one from *Trichoderma asperelloids* (T25), one from *Trichoderma* sp. (T24) and three strains of *Bacillus* (LAFUEL 01, LAFUEL 02 and LAFUEL 03) in the control of seed phytopathogens, as well as the effect of biological control agents on germination and growth Resumen initial in seedlings in corn sweet. The antagonism of isolates of *Trichoderma* sp. and *Bacillus* sp. was evaluated through direct confrontation tests and cell-free supernatant (SLC) agar diffusion test of *Bacillus* strains. Biological control agents were also tested in greenhouse experiments via seed microbiolization to evaluate the effects on germination and initial growth of sweet corn seedlings. The *in vitro* experiments were in a completely randomized design and the *in vivo* experiments were in a randomized block design. Seed pathogens (*Fusarium* sp., *Acremonium striticum*, two isolates of *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp.) were isolated directly from sweet corn seeds. Data were evaluated for data normality (Shapiro-Wilk test) and homogeneity of variances (Bartlett 's test) and submitted to analysis of variance and if significant effects were found, the means were compared by Tukey 's or Scott Knott 's test at 5 % probability. In direct confrontation tests, all *Trichoderma* isolates showed fungitoxicity ranging from 31 to 59,8% inhibition in experiment 1 and from 45,8 to 73,8% in experiment 2 depending on the pathogens confronted. *Bacillus* strains inhibited the growth of seed pathogens at levels between 44,7 and 76 % (exp.1) and between 47,6 and 78,5 (exp. 2) depending on the strain and the fungus challenged. In the agar diffusion test, the SLC of the isolated LAFUEL 03 was the one that obtained the best results, however, in the *in vivo* tests, it was responsible for harming the germination of the treated seeds. Sweet corn seeds treated with the *T. asperellum* T41 isolate showed higher germination considering all inoculated pathogens and seedlings from these seeds showed higher root and whole plant growth in the growth promotion tests.

Keywords: Biological control, growth promotion, seed treatment, *Zea mays* L. group saccharate.

INTRODUÇÃO

O milho comum e o milho doce são botanicamente semelhantes, a diferença está na presença de genes que são responsáveis pela produção de carboidratos no endosperma, os grãos do milho doce possuem elevado teor de açúcares e baixo teor de amido no endosperma (DODSON-SWENSONET; TRACY, 2015). Essas características do grão acarretam espaços entre a camada de aleurona e o pericarpo assim que o grão amadurece, isso faz com que a semente tenha uma aparência enrugada e transparente, e que tenha uma qualidade inferior a semente do milho comum. Fazem com que o pericarpo seja mais delicado, o que proporciona maiores danos mecânicos durante armazenagem e transporte e facilita a penetração de patógenos, reduzindo a taxa de germinação (ZUCARELI, 2014).

O teor de açúcar no milho comum é de 3%, no milho doce esse teor varia de 9 a 14% e de 15 a 25% no milho super doce (TEIXEIRA et al., 2014). O sabor do milho doce e a espessura do pericarpo, mais fina que a do milho comum, tornam os grãos mais macios (TRACY, 2001) e portanto, mais atrativos ao paladar humano em relação ao milho comum (PEREIRA FILHO; TEIXEIRA, 2016).

Os gastos para produzir milho doce são mais elevados devido ao custo das sementes e irrigação. Porém o preço pago pela indústria faz do cultivo do milho doce uma atividade interessante (PEREIRA FILHO; TEIXEIRA, 2016).

Os patógenos responsáveis por transmitirem doenças através das sementes de milho são: *Pythium* spp., *Diplodia maydis*, *Rhizoctonia* sp., *Penicillium oxalicum* e *Fusarium moniliforme* (DE CARVALHO et al., 2016). *F. verticillioides* e *F. graminearum*, podem afetar a emergência e, conseqüentemente a produção; provocam danos como podridão radicular, morte de plântulas e podridão de espiga e de colmo e reduzem a produtividade da cultura e a qualidade dos grãos (KUHNE, 2013).

O controle químico é o mais empregado para o controle desses fitopatógenos, porém, a preocupação com o uso de produtos químicos nos alimentos e com o dano que causam à saúde humana e ao meio ambiente vem crescendo, o que aumenta o interesse em formas alternativas para o controle de patógenos de plantas (O'BRIEN, 2017). Uma dessas alternativas é o controle biológico, o qual consiste em utilizar um organismo que não seja patogênico ao hospedeiro, com o objetivo de controlar outro organismo, no caso, patogênico (MEDEIROS et al., 2018).

Fungos do gênero *Trichoderma* são atualmente um dos mais utilizados como agentes de controle biológico podendo controlar vários fitopatógenos, como bactérias, nematoides e fungos de forma direta através de mecanismos como competição e antibiose (ZHANG et. al, 2017) e indireta, através da promoção de crescimento e do vigor da planta, proporcionando maior tolerância ao estresse e na melhoria de absorção de nutrientes (KUMAR et. al, 2013). *Trichoderma* spp. também estão envolvidos na indução de resistência aumentando as respostas de defesa da planta através do aumento na produção de enzimas quitinases e glucanases e da biossíntese de fitoalexinas (KADDES et. al, 2019).

As bactérias do gênero *Bacillus* também são cada vez mais utilizadas no biocontrole de patógenos, atuando por mecanismos como parasitismo, predação e antibiose através de metabólitos secundários (ALI, et al., 2015). Podem atuar também na promoção de crescimento de planta, proporcionando aumento na produção, aumentando a disponibilidade de nutrientes para a planta, a síntese de hormônio de crescimento e proporcionando maior tolerância aos estresses abióticos (BLAKE et al, 2021).

Existem muitos trabalhos que atestam o controle que *Trichoderma* spp. exerce sobre patógenos de plantas e no controle de doenças que estas causam em várias plantas hospedeiras. O tratamento de sementes de grão de bico com *T. harzianum*, controlou fitopatógenos de solo, como *F. oxysporum* e *R. solani* (NIRMALKAR et al., 2017). *Trichoderma* sp. também foi capaz de controlar o crescimento de *Sclerotium rofsii* (ABDUL ; ALTINOK, 2019). O isolado de *T. asperellum* GDFS1009, aplicada diretamente no solo em forma de grânulos foi capaz de controlar *F. graminearum* em plantas de milho (He et al., 2019a).

Estudos comprovam que *Trichoderma* também pode controlar outros fungos fitopatogênicos como: *R.a solani*, *A. alternata*, *S. sclerotiorum*, *cinerea*, *Pythium* spp. e *Ustilago maydis* (HARWOKO et. al, 2021).

O uso de espécies de *Bacillus* para o controle de fitopatógenos está amplamente relatado na literatura. Estudos de Deng et al. (2020) verificaram a eficiência de *B. sonorensis* cepa KLB GS-3 no controle de *Penicillium digitatum*. Foi comprovada a inibição do crescimento micelial do fungo e a redução da incidência em pós-colheita de toranja. *B. siamensis* cepa G-3, foi capaz de controlar *B. cinerea* e *Rhizopus stolonifer* em pós-colheita de frutos de framboesa (ZHANG et al. 2020).

Sementes de feijão infestadas naturalmente com *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp. e *Rhizopus* sp. quando tratadas com suspensão de células vivas de *Bacillus* sp. B19, *Bacillus* sp. P12 e *B. amyloliquefaciens* B14, não apresentaram crescimento de fitopatógenos (SABATÉ et al., 2018). O tratamento de sementes de tremoço com suspensão de células de *Bacillus* oriundas de culturas bacterianas com 72h reduziu a incidência de *Colletotrichum acutatum* de 8,5-9,4% nas sementes de tremoço não tratadas, para 0,4-1,0% nas sementes tratadas (YÁNEZ-MENDIZÁBAL; FALCONÍ, 2018).

O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito de dez isolados de *Trichoderma* e três de *Bacillus* no controle de fitopatógenos isolados de sementes de milho doce e na promoção de crescimento das plântulas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ORIGEM DOS ISOLADOS FÚNGICOS E BACTERIANOS

Três cepas de *Bacillus* sp. (LAFUEL 01, LAFUEL 2 e LAFUEL 3) e dez isolados de *Trichoderma* sp. (T2, T7, T20, T24, T25, T26, T37, T38, T41 e T70) pertencentes à coleção do Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual de Londrina, foram utilizados nos testes de antagonismo contra os fitopatógenos *Fusarium* sp. (FUS), *Acremonium stricticum* (ACR), *Aspergillus* sp. (AP1), *Aspergillus* sp. (AP2) e *Penicillium* sp. (PEN), os quais foram isolados de forma direta de sementes de milho doce.

As bactérias foram mantidas em meio Lúria Bertani a 28° C e fotoperíodo 12/12 h. Os fungos foram mantidos em tubo inclinado contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) (15 g de ágar, 20 g de dextrose, 200g de batata / L⁻¹) a 25° C e fotoperíodo 12/12 h.

4.2 ENSAIO DE ANTAGONISMO *IN VITRO*

A atividade antagonista de isolados de *Trichoderma* foi testada em ensaios de confronto direto contra os fitopatógenos em meio BDA. Discos de ágar (5 mm de diâmetro) retirados da borda de colônias com sete dias de idade de isolados de *Trichoderma* e dos isolados FUS, ACR, AP1, AP2 e PEN foram colocados em lados opostos (6 cm de distância) de placas contendo meio BDA e incubadas a 25° C e fotoperíodo de 12/12 h. As placas controle foram inoculadas apenas com os fitopatógenos.

A avaliação do antagonismo pelos isolados de *Trichoderma* spp. foi realizada após o controle completar a placa de petri, A porcentagem de inibição do crescimento micelial pelo *Trichoderma* (ICMT) foi calculada pela fórmula: $ICMT = [(r1 - r2) / r1] \times 100$ (MAYO et al. 2015). O antagonismo foi também avaliado de acordo com a classificação da escala de Bell: 1- antagonista ocupa toda a placa; 2- antagonista ocupa 2/3 da placa; 3- antagonista e patógeno ocupam metade da placa; 4- patógeno ocupa 2/3 da placa; 5- patógeno ocupa toda a placa (BELL, MARKHABELL; WELLS, 1982).

As cepas de *Bacillus* sp. foram ativadas em meio Lúria Bertani Ágar (LBA) a 28 °C por 24h. Para o teste de antagonismo, foram inoculadas em quatro pontos equidistantes nas bordas da placa contendo meio BDA, com auxílio de alça bacteriológica. Em seguida um disco micelial de 5 mm de diâmetro do fungo fitopatogênico foi inoculado no centro da placa. As placas foram incubadas a 25° C e fotoperíodo de 12/12 h. Placas somente com o fungo fitopatogênico foram utilizadas como controle.

O micélio fúngico foi medido até que o fungo no tratamento controle crescesse completamente em toda a placa de Petri. A porcentagem de inibição do crescimento micelial pelo *Bacillus* (ICMB) foi calculada através da fórmula: $ICMB = [(DTC - DT) / DTC] \times 100$. Onde, 'DTC' é o diâmetro médio da colônia no controle e 'DT', o diâmetro médio da colônia de cada tratamento (YAHYAZADEH et al., 2008).

O delineamento experimental dos experimentos de antagonismo dos isolados de *Trichoderma* e de *Bacillus* foi inteiramente casualizado em esquema fatorial com 5 repetições. Uma placa foi considerada uma repetição. Cada experimento de antagonismo foi realizado duas vezes.

4.3 OBTENÇÃO DA SUSPENSÃO DE BACTÉRIAS E DO SOBRENADANTE LIVRE DE CÉLULAS

Primeiramente as cepas de *Bacillus* foram ativadas em meio de cultura Nutriente Ágar (NA) e após 24 horas de crescimento a 28°C, foram preparadas as suspensões de células de *Bacillus* sp., LAFUEL 01, LAFUEL 02 e LAFUEL 03 em água destilada esterilizada e ajustadas em espectrofotômetro na concentração $OD_{600} = 0,3$

Para a produção de metabólitos antifúngicos, alíquotas de 1% (v/v) das suspensões de *Bacillus* foram transferidos para frascos erlenmeyer de 250 mL, contendo 125 mL de meio Caldo Nutriente (NB). A incubação foi realizada em shaker orbital a 28°C e 200 rpm por 72 h. Após incubação, as culturas foram centrifugadas a 4° C e 9000 rpm por 10 min e filtradas em membrana de 0,22 µm para obtenção do sobrenadante livre de células (SLC).

4.4 TESTE DE DIFUSÃO EM ÁGAR

Os fungos fitopatogênicos foram repicados em meio BDA em placas de Petri de 90 mm de diâmetro e incubados a 25° C e fotoperíodo de 12/12 h. Disco de micélio de 6 mm de diâmetro foi retirado de cada fitopatógeno e inoculado no centro de outra placa. Na borda da placa foram realizados, de forma equidistantes, quatro poços de 6 mm de diâmetro onde foram pipetados 200 µL do SLC.

As placas foram incubadas a 25° C e fotoperíodo de 12/12 h. Como controle foram utilizadas placas somente com o fungo fitopatogênico. Após cinco dias foi determinado o diâmetro da colônia fúngica. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 4 repetições e o experimento foi realizado duas vezes.

4.5 CONTROLE DOS FUNGOS FITOPATOGÊNICOS

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, localizada na Universidade Estadual de Londrina, em Londrina, no estado do Paraná. O delineamento experimental foi em blocos casualizados, com cinco repetições. O experimento foi realizado duas vezes.

4.5.1 Inoculação de sementes com os fungos fitopatogênicos

Para obtenção de sementes inoculadas pelos fitopatógenos, foi usada a técnica de restrição hídrica utilizando-se meio BDA + manitol. Foram adicionados 73,54 g de manitol a 1000ml de BDA, para atingir o potencial hídrico de -0,4 MPa. Após 10 dias de cultivo do fitopatógeno nas placas de 9 cm de diâmetro com seis discos por placa e constatada a colonização total da superfície do meio, as placas receberam sementes de milho doce previamente desinfestadas (1 minuto com hipoclorito de sódio 1%, lavadas duas vezes por 1 minuto em água destilada esterilizada e submetidas à secagem em câmara de fluxo laminar por 20 minutos). As sementes foram distribuídas na superfície do meio colonizado e as placas, incubadas por 24 horas em fotoperíodo 12/12 h (BERTAGNOLLI et. al, 2017).

4.5.2 Tratamento de sementes

As sementes, cultivar da Embrapa BR400 Super-doce Havaí, produzidas pela Isla sementes foram tratadas com 2 ml de suspensão de células de

Bacillus sp na concentração $OD_{600} = 0,3$, para cada 100g de sementes. Também foi utilizado o SLC, produzido como descrito no item 4.3.

Para comparar a eficiência das cepas de *Bacillus* spp, foi utilizado o produto comercial Serenade, a base de esporos de *Bacillus subtilis* linhagem QST 713 (mínimo de 1×10^9 UFC/g de ativo), na dose de 4 a 6 l/ha de produto no sulco de plantio, para *R. solani* e fitopatógenos responsáveis por tombamento conforme o fabricante.

Para o tratamento de sementes com os isolados de *Trichoderma* spp, as colônias foram raspadas com o auxílio de uma alça estéril e o conteúdo colocado em água destilada para a obtenção da suspensão de conídios. A suspensão foi filtrada em dupla gaze e calibrada para a concentração em 10^8 conídios/ml. em câmara de Neubauer e utilizada na dosagem de 20 mL para 45 sementes (MAYO et al. 2015).

Para a comparação com os isolados de *Trichoderma* spp. foi utilizado o produto comercial ECOTRICH[®] contendo conídios de *Trichoderma harzianum* isolado IBLF 006 (1×10^{10} UFC/g de produto). Utilizou-se a recomendação do fabricante para *F. solani* f. sp. *phaseoli* e *R. solani* que é para aplicação via semente, na dose de 40 a 60 g do produto para cada 100 kg de semente, deixando agir por alguns minutos e a semeadura foi realizada em no máximo 24 horas após a inoculação.

O fungicida químico utilizado para o controle positivo foi o Vitavax (Thiram+Carboxina) que para o tratamento de sementes, é recomendado a dose de 250 a 300 mL do produto a cada 100kg de sementes, de acordo com a bula para a cultura do milho.

As sementes microbiolizadas foram semeadas em bandejas com substrato estéril, sendo 25 sementes por bandeja, aos sete dias após a emergência foram avaliadas a porcentagem de germinação.

4.6 DETERMINAÇÃO DA GERMINAÇÃO DE SEMENTES E DE PARÂMETROS DE CRESCIMENTO DE PLÂNTULAS DE MILHO DOCE

As sementes de milho doce foram esterilizadas com hipoclorito de sódio a 1% por 1 minuto e lavadas três vezes com água estéril. Após essa etapa, as sementes foram tratadas como no item 4.5.2. No tratamento controle foi utilizada água esterilizada.

O teste de germinação em papel germitest foi realizado, apenas com os isolados de *Trichoderma* para a determinação dos isolados a serem utilizados na casa de vegetação. As sementes microbiolizadas, foram distribuídas em papel filtro, 25 sementes para cada rolo e incubados em câmara de germinação a 24° C, com 55% de umidade relativa, fotoperíodo 12\12h. Após sete dias foi realizada a contagem das germinadas e determinada a taxa de germinação, plantas normais e anormais. Para cada isolado de *Trichoderma* foram realizadas quatro repetições, sendo cada rolo de papel considerado uma repetição.

Em casa de vegetação as sementes microbiolizadas foram semeadas em vasos com solo estéril. Três sementes foram colocadas por vaso e adubadas com NPK 5:25:25, na dose de 115 kg por ha. Após a emergência foram mantidas apenas duas plantas que foram conduzidas até a fase fenológica V3. Foram avaliadas a porcentagem de germinação, o comprimento da parte aérea, comprimento da raiz e para a determinação da matéria seca, as plantas foram colocadas em estufa a 60 °C para a secagem e após atingirem peso constante foi realizada a pesagem. O experimento foi realizado duas vezes, com 5 repetições.

Os dados experimentais foram avaliados quanto a normalidade (Shapiro-Wilk) e homogeneidade (Bartlett) e submetidos à análise de variância. As médias com efeitos significativos foram posteriormente comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANTAGONISMO *IN VITRO*

No primeiro experimento de confrontação direta, não houve interação entre o tratamento de sementes e os fungos fitopatogênicos (Tabela 1 e Figura 1). O crescimento micelial das duas espécies de *Aspergillus* sp. foi inibido em 59,78% e 51,20% para AP1 a AP2, respectivamente. O crescimento micelial de *Penicillium* sp. (PEN) foi inibido em 41,05%, enquanto o de *Fusarium* sp. (FUS) e *Acremonium striticum* (ACR) foi inibido em 33,59 e 31,04%, respectivamente. Os isolados de *Trichoderma* não apresentaram diferença com inibições entre 39,91 e 48,13 %.

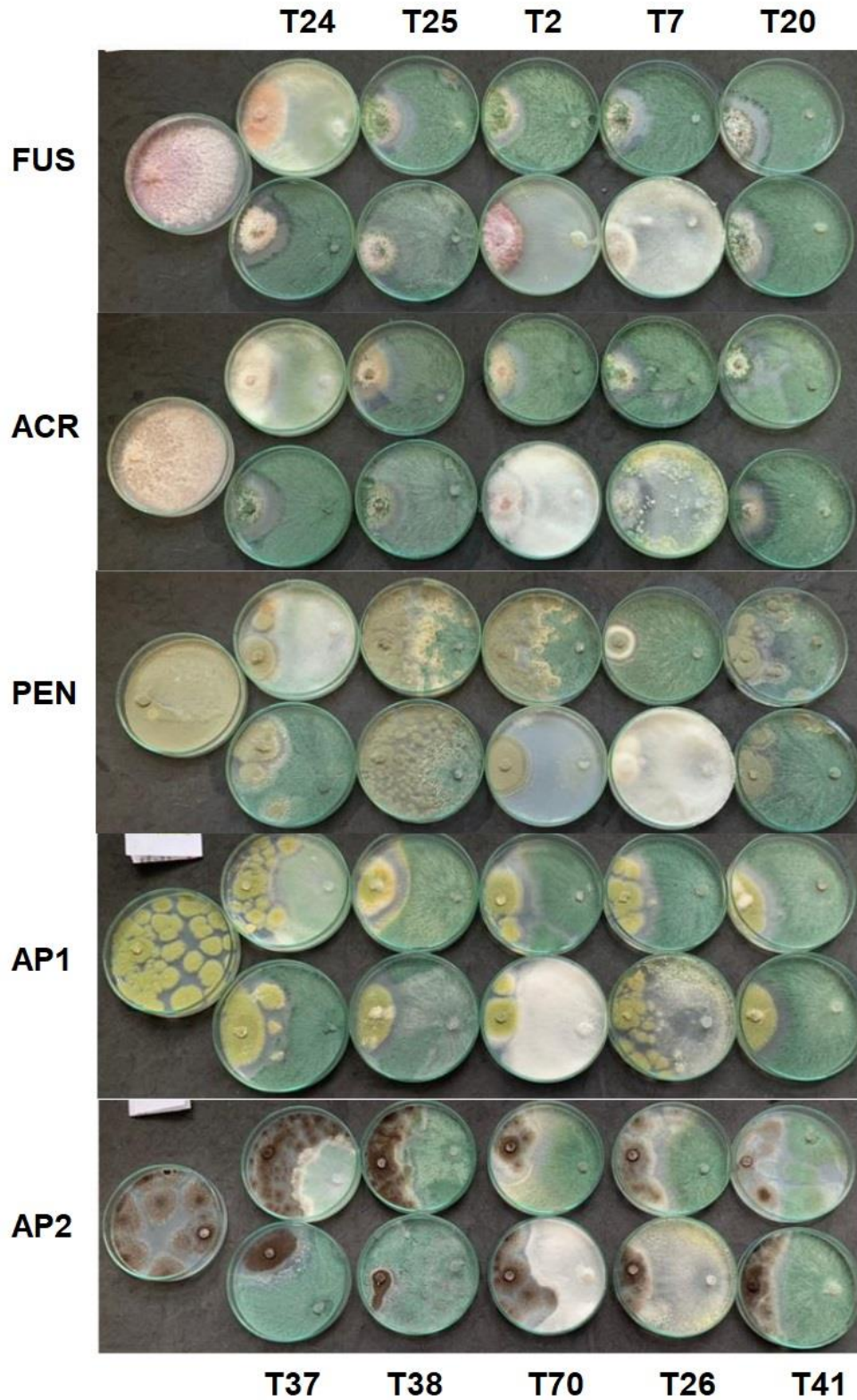
Tabela 1. Inibição do crescimento micelial (%) de *Fusarium* sp. (FUS), *Acremonium striticum* (ACR), *Aspergillus* sp. (AP1), *Aspergillus* sp. (AP2) e *Penicillium* sp. (PEN) em confrontação direta com *Trichoderma asperellum* (T2, T7, T20, T26, T37, T38, T41 e T70), *T. asperelloides* (T25) e *Trichoderma* sp. (T24).

TRAT.	FUS	ACR	AP1	AP2	PEN	MÉDIA
Experimento 1						
T2	39,85 ¹	30,14	61,26	63,16	46,25	48,13 ^{ns}
T7	29,16	18,85	52,66	70,49	39,99	42,23
T20	27,86	32,73	48,89	53,82	42,48	41,15
T24	30,92	53,80	51,20	59,71	36,38	46,40
T25	32,83	21,11	43,63	61,05	41,98	40,12
T26	38,17	38,85	43,31	61,03	37,49	43,77
T37	26,32	17,59	55,84	62,37	51,29	42,68
T38	38,75	34,44	58,32	59,97	48,52	48,00
T41	31,87	22,89	50,74	53,66	40,41	39,91
T70	40,19	40,03	46,23	52,55	25,78	40,95
MÉDIA	33,59 CD	31,04 D	51,20 B	59,78 A	41,05 C	43,33
C.V (%)	15,74					
Experimento 2						
T2	47,10 ¹ aB	42,06 aB	75,18 aA	72,00 abA	70,72 abcA	61,41
T7	45,92 aB	45,61 aB	65,63 aA	68,00 abA	69,77 abcA	58,98
T20	46,78 aC	47,74 aC	81,50 aA	67,72 abAB	53,68 cBC	59,48
T24	48,91 aB	51,00 aAB	67,51 aA	58,72 bAB	56,95 cAB	56,61
T25	47,50 aB	47,67 aB	73,09 aA	80,40 aA	68,13 abcA	63,35
T26	49,89 aB	53,58 aB	83,22 aA	72,22 abA	81,00 aA	67,98
T37	44,41 aB	46,02 aB	67,13 aA	69,27 abA	63,77 abcA	58,12
T38	57,08 aB	45,15 aB	77,22 aA	78,50 aA	58,00 bcB	63,19
T41	49,71 aB	39,91 aB	73,13 aA	69,04 abA	66,78 abcA	59,71
T70	47,04 aB	39,07 aB	74,86 aA	79,29 aA	76,72 abA	63,39
MÉDIA	48,43	45,78	73,84	71,51	66,55	61,22
C.V (%)	15,21					

^{ns}. Não significativo a pela análise de variância a 5% de probabilidade

¹Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Figura 1. *Fusarium* sp. (FUS), *Acremonium striticum* (ACR), *Aspergillus* sp. (AP1), *Aspergillus* sp. (AP2) e *Penicillium* sp. (PEN) em confrontação direta com *Trichoderma asperellum* (T2, T7, T20, T26, T37, T38, T41 e T70), *T. asperelloides* (T25) e *Trichoderma* sp. (T24).



No segundo experimento foi constatada interação significativa entre os tratamentos e os patógenos (Tabela 1). De forma geral, a maior inibição do crescimento micelial foi nos patógenos AP1 e AP2 seguida por PEN, FUS e ACR, seguindo a mesma tendência do que no experimento 1. No caso de FUS, ACR e AP1 a inibição exercida pelos isolados de *Trichoderma* foi estatisticamente igual, variando de 44,41 a 57,08% para FUS, de 39,07 a 51% para ACR e de 65,63 a 83,22% para AP1. Para AP2, os isolados T38 e T70 exerceram maior inibição. No caso de PEN, maior inibição foi exercida pelos isolados T26 e T70, estatisticamente maior que a exercida por T20, T24 e T38.

Nos experimentos de confronto direto foi avaliado também a agressividade do antagonismo segundo a escala de Bell (Tabela 2).

Tabela 2. Classificação na Escala de Bell dos isolados de *Trichoderma asperellum* (T2, T7, T20, T26, T37, T38, T41 e T70), *T. asperelloides* (T25) e *Trichoderma* sp. (T24) em confrontação direta com *Fusarium* sp. (FUS), *Acremonium striticum* (ACR), *Aspergillus* sp. (AP1), *Aspergillus* sp. (AP2) e *Penicillium* sp. (PEN). Resultados de dois experimentos.

Isolado	FUS	ACR	AP1	AP2	PEN
T24	1 ¹	1	2	2	2
T41	1	1	2	2	2
T20	1	1	2	2	2
T70	1	1	2	2	2
T26	1	1	2	2	2
T38	1	1	2	2	2
T2	1	1	2	2	2
T25	1	1	2	2	2
T7	1	1	2	2	2
T37	1	1	2	2	2

¹Escala de Bell: 1- antagonista ocupa toda a placa; 2- antagonista ocupa 2/3 da placa; 3- antagonista e patógeno ocupam metade da placa; 4- patógeno ocupa 2/3 da placa; 5- patógeno ocupa toda a placa.

Nos dois experimentos, os isolados de *Trichoderma* obtiveram a mesma nota na Escala de Bell. Contra FUS e ACR apresentaram nota 1, ou seja, os diferentes isolados de *Trichoderma* foram capazes de crescer sobre o crescimento micelial desses patógenos, ocupando toda a placa. No caso do confronto contra AP1, AP2 e PEN, a nota dos isolados de *Trichoderma* foi 2, pois mesmo sendo capazes de crescer mais que os fitopatógenos, seu crescimento ocupou 2/3 da placa sendo detido de encontro com o crescimento micelial dos patógenos.

Os *Trichoderma* reduzem o crescimento micelial de vários fungos patógenos de solo tais como *Sclerotium rofsii* (ABDUL; ALTINOK, 2019), *Rhizoctonia solani* (MAYO et al., 2020), *Fusarium verticillioides* (VEENSTRA et al., 2019) e *Pythium* spp. (BIAM et al, 2019), dentre outros.

Fungos do gênero *Trichoderma* são competidores agressivos, competindo com o patógeno principalmente por nutriente, luz e espaço (SILVA et al. 2017). O crescimento micelial dos fungos patógenos é afetado principalmente porque a maioria dos isolados de *Trichoderma* sp. apresentam um crescimento muito rápido e agressivo em meio de cultura. Uma vez que os nutrientes são limitados, aquele com maior crescimento é capaz de absorver maior quantidade e se torna mais competitivo (MARTINS et al., 2018).

Em estudo de Azevedo et al. (2020), os metabólitos secundários produzidos por *Trichoderma* sp. também foram um dos mecanismos capazes de inibir o crescimento micelial de *Fusarium* spp. Os compostos sintetizados pelo gênero *Trichoderma* como: pironas, terpenos, álcoois, cetonas, xantonas, alcanos, alcenos e fenóis são derivados de diversas vias metabólicas do fungo (KADDES et al., 2019).

Em estudos de Aoyagi et al. (2021) foi verificado que o crescimento de *T. harzianum* cepa TCA5 sobre *F. oxysporum* e *B. cinerea*, recebeu nota 1 na escala de Bell, o que o classifica como muito competitiva. A capacidade do *Trichoderma* sobre crescer sobre fungos patógenos foi comprovada no confronto direto com *Sclerotium rofsii* (SILVA et al., 2017).

Trichoderma sp. identificam estímulos químicos sintetizados pelas hifas de fungos fitopatogênicos e crescem em sua direção para parasitar e utilizar o conteúdo do hospedeiro como fonte de nutrientes. De forma geral, as enzimas como quitinases, proteases e β -1,3-glucanases, destroem a parede celular do fungo possibilitando que *Trichoderma* penetre o patógeno e realize a antibiose através de metabólitos secundários (CONSOLO et al., 2012; GERALDINE et al., 2013).

Os metabólitos secundários encontrados no gênero *Trichoderma* são moléculas voláteis e não voláteis que podem atuar sozinhas ou em conjunto (JELEŃ, BŁASZCZYK, et al., 2014). São exemplos, as quinonas, pironas, terpenoides, esteroides (REINO et al., 2008), gliotoxinas, gliovirinas (HOWELL, 1991) e os peptídeos antibióticos, denominados de peptaibols (DANIEL; RODRIGUES FILHO, 2007).

No confronto direto entre *Bacillus* e os fungos fitopatogênicos, foi constatada interação significativa entre as cepas de *Bacillus* e os fitopatogênicos, nas duas repetições (Tabela 3 e Figura 2).

No primeiro experimento, as três cepas de *Bacillus* sp. apresentaram estatisticamente a mesma inibição para cada patógeno. De forma geral o PEN (72,37 a 76,04%) foi o mais inibido, seguido por FUS (48,89 a 54,10%), ACR (50,41 a 53,61%), AP1 (44,67 a 49,01%) e AP2 (47,91 a 51,80%).

Tabela 3. Inibição do crescimento micelial (%) de *Fusarium* sp. (FUS), *Acremonium strictum* (ACR), *Aspergillus* sp. (AP1), *Aspergillus* sp. (AP2) e *Penicillium* sp. (PEN) em confrontação direta com *Bacillus* sp. LAFUEL 01, LAFUEL 02 e LAFUEL 03.

TRAT.	FUS	ACR	AP1	AP2	PEN
Experimento 1					
LAFUEL 01	50,27 ¹ aB	50,41 aB	44,67 aB	50,06 aB	72,37 aA
LAFUEL 02	54,10 aB	53,61 aB	46,49 aC	51,80 aBC	75,34 aA
LAFUEL 03	48,89 aB	51,45 aB	49,01aB	47,91 aB	76,04 aA
C.V (%)	5,67				
Experimento 2					
LAFUEL 01	47,77 aB	47,63 aB	48,75 aB	49,58 bB	72,81 aA
LAFUEL 02	57,63 aB	56,52 aB	51,53 aB	60,27 aB	76,66 aA
LAFUEL 03	52,77 aB	54,58 aB	47,50 aB	58,02 aB	78,52 aA
C.V (%)	12,39				

¹Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

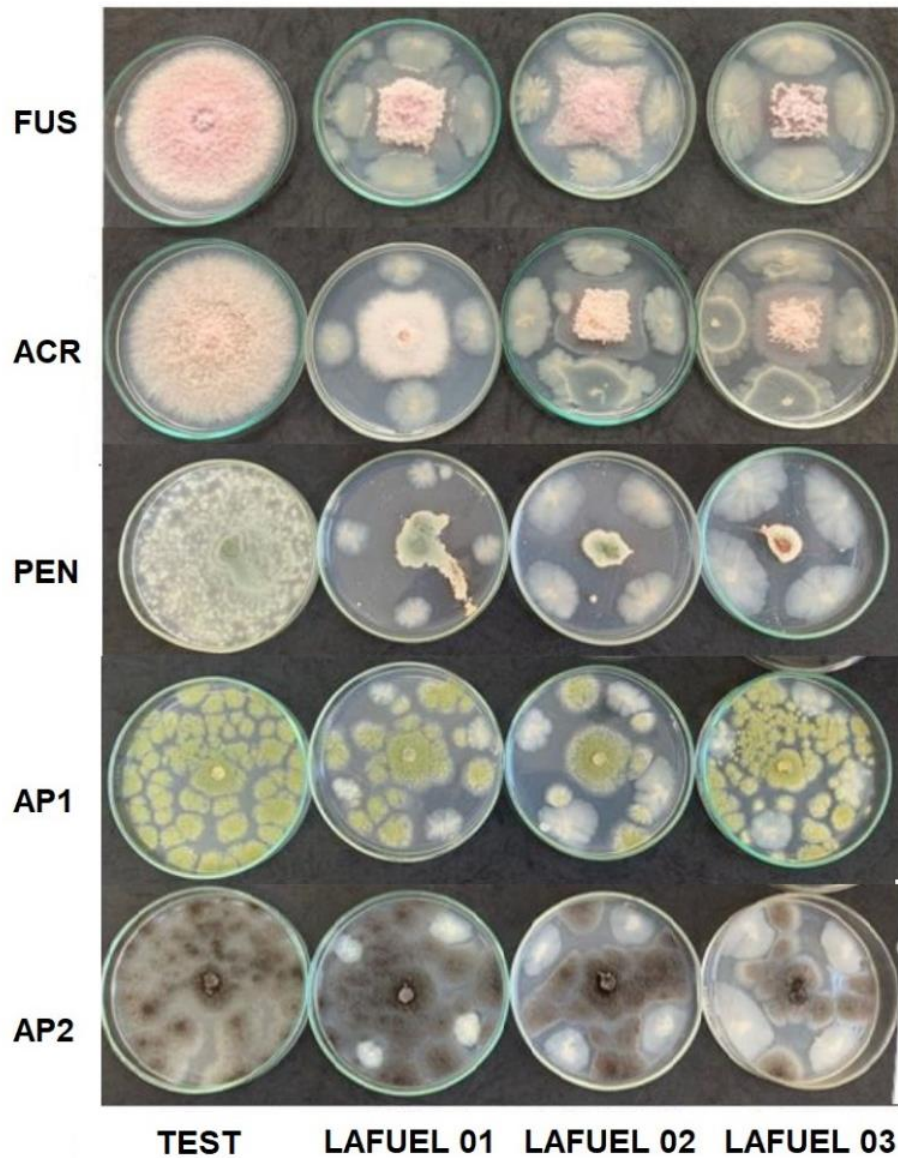
No segundo experimento o PEN (72,81 a 78,52%) novamente foi o patógeno mais afetado pelas cepas de *Bacillus*, os demais FUS (47,77 a 57,63 %), ACR (47,63 a 56,52 %) e AP1 (47,50 a 51,53 %) não se diferiram estatisticamente, apenas AP2 foi menos controlado pela cepa LAFUEL 01 com 49,58% de inibição, LAFUEL 02 (60,27%) e LAFUEL 03 (58,02%).

O índice de velocidade do crescimento micelial dos fitopatogênicos em confrontação direta com *Bacillus* sp. também foi avaliado e está apresentado na Tabela 4.

No primeiro experimento, FUS apresentou um crescimento mais lento quando em confronto com o isolado LAFUEL 02 e PEN teve a sua velocidade de crescimento mais reduzida pela cepa LAFUEL 03. Para os demais patógenos, ACR, AP1 e AP2, as cepas de *Bacillus* não foram diferentes estatisticamente, porém

interferiram a velocidade crescimento dos patógenos, com médias menores estatisticamente que as médias do controle.

Figura 2. Confronto direto de *Fusarium* sp. (FUS), *Acremonium striticum* (ACR), *Aspergillus* sp. (AP1), *Aspergillus* sp. (AP2) e *Penicillium* sp. (PEN) em confronto direto com *Bacillus* sp. LAFUEL 01, LAFUEL 02 e LAFUEL 03.



No segundo experimento, PEN foi o patógeno que reduziu mais o seu crescimento pelo antagonismo das cepas de *Bacillus*, que foram diferentes entre si. Os fitopatógenos FUS e ACR, tiveram velocidades de crescimento semelhantes, todas as cepas de *Bacillus* diminuíram de forma similar a velocidade do crescimento desses patógenos. AP2 e AP1 tiveram o maior índice velocidade de crescimento micelial em comparação com os outros fungos. AP1 cresceu mais lentamente sob a influência das

três cepas de *Bacillus*, mas apenas a cepa LAFUEL 03 reduziu a velocidade de crescimento micelial de AP2.

Bactérias do gênero *Bacillus* são considerados bons agentes de biocontrole principalmente pela sua capacidade de produzir endósporos de resistência e lipopeptídeos antimicrobianos (CAVAGLIERI et al., 2005). Os lipopeptídeos conseguem interagir com a parte hidrofóbica da membrana plasmática do fungo, o que acarreta no afrouxamento dos lipídeos da parte superior da bicamada, ocorrendo sua desestabilização, provocando o surgimento de buracos que fazem com que ocorra interferência no fluxo dos íons através das membranas, procedendo do rompimento da membrana e conseqüente morte celular (BALLEZA, ALESSANDRINI e GARCÍA, 2019).

Tabela 4. Índice de velocidade do crescimento micelial de *Fusarium* sp. (FUS), *Acremonium striticum* (ACR), *Aspergillus* sp. (AP1), *Aspergillus* sp. (AP2) e *Penicillium* sp. (PEN) em confrontação direta com *Bacillus* sp. LAFUEL 01, LAFUEL 02 e LAFUEL 03.

TRAT.	FUS	ACR	AP1	AP2	PEN
Experimento 1					
CONTROLE	2,41 ¹ aC	2,57 aBC	3,18 aB	3,87 aA	2,75 aBC
LAFUEL 01	1,88 abA	1,85 bA	1,91 bA	2,05 bA	1,46 bA
LAFUEL 02	1,68 bAB	1,55 bAB	1,72 bAB	2,04 bAB	1,15 bB
LAFUEL 03	1,92 abAB	1,43 bBC	1,77 bABC	2,38 bA	1,22 cB
C.V (%)	16,82				
Experimento 2					
CONTROLE	2,58 aB	2,68 aB	3,20 aA	2,97 aAB	3,38 aA
LAFUEL 01	1,78 bB	1,84 bB	2,17 bBC	2,58 abA	1,04 bC
LAFUEL 02	1,90 bB	1,96 bB	2,29 bAB	2,56 abA	0,98 bC
LAFUEL 03	1,99 bAB	1,94 bB	2,36 bAB	2,41 bA	1,09 bC
C.V (%)	10,57				

¹Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Gabardo et al. (2020) verificaram a inibição micelial de fungos fitopatógenos em placas com meio BDA por *Bacillus subtilis*: *S. rolfsii* cresceu 72,25%, *S. sclerotiorum* 68,22%, *Colletotrichum dematium* var. *truncata* 57,47%, e *R. solani* apenas 4,19% de crescimento em relação às placas controle sem *Bacillus*.

Narasimhan e Shivakumar (2016), também relataram a inibição de crescimento micelial em 42% de *R. solani* (2015) e de 57% de *C. gloeosporioides*

utilizando *Bacillus* sp. na forma de suspensão de células em tratamento de sementes de pimenta.

Em estudos de Oliveira et al. (2020) o fungo *Penicillium purpurogenum* teve seu crescimento inibido em tratamento de sementes de duas espécies de palmeiras com suspensão de células das cepas de *B. amyloliquefaciens* BP1RB, BP66RB, BP70RB e BP201RB; *B. subtilis* BP60RB e BP186RB e *B. methylotrophicus* BP35EB.

Deng et al. (2020) conseguiram comprovar a eficácia de *B. sonorensis* cepa KLB GS-3 como agente de biocontrole de *P. digitatum*. Entre os resultados encontrados, foi notada a inibição do crescimento micelial do fungo e a redução da incidência do mofo em toranja, sendo o tratamento preventivo mais eficiente que o curativo.

A Tabela 5 mostra a presença de halo verificada no teste de confrontação direta entre as cepas de *Bacillus* com *Aspergillus* (AP2) e *Penicillium* sp (PEN). Os demais fungos não apresentaram halo de inibição.

Tabela 5. Diâmetro de halo de inibição (cm) no crescimento micelial de *Aspergillus* sp (AP2) e *Penicillium* sp. (PEN). em confrontação direta com *Bacillus* sp. LAFUEL 01, LAFUEL 02 e LAFUEL 03.

TRATAMENTO	HALO (cm)
Experimento 1	
AP2 x LAFUEL 02	0,37 ¹ b
AP2 x LAFUEL 03	0,18 b
PEN x LAFUEL 01	1,16 a
PEN x LAFUEL 02	1,06 a
PEN x LAFUEL 03	1,08 a
C.V (%)	16,76
Experimento 2	
AP2 x LAFUEL 02	0,45 b
AP2 x LAFUEL 03	0,41 b
PEN x LAFUEL 01	1,04 a
PEN x LAFUEL 02	1,21 a
PEN x LAFUEL 03	1,17 a
C.V (%)	13,63

¹Médias seguidas de mesma letra maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Foi observado nos dois experimentos de confronto direto entre os fitopatógenos e as cepas de *Bacillus* sp. a presença de halo de inibição em

confrontação com PEN (três cepas de *Bacillus* sp.) e com AP2, apenas com LAFUEL 02 e 3. O halo de inibição de PEN foi estatisticamente maior que o de AP2.

A presença de halo indica a presença de metabólitos secundários, produzidos pelas bactérias que difundiram no meio de cultivo inibindo o crescimento do fungo nessa região da placa. Essa capacidade de produzir metabólitos secundários com atividade antimicrobiana é de interesse para o desenvolvimento de bioprodutos para a agricultura (PAZ et al., 2018).

Em estudos de Zhang et al. (2020), o isolado de *B. siamensis* cepa G-3, produziu cerca de 22 compostos voláteis eficazes no controle de doenças de pós-colheita de framboesa causadas por *B. cinerea* e *Rhizopus stolonifer* no fruto.

A eficiência do sobrenadante livre de células (SLC) das cepas de *Bacillus* sp. em inibir o crescimento de fungos fitopatogênicos está apresentada na Tabela 6 e na Figura 3.

Tabela 6. Diâmetro do crescimento micelial (cm) de *Fusarium* sp. (FUS), *Acremonium stricticum* (ACR), *Aspergillus* sp. (AP1), *Aspergillus* sp. (AP2) e *Penicillium* sp. (PEN), sob influência de sobrenadante livre de células (SLC) de *Bacillus* sp. LAFUEL 01, LAFUEL 02 e LAFUEL 03

TRAT	FUS	ACR	AP1	AP2	PEN
Experimento 1					
CONTROLE	9,00 ¹ aA	9,00 aA	9,00 aA	9,00 aA	9,00 aA
SLC LAFUEL01	5,90 bC	7,80 bB	9,00 aA	9,00 aA	9,00 aA
SLC LAFUEL02	6,10 bB	6,20 cB	9,00 aA	9,00 aA	9,00 aA
SLC LAFUEL03	4,95 cC	5,30 dC	9,00 aA	8,27 bB	9,00 aA
C.V (%)	3,97				
Experimento 2					
CONTROLE	9,00 aA	9,00 aA	9,00 aA	9,00 aA	9,00 aA
SLC LAFUEL01	5,57 bB	6,35 bB	9,00 aA	9,00 aA	9,00 aA
SLC LAFUEL02	5,37 bB	3,75 cC	9,00 aA	9,00 aA	9,00 aA
SLC LAFUEL03	5,97 bC	7,05 bB	9,00 aA	7,82 bB	9,00 aA
C.V (%)	5,96				

¹Médias seguidas de mesma letra maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

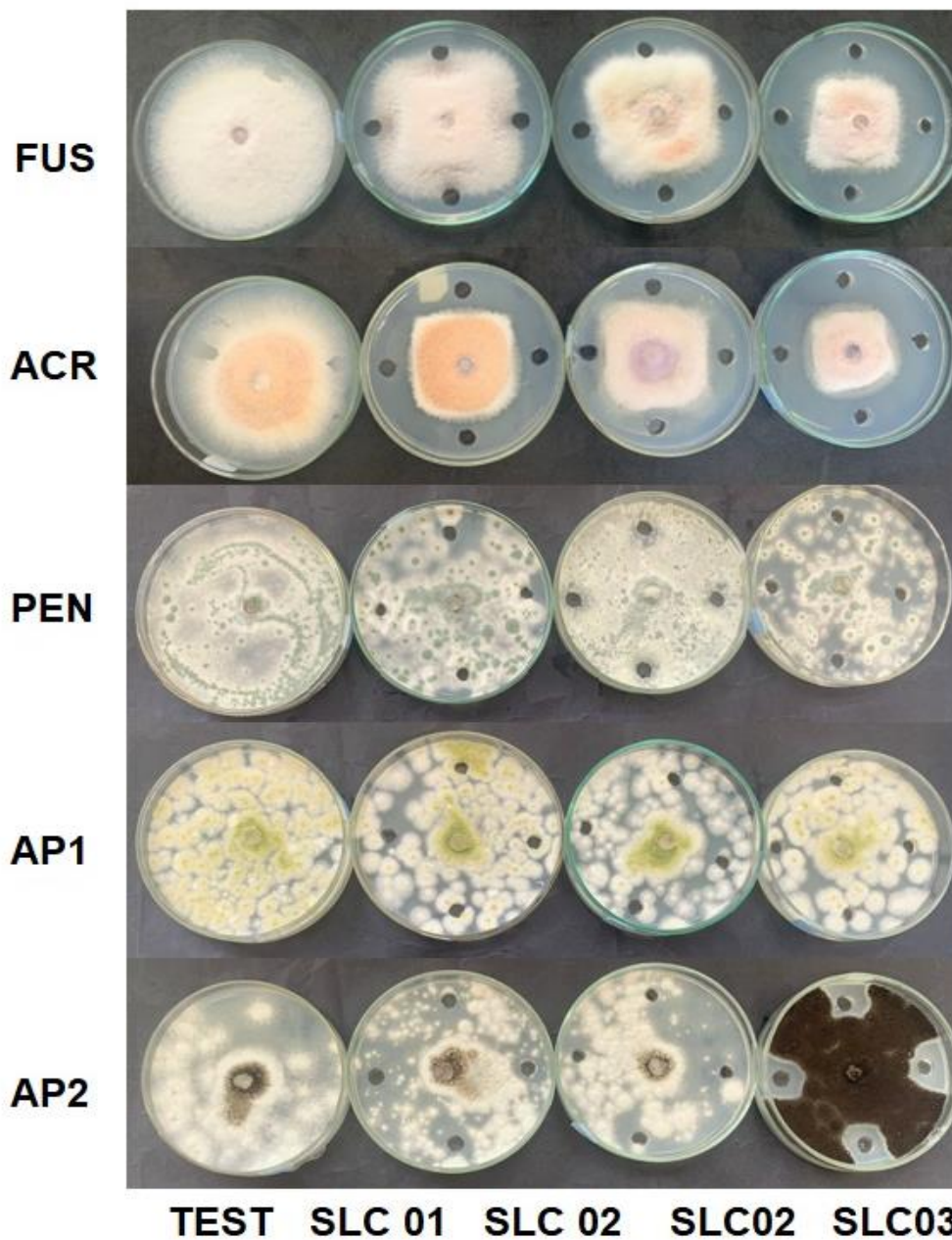
²Letras minúsculas correspondem ao desdobramento das cepas de *Bacillus* dentro de cada patógeno. Letras maiúscula correspondem ao desdobramento dos patógenos dentro de cada cepa de *Bacillus*.

³SLC 01= Sobrenadante livre de células de *Bacillus* sp. cepa LAFUEL 01.; SLC= Sobrenadante livre de células de *Bacillus* sp. cepa LAFUEL 02; SLC 03= Sobrenadante livre de células de *Bacillus* sp. cepa LAFUEL 03.

Para AP1 e PEN não foi constatado diferença significativa para o crescimento micelial no teste de difusão em ágar do SLC nos dois experimentos.

No primeiro experimento o SLC 03 foi o que apresentou melhores resultados reduzindo o crescimento micelial dos fungos FUS (4,95 cm), ACR (5,30 cm) e AP2, (8,27 cm) e não foi controlado por nenhum outro, isso se compararmos com a placa controle (9,00 cm). AP2 foi controlado apenas pelo SLC LAFUEL 03.

Figura 3. Teste de difusão em ágar do sobrenadante livre de células (SLC) de LAFUEL 01, LAFUEL 02 e LAFUEL 03 *Bacillus* sp. sobre o crescimento micelial de *Fusarium* sp. (FUS), *Acremonium stricticum* (ACR), *Aspergillus* sp. (AP1), *Aspergillus* sp. (AP2) e *Penicillium* sp. (PEN).



SLC 01= Sobrenadante livre de células de *Bacillus* sp. cepa LAFUEL 01.; SLC= Sobrenadante livre de células de *Bacillus* sp. cepa LAFUEL 02; SLC 03= Sobrenadante livre de células de *Bacillus* sp. cepa LAFUEL 03.

No segundo experimento o SLC 02 (3,75 cm) foi o que mais interferiu no crescimento de ACR. FUS teve o seu crescimento mais prejudicado pelo SLC 02 (5,37 cm) e SLC 03 (5,97cm) e não foram diferentes estatisticamente. AP2, novamente teve seu crescimento controlado apenas pelo SLC 03 (7,82 cm).

O SLC da cepa de *B. subtilis* BJJ apresentou eficiência contra o fungo *Magnaporthe oryzae*, diminuindo a incidência da doença em 50% em plantas de arroz quando utilizada em tratamento de sementes e em pulverização. No tratamento de sementes a redução da doença foi superior a 70% (HE et al., 2019b).

O sobrenadante livre de células das cepas 5YN8 e DSN012 de *B. velezensis* foi capaz de inibir o crescimento micelial de *B. cinerea* em experimento em placa de Petri no teste de difusão em ágar (JIANG, 2018).

5.2 CONTROLE DOS FUNGOS FITOPATOGÊNICOS

O teste de germinação em papel com sementes de milho doce microbiolizadas com isolados de *Trichoderma* sp. para o controle dos fungos fitopatogênicos foi realizado para a seleção dos isolados de *Trichoderma* sp. que seriam avaliadas em casa de vegetação (Tabela 7). Os isolados T26 e T70, não tiveram a esporulação desejada para o tratamento de semestre (10^8 conídios/ml) sendo, portanto, descartados.

De maneira geral a germinação das sementes de milho doce microbiolizadas com a suspensão de esporos dos diferentes isolados de *Trichoderma*, não foram diferentes estatisticamente, com exceção dos isolados T20 e T41 no primeiro experimento com as maiores médias de germinação e no segundo experimento apenas o isolado T20. Em ambas os experimentos o isolado T37 teve a menor taxa de germinação.

O tratamento de sementes com *Trichoderma* sp. melhora o desenvolvimento radicular e está relacionado a diversos compostos liberados pelas hifas. Essas moléculas são capazes de estimular a ramificação das raízes, aumentando a capacidade de absorção de nutrientes e água, que proporciona um melhor crescimento da raiz (BEZERRA et al., 2022).

Tabela 7. Germinação (%) de sementes de milho doce em microbiolizadas com isolados de *Trichoderma asperellum* (T2, T7, T20, T37, T38, T41), *T. asperelloides* (T25) e *Trichoderma* sp. (T24) e ECOTRICH® à base de *T. harzianum* IBLF 006 em rolos de papel germitest.

TRATAMENTO	GERMINAÇÃO (%)
Experimento 1	
Água	59,0 ¹ ab
<i>T. harzianum</i> IBLF 006	57,0 ab
T20	64,0 a
T25	62,0 ab
T24	60,0 ab
T41	69,0 a
T38	60,0 ab
T2	62,0 ab
T7	56,0 ab
T37	46,0 b
C.V (%)	13,63
Experimento 2	
Água	61,0ab
<i>T. harzianum</i> IBLF 006	60,0ab
T20	66,5a
T25	59,5ab
T24	56,5ab
T41	63,0ab
T38	60,5ab
T2	58,5ab
T7	58,5ab
T37	49,5b
C.V (%)	9,36

¹Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Uma das formas proposta para aumentar a eficiência dos tratamentos com *Trichoderma* é a aplicação em forma de suspensão de conídios pré germinados, acredita-se que o efeito é acelerado dessa forma, no entanto os conídios ficariam mais frágeis e em ambientes secos sofreriam facilmente dissecação (FERREIRA, 2021).

A eficiência dos isolados no controle dos fitopatógenos em casa de vegetação está apresentada na Tabela 8. A germinação das semente de milho doce inoculada artificialmente com *Fusarium* sp., *Acremonium striticum*, *Aspergillus* sp. (AP1), *Aspergillus* sp. (AP2) e *Penicillium* sp. e tratada com produtos à base de *Trichoderma*, *Bacillus* sp LAFUEL 03., fungicidas microbiológicos (SERENADE® e ECOTRICH®) e químicos (VITAVAX®= Thiram + carboxina), foi avaliada aos sete dias.

No primeiro experimento foi constatada a interação entre os fatores. PEN foi o único patógeno controlado pelos tratamentos T20, o comercial a base de *T. harzianum* IBLF 006 e o fungicida Thiram+Carboxina, aumentando a germinação da semente de 55% (água) a 70% (T20) e 72% (fungicida à base de *Bacillus* e químico).

O SLC LAFUEL 03 prejudicou a germinação das sementes infectadas por FUS, ACR, AP1 e AP2, portanto, não pode ser considerado para o tratamento de sementes. *T. harzianum* IBLF 006 também diminuiu a germinação de sementes infectadas com FUS e T20 prejudicou a germinação em sementes infectadas com ACR.

Tabela 8. Germinação (%) aos sete dias de semente de milho doce inoculada artificialmente com *Fusarium* sp. (FUS), *Acremonium striticum* (ACR), *Aspergillus* sp. (AP1), *Aspergillus* sp. (AP2) e *Penicillium* sp. (PEN) e tratada com produtos à base de *Trichoderma asperellum* (T20 e T41), *Bacillus* sp. LAFUEL 03, fungicida microbiológico (SERENADE® à base de *B. subtilis* QST 713 e ECOTRICH® à base de *T. harzianum* IBLF 006) e químico (VITAVAX® Thiram + carboxina).

TRAT.	FUS	ACR	AP1	AP2	PEN	
Experimento 1						
						MÉDIAS
Água	70,0 aA	69,0 aA	66,0 abAB	68,0 abAB	55,0 bcB	65,6
T41	69,0 aA	70,0 aA	62,0 abA	65,0 abA	63,0 abA	65,8
T20	62,0 abAB	50,0 bB	61,0 abAB	61,0 abAB	70,0 aA	60,8
LAFUEL 03	64,0 abA	69,0 aA	71,0 aA	63,0 abA	48,0 cB	63,0
SLC LAFUEL 03	51,0 bAB	49,0 bAB	46,0 cB	46,0 cB	61,0 abcA	50,6
<i>B. subtilis</i> QST 713	62,0 abAB	60,0 abAB	66,0 abA	73,0 aA	52,0 bcB	62,60
<i>T. harzianum</i> IBLF 006	54,0 bB	69,0 aA	73,0 aA	61,0 abAB	72,0 aA	65,80
Thiram+Carboxina	61,0 abABC	68,0 aAB	53,0 bcC	57,0 bcBC	72,0 aA	62,20
MÉDIAS	61,6	63,0	62,2	61,75	61,6	
C.V (%)			10,77			
Experimento 2						
						MÉDIAS
Água	66,0	73,0	69,0	69,0	69,0	69,2 bc
T41	78,0	79,0	83,0	72,0	76,0	77,6 a
T20	67,0	73,0	78,0	68,0	71,0	71,4 abc
LAFUEL 03	77,0	68,0	77,0	75,0	75,0	74,4 ab
SLC LAFUEL 03	60,0	63,0	68,0	69,0	70,0	66,0 c
<i>B. subtilis</i> QST 713	72,0	76,0	77,0	73,0	74,0	74,4 ab
<i>T. harzianum</i> IBLF 006	80,0	73,0	77,0	76,0	71,0	75,4 ab
Thiram+Carboxina	77,0	70,0	65,0	68,0	70,0	70,0 bc
MÉDIAS	72,1 A	71,9 A	74,3 A	71,3 A	71,9 A	
C.V (%)			8,83			

¹Médias seguidas de mesma letra maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

No segundo experimento não foi observada interação entre os fatores tratamento e patógeno. O controle tratado com água obteve uma média de 69,2% de germinação e o tratamento com T20 apresentou a maior média com 77,6%. O SLC LAFUEL 03 foi responsável pela menor % de germinação das sementes, com uma média de 66%.

Segundo Kupper et al. (2013), é possível que a eficiência de antagonistas pode ser afetada pela densidade populacional, a inoculação artificial pode resultar em uma infestação que não atinge os níveis reais, tornando o controle ineficiente, porém pode servir como parâmetro para avaliação da ação do microrganismo no controle de fitopatógenos em situação natural de infecção.

Cruz et al. (2020) trataram de sementes de algodoeiro com suspensão de conídios de *Trichoderma* sp. e obteve resultados na diminuição de 88% da incidência de *Aspergillus* sp. em avaliações pós emergência.

Da Silva e Tebaldi (2017), obtiveram controle de *Penicillium* spp. em sementes tratadas com *T. asperellum*, o controle foi de 94 a 82% para os dois híbridos de milho utilizados no experimento. Porém não tiveram resultados quando utilizaram uma cepa de *Bacillus subtilis*.

O tratamento preventivo por pulverização do solo com a cepa QST713 de *Bacillus subtilis* contra *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* seguido do plantio de tomate proporcionou uma redução de 70% da murcha de fusarium em relação ao solo não tratado (CUCU et al., 2020).

A metodologia de aplicação pode ter afetado os resultados que foram encontrados neste presente trabalho. Os trabalhos citados a baixo utilizaram metodologias que foram eficientes no controle de doenças com *Trichoderma* spp.

He et al., (2019a) utilizaram uma aplicação em forma de grânulos de *Trichoderma*, que foram produzidos a partir da fermentação em meio BD do isolado de *T. asperellum* GDFS1009. O fermentado foi utilizado para inocular um meio com indutor de clamidósporos e ajustado a uma concentração de 10^8 UFC mL. O caldo obtido da fermentação foi misturado em terra de diatomáceas e farelo de trigo moído, agitado com um misturador, espremido em granulador e seca a 43-50°C de 1-2 h para formar grânulos à base de *Trichoderma*. Esse experimento mostrou que, em semeadura, o tratamento no solo com o *Trichoderma* pode controlar *F. graminearum*, pois o fungo *Trichoderma* pode proliferar na rizosfera, colonizar o tecido radicular e induzir resistência nas plantas de milho contra o patógeno.

No que se diz respeito ao poder curativo do *Trichoderma*, sua aplicação na forma de suspensão de conídios apresentou pouca eficiência e os mecanismos atuantes ainda não foram totalmente esclarecidos. A resposta está em entender se a propriedade curativa acontece por mecanismos diretos que atuam sobre os fitopatógenos ou mecanismos indiretos que proporcionam um melhor desenvolvimento e crescimento das plantas e atuam no controle de patógenos já presentes no hospedeiro (FERREIRA, 2021).

5.3 DETERMINAÇÃO DA GERMINAÇÃO DE SEMENTES E DE PARÂMETROS DE CRESCIMENTO DE PLÂNTULAS DE MILHO DOCE

Para a determinação da germinação de sementes e de parâmetros de crescimento de plântulas de milho doce, foi avaliada a capacidade dos microrganismos de promoverem o crescimento de plantas, onde foram verificados a germinação, comprimento parte aérea, comprimento raiz, matéria seca parte aérea, matéria seca raiz, matéria seca total, matéria seca raiz\massa seca total de plântulas de milho oriundas de semente tratada com produtos à base de *Bacillus* sp. e *Trichoderma* sp. (Tabela 9).

Analisando o primeiro experimento de promoção de crescimento, as variáveis germinação (GER), comprimento parte aérea (CPA) e comprimento de raiz (CRA) não obtiveram diferenças significativas entre tratamentos.

Para a variável matéria seca da parte aérea (MSPA), plântulas oriundas de sementes tratadas com os isolados T2, T20 e T25 de *Trichoderma*, *Bacillus* LAFUEL 01 e 03, e com o produto comercial a base de *Trichoderma* ECOTRICH[®] tiveram média mais alta. A matéria seca de raiz (MSR) foi melhorada pelo tratamento com T2, T7, T20 e T24 de *Trichoderma*. A matéria seca total (MST) foi maior quando as sementes foram tratadas com os isolados T2, T7, T20, T25 e LAFUEL 03.

Já a relação matéria seca raiz\massa seca total (MSR\MST) foi significativamente maior quando as sementes foram microbiolizadas com todos os isolados de *Trichoderma* utilizada T2, T7, T20, T24, T25, T37, T38 E T41, pelos três sobrenadante livre de células de *Bacillus*, SLC 01, SLC 02 e SLC 03, e quando inoculada com a suspensão de células de *Bacillus* da cepa LAFUEL 02.

Tabela 9. Germinação (GER), comprimento parte aérea (CPA), comprimento raiz (CRA), matéria seca parte aérea (MSP), matéria seca raiz (MSR), matéria seca total (MST), matéria seca raiz\massa seca total (MST\MSR) de plântulas de milho oriundas de semente tratada com produtos à base de *Bacillus* sp. e *Trichoderma* sp.

TRATAMENTO	GER (%)	CPA (cm)	CRA (cm)	MSPA (g)	MSR (g)	MST (g)	MSR\MST
Experimento 1							
Água	60 ^{ns}	53,08 ^{ns}	37,18 ^{ns}	2,50 b	1,78 b	4,28 c	0,41 b
T41	60	54,08	42,64	2,67 b	1,95 b	4,62 c	0,44 a
T38	60	47,14	32,80	1,93 b	2,25 b	4,18 c	0,57 a
T37	55	49,59	40,50	1,66 b	1,47 b	3,13 c	0,47 a
T2	50	60,73	40,94	3,75 a	3,57 a	7,32 a	0,48 a
T7	60	51,02	38,91	2,66 b	2,70 a	5,36 c	0,50 a
T20	65	59,44	41,83	4,44 a	3,62 a	8,06 a	0,45 a
T24	40	61,18	43,64	2,66 b	3,22 a	5,88 b	0,54 a
T25	50	63,35	36,60	4,85 a	2,48 b	7,33 a	0,33 b
SLC LAFUEL 01	40	58,84	37,20	2,04 b	1,61 b	3,65 c	0,44 a
SLC LAFUEL 02	85	50,94	43,95	2,94 b	2,16 b	5,10 c	0,44 a
SLC LAFUEL 03	65	56,75	47,62	2,30 b	1,53 b	3,83 c	0,39 a
LAFUEL 01	60	58,68	89,83	3,86 a	2,02 b	5,88 b	0,35 b
LAFUEL 02	35	58,10	40,86	2,37 b	2,25 b	4,62 c	0,50 a
LAFUEL 03	75	58,45	55,42	4,37 a	1,97 b	6,34 a	0,29 b
<i>T.harzianum</i> IBLF 006	75	55,70	37,20	3,53 a	2,22 b	5,75 b	0,39 b
<i>B. subtilis</i> QST 713	50	57,34	44,69	2,93 b	1,69 b	4,62 c	0,37 b
C.V. (%)	20,10						
Experimento 2							
Água	60 a	82,24 ^{ns}	41,16 n.s	6,83 b	2,24 c	09,07 c	0,24 c
T41	70 a	68,78	44,92	7,27 b	4,97 a	12,24 a	0,40 a
T38	75 a	72,01	44,57	6,34 b	3,77 b	10,12 b	0,37 a
T37	60 a	81,22	39,93	6,07 b	2,03 c	08,10 c	0,25 c
T2	45 b	77,92	44,40	8,35 a	1,50 c	09,86 c	0,14 d
T7	60 a	74,19	46,36	6,83 b	1,51 c	08,35 c	0,18 d
T20	60 a	73,27	47,76	9,04 a	3,60 b	12,64 a	0,28 b
T24	50 b	79,13	44,95	6,76 b	4,44 a	11,19 a	0,39 a
T25	80 a	77,20	40,87	9,45 a	1,37 c	10,82 b	0,12 d
SLC LAFUEL 01	55 a	78,51	39,72	6,64 b	3,54 b	10,18 b	0,34 a
SLC LAFUEL 02	35 b	81,02	47,37	7,08 b	2,15 c	09,23 c	0,22 c
SLC LAFUEL 03	55 a	87,22	44,08	6,77 b	2,74 c	09,51 c	0,28 b
LAFUEL 01	30 b	86,23	44,64	8,46 a	1,89 c	10,35 b	0,18 d
LAFUEL 02	45 b	82,71	46,52	6,24 b	1,34 c	07,58 c	0,17 d
LAFUEL 03	60 a	86,79	45,10	7,81 a	2,56 c	10,38 b	0,24 c
<i>T.harzianum</i> IBLF 006	70 a	78,99	40,36	8,13 a	1,61 c	09,74 c	0,16 d
<i>B. subtilis</i> QST 713	75 a	84,80	42,15	7,09 b	1,92 c	09,01 c	0,22 c
C.V. (%)	23,96						

n.s. Não significativo pela análise de variância a 5% de probabilidade

¹Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott Knott.

²T2= *Trichoderma asperellum*; T7= *T. asperellum*; T20= *T. asperellum*; T24= *T. asperellum*; T25= *T. asperellum*; T37= *T. asperellum*; T38= *T. asperellum*; T41= *T. asperellum*; LAFUEL 01= *Bacillus* sp.; LAFUEL 02= *Bacillus* sp.; LAFUEL 03= *Bacillus* sp.; SLC 01= sobrenadante livre de células de *Bacillus* sp, cepa LAFUEL 01; SLC 02= sobrenadante livre de células de *Bacillus* sp, cepa LAFUEL 02; SLC 03= sobrenadante livre de células de *Bacillus* sp, cepa LAFUEL 03; ECOTRICH® à base de *T. harzianum* IBLF 006 e SERENADE® à base de *B. subtilis* QST 713.

No segundo experimento, não houve diferença significativa entre os tratamentos para as variáveis CPA e CRA. Para a variável GER, o isolado de *Trichoderma* T20, o sobrenadante livre de células de *Bacillus* SLC 02 e as suspensão

das células de *Bacillus* LAFUEL 01 e LAFUEL 02, reduziram a porcentagem de germinação quando comparado a testemunha (60% de germinação) e os demais tratamentos 50%, 35%, 30% e 45% respectivamente.

A MSPA, foi melhor quando as sementes foram microbiolizadas com os isolados de *Trichoderma* T2, T20 e T25, com suspensão das células de *Bacillus* LAFUEL 01 e LAFUEL 03, e com o ECOTRICH[®]. A MSR foi maior quando as sementes foram microbiolizadas com os isolados de *Trichoderma* T41 e T24. A MST foi maior quando as sementes foram microbiolizadas com os isolados T20 e T41.

A MSR\MST foi maior nas sementes tratadas com os isolados *Trichoderma* T41, T38 e T24 e com o sobrenadante livre de células de *Bacillus* SLC 01.

Em resumo, as únicas variáveis que foram alteradas pelos tratamentos aplicados nas sementes foram MSPA, MSR, MST e MSR\MST. Para MSPA, os tratamentos T2, T20, T25 LAFUEL 01, LAFUEL 03 e o produto comercial a base de *T. harzianum* IBLF 006, foram os que apresentaram os melhores resultados nos dois experimentos; o aumento da MSR foi proporcionado pelo tratamento T24 e para MST por T20; na relação MSR\MST, os melhores tratamentos foram T41, T38, T24 e o SLC LAFUEL 01. Para a promoção de crescimento de modo geral o tratamento com *Trichoderma* T20 e T24 proporcionaram melhores resultados.

Em estudos de Da Silva e Tebaldi (2017), sementes de milho tratadas com suspensão de *T. asperellum* e *Bacillus subtilis*, não tiveram maior germinação do que em sementes não tratadas. Segundo os autores, os resultados estão relacionados ao tipo de substrato, à temperatura da casa de vegetação, considerada alta para as condições ideais do fungo e pode ter provocado secagem mais rápida do substrato, independente da frequência de irrigação ter sido adequada.

A co-inoculação em sementes de milho com *B. aryabhatai* cepa S10 e *B. subtilis* cepa ZM63 proporcionou acréscimo de 30% na altura da planta, 45% do comprimento da raiz, 37% da massa seca da parte aérea e 122% na massa seca da raiz em comparação com o controle não inoculado (AHMAD, 2019).

6. CONCLUSÃO

Em experimento de confronto direto todos os isolados de *Trichoderma* e cepas de *Bacillus* testados apresentaram antagonismo frente aos patógenos.

Penicillium sp. foi o patógeno que mais inibido *in vitro* por parte das cepas de *Bacillus*, apresentando halo de inibição do crescimento micelial maior do que 1 cm.

A fungitoxicidade *in vitro* dos metabólitos produzidos pela cepa LAFUEL 03 foi maior do que as outras cepas, mas, nos experimentos *in vivo*, foi responsável por prejudicar a germinação das sementes infectadas.

Os isolados de *T. asperellum* T26 e T70 não possuem esporulação desejada para a formulação de produtos à base de esporos. É necessário testá-los de outra forma, explorando possíveis metabólitos secundários.

Sementes tratadas com o isolado de *T. asperellum* T41, apresentaram maior germinação considerando todos os patógenos inoculados e as plântulas oriundas dessas sementes, apresentaram maior crescimento de raiz e planta inteira nos testes de promoção de crescimento.

Entretanto, mais estudos são necessários, em relação à concentração adequada e formas de aplicação dos agentes de biocontrole.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDUL, K. K., ALTINOK, H. H. In vitro antifungal activity of *Trichoderma harzianum* Rifai and PGPR strains as biocontrol agents against gray mold and white mold in eggplant. **Fresenius Environmental Bulletin**, v. 28, n. 8, p. 6166-6173, 2019.
- ABIMILHO - **Associação Brasileira das Indústrias de Milho** - Milho. Disponível em: <http://www.abimilho.com.br/milho/cereal>. Acesso em: 25 julho de 2020.
- AGROFIT. **Sistemas de agrotóxicos fitossanitários**. Disponível em: http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em -01 de maio de 2022.
- AHMAD, M., ADIL, Z., HUSSAIN, A., MUMTAZ, M. Z., NAFEEES, M., AHMAD, I., JAMIL, M. Potential of phosphate solubilizing *Bacillus* strains for improving growth and nutrient uptake in mungbean and maize crops. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 56(2). 2019.
- ALDRICH, S.R., SCOTT, W.O., LENG, E.R. **Modern corn production**. 2.ed. Champaign: A& L Publication, p.371,1982.
- ALI, G.S., NORMAN, D, EL-SAYED A. S. Soluble and volatile metabolites of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPRs): role and practical applications in inhibiting pathogens and activating induced systemic resistance (ISR). **Advances in Botanical Research**. v. 75, p. 241-284. 2015.
- AOYAGI, L. N., DOI, S. M. OBARA. Avaliação da Atividade Antagonista de *Trichoderma harzianum* sobre *Fusarium oxysporum* e *Botrytis cinerea*. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 4, n. 3, p. 3234-3239, 2021.
- ARIZA, Y., SÁNCHEZ, L. Determinación de metabolitos secundarios a partir de *Bacillus subtilis* con efecto biocontrolador sobre *Fusarium* sp. **Nova**, v. 10, n. 18, p. 149-155, 2012.
- ATANASOVA, L., LE CROM, S., GRUBER, S., COULPIER, F., SEIDL-SEIBOTH, V., KUBICEK, C. P., DRUZHININA, I. S. Comparative transcriptomics reveals different strategies of *Trichoderma* mycoparasitism. **BMC genomics**, v. 14, n. 1, p. 121, 2013.
- AZEVEDO, D. M. Q., DA SILVA ROCHA, F., FERNANDES, M. D. F. G., DA COSTA, C. A., MUNIZ, M. D. F. S., BARROSO, P. D., ... , DO ROSÁRIO BARBOSA, D. M. C. Antagonistic effect of *Trichoderma* isolates and its metabolites against *Fusarium solani* and *F. oxysporum* in chickpea. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 6, p. 36344-36361, 2020.
- BAHADIR, P. S., LIAQAT, F., ELTEM, R. Plant growth promoting properties of phosphate solubilizing *Bacillus* species isolated from the Aegean Region of Turkey. **Turkish Journal of Botany**, 42(2), 183-196. 2018.
- BARROS, J. F. C., CALADO, J. G. **A cultura do milho**. 2014.

- BELL, D. K., WELLS, H. D., MARKHAM C. R. In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. **Phytopathology**, v. 72, n. 4, p. 379-382. 1982.
- BENEDIT, P. Impacto Económico de la Infección con *Fusarium verticillioides* y Acumulación de Fumonisinias em Maíz. **Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales. Universidad Nacional del Nor-oeste de la Provincia de Buenos Aires. Pergamino**, 2016.
- BENTO, L. F., CANEPPELE, M. A. B., DE FIGUEIREDO, M. C., KOBAYASTI, L., CANEPPELE, C., de JESUS ANDRADE, P. Ocorrência de fungos e aflatoxinas em grãos de milho. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 1, p. 44-49, 2012.
- BERGAMASCHI, H., MATZENAUER, R. **O milho e o clima**. Porto Alegre: Emater/RS-Ascar. p. 10, 2014.
- BERTAGNOLLI, V. V., DEUNER, C. C., FRIZON, P., GHISSI, V. C. Water potential and time of *Pyrenophora tritici-repentis* inoculation in wheat seeds. **Semina: Ciências Agrárias**, 38(4), 1681-1690. 2017.
- BETTIOL, W., MORANDI, M. B. *Trichoderma* in Brazil: history, research, commercialization and perspectives. In: **Embrapa Meio Ambiente**. In: Meeting of the working group on biological control of fungal and bacterial plant pathogens, 10., 2008, Interlaken, Switzerland. IOBC WPRS Bulletin, v. 43, p. 235-237, 2009.
- BETTIOL, W., SILVA, J. C., CASTRO, M. L. M. P. Uso atual e perspectivas do *Trichoderma* no Brasil. **MEYER, MC, MAZARO, SM, SILVA, JC Trichoderma: uso na agricultura. Brasília: Embrapa**, p. 21-43, 2019.
- BEZERRA, M. C. L., GOMES, R. D. S. S., CARVALHO, T. K. N., RODRIGUES, R. M., SILVA, T. B. M., MEDEIROS, J. G. F. Redução de fungos e qualidade fisiológica de sementes de milho inoculadas com *Trichoderma harzianum*. **Nativa**, 10(1), 69-73. 2022.
- BLAKE, C., CHRISTENSEN, M. N., KOVÁCS, Á. T. Molecular aspects of plant growth promotion and protection by *Bacillus subtilis*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 34, n. 1, p. 15-25, 2021.
- CASA, R. T., REIS, E. M., ZAMBOLIM, L. Doenças do milho causadas por fungos do gênero *Stenocarpella*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, p. 427-439, 2006.
- CASELA, C. R., FERREIRA, A. da S., PINTO, NFJ de A. Doenças na cultura do milho. **Embrapa Milho e Sorgo-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2006.
- CAVAGLIERI, L., ORLANDO, J., ETCHEVERRY, M. In vitro influence of bacterial mixtures on *Fusarium verticillioides* growth and fumonisin B1 production: effect of seeds treatment on maize root colonization. **Letters in Applied Microbiology**, v. 41, n. 5, p. 390-396, 2005.
- CAWOY, H., MARIUTTO, M., HENRY, G., FISHER, C., VASILYEVA, N., THONART, P., DOMMES, J., ONGENA, M. Plant Defense Stimulation by Natural Isolates of

Bacillus Depends on Efficient Surfactin Production. **MPMI**, v. 27, n. 2, pp. 87–100, 2014.

CHOWDAPPA, P., KUMAR, S. M., LAKSHMI, M. J., UPRETI, K. K. GROWTH stimulation and induction of systemic resistance in tomato against early and late blight by *Bacillus subtilis* OTPB1 or *Trichoderma harzianum* OTPB3. **Biological control**, 65(1), 109-117. 2013.

CLEMENTE, J. M., CARDOSO, C. R., VIEIRA, B. S. E., DA MATA FLOR, I., COSTA, R. L. Use of *Bacillus* spp. as growth promoter in carrot crop. **African Journal of Agricultural Research**, Nairóbi, v. 11, n. 35, p. 3355-3359, Sep. 2016

CONAB – **Companhia Nacional de Abastecimento** - Produção total de etanol deve ficar em 31,6 bilhões de litros. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/3017-producao-total-de-etanol-deve-ficar-em-31-6-bilhoes-de-litros> Acesso em: 25 julho de 2020.

CONAB – **Companhia Nacional de Abastecimento**. Série Histórica de Produção Safras 1976 a 2021. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. Acesso em: 29 de abril de 2022.

CONSOLO, V. F., MÓNACO, C. I., CORDO, C. A., SALERNO, G. L. Characterization of novel *Trichoderma* spp. isolates as a search for effective biocontrollers of fungal diseases of economically important crops in Argentina. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 28(4), 1389-1398. 2012.

COSTA, M. L. N, GONÇALVES, D. da S. F., MACHADO, J. da C. Controle de *Fusarium verticillioides* em sementes de milho com o óleo essencial de gengibre. **Summa Phytopathologica**, v. 46, p. 250-254, 2020.

CRUZ, J. C., PEREIRA FILHO, I. A. **Manejo e tratos culturais para o cultivo do milho verde**. Sete Lagoas: EMBRAPA, 9 p. (Circular Técnica, 16) 2002.

CRUZ, J. M. F. D. L., MEDEIROS, E. C. D., FARIAS, O. R. D., SILVA, E. C. D., NASCIMENTO, L. C. D. Microbiolization of organic cotton seeds with *Trichoderma* sp. and *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Seed Science**, v 42. 2020.

CUCU, M. A., GILARDI, G., PUGLIESE, M., GULLINO, M. L., GARIBALDI, A. An assessment of the modulation of the population dynamics of pathogenic *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in the tomato rhizosphere by means of the application of *Bacillus subtilis* QST 713, *Trichoderma* sp. TW2 and two composts. **Biological Control**, 142, 104158. 2020.

DA SILVA, C. O., TEBALDI, N. D. Physiological and sanitary quality of maize seeds treated with biological control agents. **Científica**, v. 45, n. 1, p. 25-30, 2017.

DANIEL, J. F. de S., RODRIGUES F. E. Peptaibols of *Trichoderma*. **Natural product reports**, v. 24, n. 5, p. 1128-1141, 2007.

DAVISON, J. Plant beneficial bacteria. **Bio/technology**, v.6, p.282-286, 1988.

- DE CARVALHO, R.V., PEREIRA, O.AP., CAMARGO, L.E.A. Doenças do Milho. In: AMORIM, L., REZENDE, J. A. M. BERGAMIN FILHO, A., CAMARGO, L.E.A. **Manual de fitopatologia: Doenças de Plantas cultivadas**. 5º ed. Ouro Fino - MG: Agronômica Ceres, p. 271-306. 2016.
- DENG, J., KONG, S., WANG, F., LIU, Y., JIAO, J., LU, Y., LI, X. Identification of a new *Bacillus sonorensis* strain KLBC GS-3 as a biocontrol agent for postharvest green mould in grapefruit. **Biological Control**, 151, 104393. 2020
- DOBBELAERE, S., VANDERLEYDEN, J., OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.22, p.107-149, 2003.
- DODSON-SWENSON, H. G, TRACY, W. F. Endosperm carbohydrate composition and kernel characteristics of shrunken2-intermediate (sh2-i/sh2-i Su1/Su1) and shrunken2- intermediate-sugary1-reference (sh2-i/sh2-i su1-r/su1-r) in sweet corn. **Crop Science**. V. 55, N. 6, P. 2647-2656, 2015.
- DONATI, I. Enzimi, acidi organici ed altri metaboliti coinvolti nella patogenesi di *Penicillium* spp. 2008.
- DOS SANTOS, C. E., NETO, J. J. D., NEVES, P. R., FONSECA, R. S. A., KRAEMER, A. P. N., DA PAZ LIMA, M. L. Tratamento químico de sementes e impacto sobre complexos de fitossanitários e elementos morfoagronômicos /Chemical seed treatment and impact on disease complexes and morphoagronomical components. **Brazilian Applied Science Review**, 3(2), 1445-1454. 2019.
- EDWARDS, J. **Maize Growth and Development**. Orange, NSW: NSW Department of Primary Industries, p. 9, 2009.
- FANCELLI, A. L., DOURADO NETO, D. **Produção de milho**. 2ed. Guaíba: Agropecuária, 2004. 360p.
- FERRARI, J.T., POSSAMAI, E. Incidência de *Bipolaris sorokiniana* nas sementes e transmissão para plantas de cevada. **Revista de Ciências Agrárias**, v.38, n.3, p.320-329, 2015.
- FERREIRA, F. V., MUSUMECI, M. A. *Trichoderma* as biological control agent: Scope and prospects to improve efficacy. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 5, p. 1-17, 2021.
- FERREIRA, T. C., BETTIOL, W. Biocontrole de Patógenos de Solo e Promoção de Crescimento Vegetal Promovidos Por *Bacillus* spp. EM MILHO. **Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management**, v. 15, n. 4, 2019.
- FORNASIERI FILHO, D. **Manual da cultura do milho**. Jaboticabal: Funep, 574 p. 2007.
- GABARDO, G., DALLA PRIA, M., PRESTES, A. M. C., DA SILVA, H. L. *Trichoderma asperellum* e *Bacillus subtilis* como antagonistas no crescimento de fungos fitopatogênicos in vitro. **Brazilian Journal of Development**, 6(8), 55870-55885. 2020.

- GALVÃO, J. C. C., MIRANDA, G. V., TROGELLO, E., FRITSCHÉ-NETO, R. Sete décadas de evolução do sistema produtivo da cultura do milho. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 61, p. 819-828, 2014.
- GARNICA-VERGARA, A., BARRERA-ORTIZ, S., MUÑOZ-PARRA, E., RAYA-GONZÁLEZ, J., MÉNDEZ-BRAVO, A., MACÍAS-RODRÍGUEZ, L., LÓPEZ-BUCIO, J. The volatile 6-pentyl-2H-pyran-2-one from *Trichoderma atroviride* regulates *Arabidopsis thaliana* root morphogenesis via auxin signaling and ethylene insensitive 2 functioning. **New Phytologist**, 209(4), 1496-1512. 2016.
- GARVIL, M. P., BORGES, R., GALVÃO, R. D. V. Impactos da presença do fungo *Penicillium* sp na indústria. **e-RAC**, v. 4, n. 1, 2015.
- GERALDINE, A. M., LOPES, F. A. C., CARVALHO, D. D. C., BARBOSA, E. T., RODRIGUES, A. R., BRANDÃO, R. S., JUNIOR, M. L. Cell wall-degrading enzymes and parasitism of sclerotia are key factors on field biocontrol of white mold by *Trichoderma* spp. **Biological Control**, 67(3), 308-316, 2013.
- GOMES, E. V., DO NASCIMENTO COSTA, M., DE PAULA, R. G., DE AZEVEDO, R. R., DA SILVA, F. L., NORONHA, E. F., SILVA, R. N. The Cerato Platanin protein Epl-1 from *Trichoderma harzianum* is involved in mycoparasitism, plant resistance induction and self cell wall protection. **Scientific reports**, v. 5, p. 17998, 2015.
- GONG, A. D., LI, H. P., YUAN, Q. S., SONG, X. S., YAO, W., HE, W. J., , LIAO, Y. C. Antagonistic mechanism of iturin A and plipastatin A from *Bacillus amyloliquefaciens* S76-3 from wheat spikes against *Fusarium graminearum*. **PloS one**, v. 10, n. 2, p. e0116871, 2015.
- GONG, Q., ZHANG, C., LU, F., ZHAO, H., BIE, X., , LU, Z. Identification of bacillomycin D from *Bacillus subtilis* fmbJ and its inhibition effects against *Aspergillus flavus*. **Food Control**, v. 36, n. 1, p. 8-14, 2014.
- GOVINDASAMY, V., SENTHILKUMAR, M., MAGHESHWARAN, V., KUMAR, U, BOSE, P., SHARMA, V., ANNAPURNA, K. *Bacillus* and *Paenibacillus* spp.: potential PGPR for sustainable agriculture. In: **Plant growth and health promoting bacteria**. Springer Berlin Heidelberg, p. 333-364, 2010.
- GROMADZKA, K., GÓRNA, K., CHEŁKOWSKI, J., WAŚKIEWICZ, A. Mycotoxins and related *Fusarium* species in preharvest maize ear rot in Poland. **Plant, Soil and Environment**, v. 62, n. 8, p. 348-354, 2016.
- HARMAN, G. E., HOWELL, C. R., VITERBO, A., CHET, I., LORITO, M. *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature reviews microbiology**, 2(1), 43-56. 2004
- HARWOKO, H., DALETOS, G., STUHLREIER, F., LEE, J., WESSELBORG, S., FELDBRÜGGE, M., MÜLLER, W.E.G., KALSCHUEER, R., ANCHEEVA, E., PROKSCH, P. Dithiodiketopiperazine derivatives from endophytic fungi *Trichoderma harzianum* and *Epicoccum nigrum*. **Natural product research**, v. 35, n. 2, p. 257-265, 2021.

- HASHEM, A., TABASSUM, B., ABD_ALLAH, E. F. *Bacillus subtilis*: A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. **Saudi journal of biological sciences**, 26(6), 1291-1297. 2019.
- HE, A. L., JIA, L., WANG, X. H., ZHANG, Q. G., WEI, S. O. N. G., JIE, C. H. E. N. Soil application of *Trichoderma asperellum* GDFS1009 granules promotes growth and resistance to *Fusarium graminearum* in maize. **Journal of Integrative Agriculture**, 18(3), 599-606. 2019. a.
- HE, Y., ZHU, M., HUANG, J., HSIANG, T., ZHENG, L. Biocontrol potential of a *Bacillus subtilis* strain BJ-1 against the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. **Canadian journal of plant pathology**, v.41, n.1, p.47-59, 2019. b.
- HOWELL, C. R. Biological control of *Pythium* damping-off of cotton with seed-coating preparations of *Gliocladium virens*. **Phytopathology**, v. 81, n. 7, p. 738-741, 1991.
- HU, M., LI, Q.-L., YANG, Y.-B., LIU, K., MIAO, C.-P., ZHAO, L.-X., DING, Z.-T. *T. koninginins* RS from the endophytic fungus *Trichoderma koningiopsis*. **Natural product research**, v. 31, n. 7, p. 835-839, 2017.
- JAKLITSCH, W. M., VOGLMAYR, H. Biodiversity of *Trichoderma* (*Hypocreaceae*) in Southern Europe and Macaronesia. **Studies in Mycology**, v. 80, p. 1-87, 2015.
- JELEŃ, H., BŁASZCZYK, L., CHEŁKOWSKI, J., ROGOWICZ, K., STRAKOWSKA, J. Formation of 6-n-pentyl-2H-pyran-2-one (6-PAP) and other volatiles by different *Trichoderma* species. **Mycological Progress**, 13(3), 589-600, 2014.
- JIANG, C. H., LIAO, M. J., WANG, H. K., ZHENG, M. Z., XU, J. J., GUO, J. H. *Bacillus velezensis*, a potential and efficient biocontrol agent in control of pepper gray mold caused by *Botrytis cinerea*. **Biological Control**, 126, 147-157. 2018.
- KADDES A., FAUCONNIER M.L., SASSI K., NASRAOUI B., JIJAKLI M.H. Endophytic fungal volatile compounds as solution for sustainable agriculture. **Molecules**, v. 24, n. 6, p. 1065, 2019.
- KLOEPPER, J.W., LIFSHITZ, R., ZABLOTOWICZ, R.M. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. **Trends in Biotechnology**. v.7, p.39-43, 1989.
- KUAN, K. B., OTHMAN, R., ABDUL RAHIM, K., SHAMSUDDIN, Z. H. Plant growth-promoting rhizobacteria inoculation to enhance vegetative growth, nitrogen fixation and nitrogen remobilisation of maize under greenhouse conditions. **PLoS one**, v. 11, n. 3, p. e0152478, 2016.
- KUHNEM JÚNIOR, P. R., STUMPF, R., SPOLTI, P., DEL PONTE, E. M. Características patogênicas de isolados do complexo *Fusarium graminearum* e de *Fusarium verticillioides* em sementes e plântulas de milho. **Ciência Rural, Santa Maria**, v.43, n.4, p.583-588, 2013.
- KUMAR, S. *Trichoderma*: A biological weapon for managing plant diseases and promoting sustainability. **International Journal of Agriculture Science and Medical veterinary**, v. 1, n. 3, p. 106-121, 2013.

KUPPER, K.C., CERVANTES, A.L.L., KLEIN, M.N., SILVA, A. C. da. Avaliação de microrganismos antagônicos, *Saccharomyces cerevisiae* e *Bacillus subtilis* para o controle de *Penicillium digitatum*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n. 2, p. 425-436, 2013.

KWIATKOWSKI, A., CLEMENTE, E. Características do milho doce (*Zea mays* L.) para industrialização. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, Ponta Grossa, v. 1, n. 2, p. 93-103, 2007.

LOGAN, N. A., LEBBE, L., HOSTE, B., GORIS, J., FORSYTH, G., HEYNDRICKX, M., MURRAY, B. L., SYME, N., WYNN-WILLIAMS, D. D., DE VOS, P. Aerobic endospore-forming bacteria from geothermal environments in northern Victoria Land, Antarctica, and Candlemas Island, South Sandwich archipelago, with the proposal of *Bacillus fumarioli* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 50, n. 5, p. 1741-1753, Sep. 2000.

LOZADA, B.I., ANGELOCCI, L. R. Efeito da temperatura do ar e da disponibilidade hídrica do solo na duração de subperíodos e na produtividade de um híbrido de milho (*Zea mays*). **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, Santa Maria, v. 7, n. 1, p. 37-43, abr.1999.

LPSN. **List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature**. Disponível em: <https://lpsn.dsmz.de/genus/bacillus>. Acesso em: 5 maio de 2022.

LUGTENBERG, B. Introduction to plant-microbe interactions. In: Principles of Plant-Microbe Interactions. **Springer**, Cham, p. 1-2. 2015.

MADIGAN, M., JOHN, M., KELLY B., DANIEL, B., DAVID, S. **Microbiologia de Brock**, 14^o ed. Porto Alegre: Artmed. p. 960. 2016.

MAHANNA, B., B. SEGLAR, F. OWENS, S. DENNIS, NEWELL, R. **Silage Zone Manual**. DuPont Pioneer, Johnston, IA. 2014.

MAPA - **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Regras para análise de sementes. Brasília: Mapa/ACS, 399p. 2009.

MARCOS FILHO, J. Fisiologia de Sementes de Plantas Cultivadas. **ABRATES**, Londrina, PR, 2015.

MARKETS AND MARKETS. Biopesticides market by type, source, mode of application, formulation, crop application and region: global forecast to 2023. Charing: REPORT BUYER, 2019. Disponível em: <https://www.reportbuyer.com/product/4364825>. Acesso em: 7 de setembro de 2021.

MASI, M., NOCERA, P., REVEGLIA, P., CIMMINO, A., EVIDENTE, A. Fungal metabolites antagonists towards plant pests and human pathogens: Structure-activity relationship studies. **Molecules**, v. 23, n. 4, p. 834, 2018.

MAYO, S., CAMPELO, M. P., LORENZANA, A., RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, A., REINOSO, B., GUTIÉRREZ, S., CASQUERO, P. A. Antifungal activity and bean growth promotion of *Trichoderma* strains isolated from seed vs soil. **European Journal of Plant Pathology**, v. 158, n. 4, p. 817-828, 2020.

- MAYO, S., GUTIERREZ, S., MALMIERCA, M. G., LORENZANA, A., CAMPELO, M. P., HERMOSA, R., CASQUERO, P. A. Influence of *Rhizoctonia solani* and *Trichoderma* spp. in growth of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and in the induction of plant defense-related genes. **Frontiers in Plant Science**, 6, 685.2015.
- MAZA, M., PAJOT, H. F., AMOROSO, M. J., , YASEM, M. G. Post-harvest sugarcane residue degradation by autochthonous fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 87, p. 18-25, 2014.
- MEDEIROS, F.H.V., SILVA, J.C.P., PASCHOLATI, S.F. Controle biológico de doenças em plantas. In: AMORIM, L., REZENDE, J. A. M. BERGAMIN FILHO, A., **Manual de fitopatologia: Princípios e Conceitos**. 5^o ed. Ouro Fino: Agronômica Ceres, p. 261-274. 2018.
- MEDEIROS, J. G. F., ARAUJO NETO, A. C., URSULINO, M. M., NASCIMENTO, L. C. D., ALVES, E.U. Fungos associados às sementes de *Enterolobium contortisiliquum*: análise da incidência, controle e efeitos na qualidade fisiológica com o uso de extratos vegetais. **Ciência Florestal**, v. 26, p. 47-58, 2016.
- MEDEIROS, M S., ALMEIDA, S. D. M. C., CARNAÚBA, J. P., DA SILVA, A. K., DOS SANTOS, T. M. C., DA SILVA, J. M. Antagonismo in vitro de *Fusarium oxysporum* por cepas de *Trichoderma* spp. *Cadernos de Agroecologia*, 15(2), 2020.
- MENG, X., MIAO, Y., LIU, Q., MA, L., GUO, K., LIU, D., SHEN, Q. TgSWO from *Trichoderma guizhouense* NJAU4742 promotes growth in cucumber plants by modifying the root morphology and the cell wall architecture. **Microbial cell factories**, 18(1), 1-15. 2019.
- MILJAKOVIĆ, D, MARINKOVIĆ, J, BALEŠEVIĆ-TUBIĆ, S. The significance of *Bacillus* spp. in disease suppression and growth promotion of field and vegetable crops. **Microorganisms**, v. 8, n. 7, p. 1037, 2020.
- MIRANDA, C. A., MARTINS, O. B., CLEMENTINO, M. M. Species-level identification of *Bacillus* strains isolates from marine sediments by conventional biochemical, 16S rRNA gene sequencing and inter-tRNA gene sequence lengths analysis. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 93, n. 3, p. 297-304, Mar. 2008.
- MYCOBANK. **Mycobank Database**: Fungal Databases, Nomenclatures, Species Banks. Disponível em:
<https://www.mycobank.org/page/Simple%20names%20search>Acesso em: 4 setembro de 2021.
- NARASIMHAN, A., SHIVAKUMAR, S. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* root rot of chilli by *Bacillus subtilis* formulations under pot conditions. **Journal of Biological Control**, v. 30, n. 2, p. 109-118, 2016.
- NARASIMHAN, A., SHIVAKUMAR, S. Evaluation of *Bacillus subtilis* (JN032305) biofungicide to control chilli anthracnose in pot controlled conditions. **Biocontrol Science and Technology**, v. 25, n. 5, p. 543-559, 2015.

- NIRMALKAR, V. K., SINGH, S., TIWARI, R. S., SAID, P. P., KAUSHIK, D. K. Field efficacy of *Trichoderma harzianum* and Rhizobium against wilt complex of Chickpea. **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci**, v. 6, n. 7, p. 1421-1429, 2017.
- O'BRIEN, P. A. Biological control of plant diseases. **Australasian Plant Pathology**, v. 46, n. 4, p. 293-304, 2017.
- OLIVEIRA JÚNIOR, L. F. G., DELIZA, R., BRESSAN-SMITH, R., PEREIRA, M. G., CHIQUIERE, T. B. Seleção de genótipos de milho mais promissores para o consumo in natura. **Ciência de Tecnologia de Alimentos**, v.26, p.159-165, 2006.
- OLIVEIRA, J. C., SALES, J. F., RUBIO-NETO, A., SILVA, C. F., SOARES, M. A., SILVA, F. G. Biological control in the germination of seeds from two species native of the Cerrado region. **Brazilian Journal of Biology**, v. 81, p. 105-113, 2020.
- PANDEY, P. K., SINGH, M. C., SINGH, S., SINGH, A., KUMAR, M., PATHAK, M., SHAKYWAR, R. C., PANDEY, A. K. Inside the plants: endophytic bacteria and their functional attributes for plant growth promotion. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, Tamil Nadu, v. 6, n. 2, p. 11 -21, 2017.
- PATIL, A. S., PATIL, S. R., PAIKRAO, H. M. *Trichoderma* secondary metabolites: Their biochemistry and possible role in disease management. **In Microbial-mediated induced systemic resistance in plants**. Springer, Singapore, 2016. p. 69-102. 2016.
- PAZ, I. C. P., SANTIN, R. C. M., GUIMARÃES, A. M., ROSA, O. P. P. D., QUECINE, M. C., SILVA, M. C. P. E., AZEVEDO, J. L., MATSUMURA, A. T. S. Biocontrol of *Botrytis cinerea* and *Calonectria gracilis* by eucalypts growth promoters *Bacillus* spp. **Microbial Pathogenesis**, 2018.
- PEREIRA F., ISRAEL A., TEIXEIRA, F. F. O cultivo do milho-doce. **Brasília, DF: Embrapa**, 2016.
- PEREIRA FILHO, I.A. **O cultivo do milho verde. Embrapa Milho e Sorgo**. Sete Lagoas, MG. 217 p. 2002.
- PINTO, N. F. J. de A. Grãos ardidos em milho. Sete Lagoas: **Embrapa Milho e Sorgo**, 6 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica, 66). 2005.
- POVEDA, J. *Trichoderma* as biocontrol agent against pests: New uses for a mycoparasite. **Biological Control**, v. 159, p. 104634, 2021.
- PRESTES, I. D., ROCHA, L. O., NUÑEZ, K. V., SILVA, N. C. Principais fungos e micotoxinas em grãos de milho e suas consequências. **Scientia Agropecuaria**, v. 10, n. 4, p. 559-570, 2019.
- RAO, D. L. N. Recent advances in biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Proceedings of the Indian National Science Academy*, Calcutá, v. 80, n. 2, p. 359-378, 2014.
- SABATÉ, D. C., BRANDAN, C. P., PETROSELLI, G., ERRA-BALSELLS, R., AUDISIO, M. C. Biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary on common bean

by native lipopeptide-producer *Bacillus strains*. **Microbiological research**, 211, 21-30. 2018.

SANGOI, L., SILVA, P. R. F., ARGENTA, G., RAMBO, L. **Ecofisiologia da cultura do milho para altos rendimentos**. Lages: Editora Graphel, p. 87, 2010.

SHAFI, J., TIAN, H., JI, M. *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v.31, n.3, p 446-459, 2017.

SHARMA, R. R., SINGH, Dinesh, SINGH, Rajbir. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. **Biological control**, v. 50, n. 3, p. 205-221, 2009.

SILVA, F. F. D., CASTRO, E. D. M., MOREIRA, S. I., FERREIRA, T. C., LIMA, A. E. D., ALVES, E. Emergência e análise ultraestrutural de plântulas de soja inoculadas com *Sclerotinia sclerotiorum* sob efeito da aplicação de *Trichoderma harzianum*. **Summa Phytopathologica**, v. 43, p. 41-45, 2017.

SOUZA, M.LC. *Parâmetros fisiológicos do cultivo de milho-doce sob influência de deficiência hídrica*. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita". Botucatu, SP. (Master thesis), 2018.

SOUZA, R. D., AMBROSINI, A., PASSAGLIA, L. M. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. **Genetics and molecular biology**, 38, 401-419. 2015.

TEIXEIRA, F. F., DE MIRANDA, R. A., PAES, M. C. D., DE SOUSA, S. M., GAMA, E. E. G. Melhoramento do milho-doce. **Embrapa Milho e Sorgo-Documents (INFOTECA-E)**. 2013.

TEIXEIRA, F. F., PAES, M. C. D., GAMA, E. E. G., PEREIRA FILHO, I. A., MIRANDA, R. A. D., GUIMARÃES, P. E. D. O., MACHADO, J. R. D. A. BRS Vivi: single-cross super sweet corn hybrid. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 14, p. 124-127. Brazilian Society of Plant Breeding. 2014.

TRACY, W. F. Sweet corn. In: Hallauer A.R. **Specialty corns**, p. 155- 198. 2001.

USDA: United States Department of Agriculture. **World agricultural production**. Disponível em: <http://www.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production.pdf> (Acesso em: 29 de abril de 2022).

VEENSTRA, A., RAFUDEEN, M. S., MURRAY, S. L. *Trichoderma asperellum* isolated from African maize seed directly inhibits *Fusarium verticillioides* growth in vitro. **European journal of plant pathology**, v. 153, n. 1, p. 279-283, 2019.

VERMA, H., KUMAR, D., KUMAR, V., KUMARI, M., SINGH, S. K., SHARMA, V. K., KUMAR, A. The potential application of endophytes in management of stress from drought and salinity in crop plants. **Microorganisms**, 9(8), 1729. 2021.

WOLOSHUK, C., WISE, Kiersten. Diseases of corn: *Aspergillus* ear rot. **Purdue University**, v. 3, 2011.

WU, L., WU, H., QIAO, J., GAO., BORRIS, R. Novel Routes for Improving Biocontrol Activity of *Bacillus* Based Bioinoculants. **Front. Microbiol.**, v. 6, n. 1395, 2016.

Yahyazadeh, M., Omidbaigi, R., Zare, R., Taheri, H. Effects of some essential oils on mycelial growth of *Penicillium digitatum* Sacc. **World J. Microbiology and Biotechnology**. V.24, p,1445–1450. 2008.

YÁNEZ-MENDIZÁBAL, V., FALCONÍ, C. E. Efficacy of *Bacillus* spp. to biocontrol of anthracnose and enhance plant growth on Andean lupin seeds by lipopeptide production. **Biological control**, v. 122, p. 67-75, 2018.

YUAN, J., RAZA, W., SHEN, Q., HUANG, Q. Antifungal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 volatile compounds against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. **Applied and environmental microbiology**, 78(16), 5942-5944. 2012

YUAN, M., HUANG, Y., GE, W., JIA, Z., SONG, S., ZHANG, L., HUANG, Y. Involvement of jasmonic acid, ethylene and salicylic acid signaling pathways behind the systemic resistance induced by *Trichoderma longibrachiatum* H9 in cucumber. **BMC genomics**, 20(1), 1-13. 2019.

ZHANG, J., CHEN, G.-Y., LI, X.-Z., HU, M., WANG, B.-Y., RUAN, B.-H., ZHOU, H., ZHAO, L.-X., ZHOU, J., DING, Z.-T., et al. Phytotoxic, antibacterial, and antioxidant activities of mycotoxins and other metabolites from *Trichoderma* sp. **Natural product research**, v. 31, n. 23, p. 2745-2752, 2017.

ZHANG, X., GAO, Z., ZHANG, X., BAI, W., ZHANG, L., PEI, H., ZHANG, Y. Control effects of *Bacillus siamensis* G-3 volatile compounds on raspberry postharvest diseases caused by *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer*. **Biological Control**, 141, 104135. 2020.

ZHAO, X., ZHOU, Z. J., HAN, Y., WANG, Z. Z., FAN, J., XIAO, H. Z. Isolation and identification of antifungal peptides from *Bacillus* BH072, a novel bacterium isolated from honey. **Microbiological research**, v. 168, n. 9, p. 598-606, 2013.

ZUCARELI, C., BRZEZINSKI, C. R., GUISTEM, J. M., HENNING, F. A., NAKAGAWA, J. Qualidade fisiológica de sementes de milho doce classificadas pela espessura e largura. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 44, n. 1, p. 71-78, jan./mar, 2014.