

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

NATANIEL OSMAR RISSE

USO DE BACTÉRIAS E EXTRATOS DE LIPOPEPTÍDEOS NO CONTROLE DA  
ANTRACNOSE EM SORGO



PALOTINA

2025

NATANIEL OSMAR RISSE



USO DE BACTÉRIAS E EXTRATOS DE LIPOPEPTÍDEOS NO CONTROLE DA  
ANTRACNOSE EM SORGO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, no Setor Palotina, na Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia

Orientador: Prof<sup>o</sup> Dr. Robson F. Missio  
Coorientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Vivian C. Missio  
Coorientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Luciana Grange

PALOTINA  
2025

Universidade Federal do Paraná. Sistemas de Bibliotecas.  
Biblioteca UFPR Palotina.

R596 Risse, Nataniel Osmar  
Uso de bactérias e extratos de lipopeptídeos no controle  
da antracnose em sorgo / Nataniel Osmar Risse.  
– Palotina, PR, 2025.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná,  
Setor Palotina, PR, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.  
Orientador: Prof. Dr. Robson Fernando Missio.  
Coorientadora: Profa. Dra. Vivian C. Missio.  
Coorientadora: Profa. Dra. Luciana Grange.

I. Bacillus. 2. Biocontrole. 3. Metabólitos. I. Missio,  
Robson Fernando. II. Missio, Vivian C. III. Grange, Luciana.  
IV. Universidade Federal do Paraná. V. Título.

CDU 602



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR PALOTINA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOTECNOLOGIA -  
40001016083P6

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação BIOTECNOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **NATANIEL OSMAR RISSE**, intitulada: **USO DE BACTÉRIAS E EXTRATOS DE LIPOPEPTÍDEOS NO CONTROLE DA ANTRACNOSE EM SORGO**, sob orientação do Prof. Dr. ROBSON FERNANDO MISSIO, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

PALOTINA, 14 de Março de 2025.

Assinatura Eletrônica

17/03/2025 16:12:55.0

ROBSON FERNANDO MISSIO  
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

18/03/2025 09:32:56.0

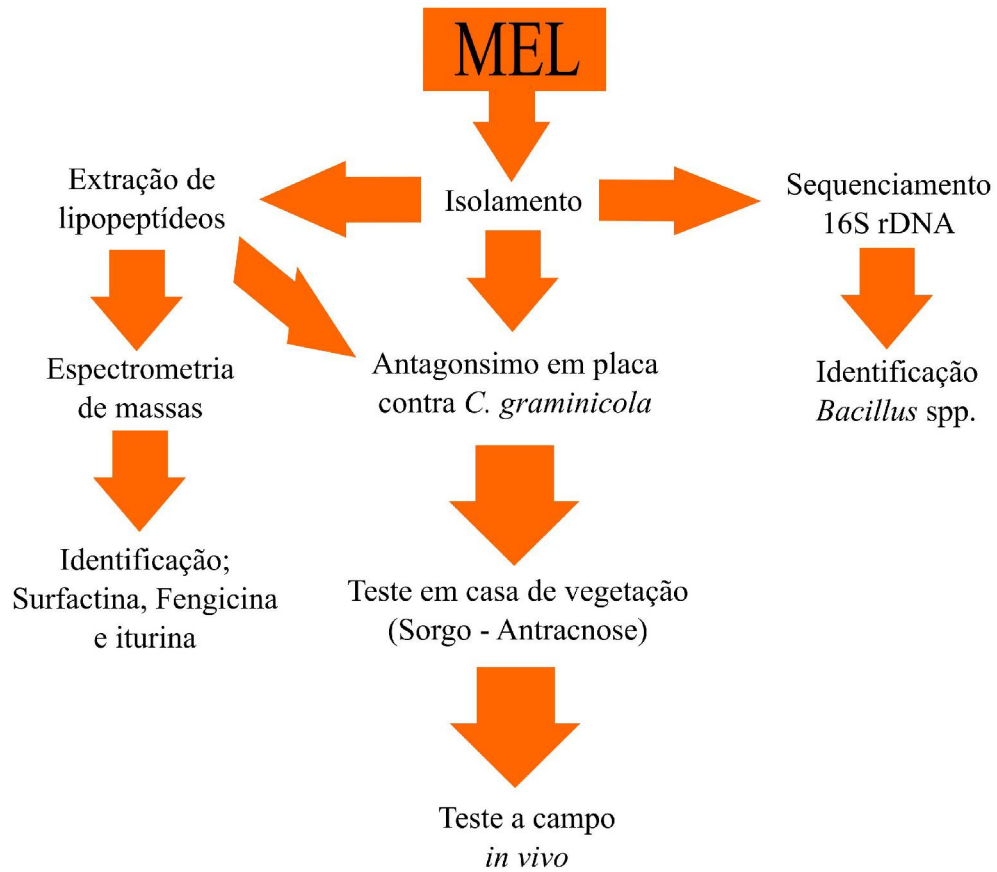
ROBERTO LUIS PORTZ  
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

21/03/2025 17:26:08.0

DANIEL AUGUSTO SCHURT  
Avaliador Externo (EMBRAPA)

## RESUMO GRÁFICO



## RESUMO

As mudanças climáticas estão afetando a produção de muitas culturas e há uma necessidade crescente de reduzir o uso de produtos químicos no campo. Com isso, a produção e uso do sorgo, uma cultura mais tolerante à escassez hídrica, estão crescendo no mundo assim como o uso agentes de controle biológico. O fungo *Colletotrichum graminicola*, agente causador da antracnose, é a doença mais importante na cultura. Até o momento, não há nenhum produto biológico para o seu controle. Por isso, o objetivo deste estudo é estudar um composto biológico que possa reduzir a incidência e os danos da antracnose na produção de sorgo e ainda fornecer uma alternativa mais sustentável para a cultura. Bactérias isoladas do mel e identificadas por meio de sequenciamento da região 16S rDNA como pertencentes do gênero *Bacillus* spp foram submetidos a testes *in vitro* para selecionar as cepas com melhor antagonismo ao patógeno. Foram extraídos os lipopeptídeos destas bactérias e constatado a presença de Surfactina, Fengicina e Iturina no extrato. Em casa de vegetação, as bactérias e os extratos foram pulverizados em plantas de sorgo, onde os melhores tratamentos foram selecionados para teste a campo por meio de índice de clorofila e área foliar afetada. Avaliou-se a incidência, severidade e área foliar atingida pela Antracnose a campo e conclui-se que três isolados podem ser usados como agentes no controle da antracnose em sorgo, na formulação com talco e na formulação de lipopeptídeos. Novos estudos são necessários para avaliar a eficiência a campo e melhorar a formulação dos lipopeptídeos.

Palavras-chave: biocontrole; *Bacillus*; metabólitos.

## ABSTRACT

Climate change is affecting the production of many crops and there is a growing need to reduce the use of chemicals in the field. As a result, the production and use of sorghum, a crop that is more tolerant to water scarcity, is growing worldwide, as is the use of biological control agents. The fungus *Colletotrichum graminicola*, the causative agent of anthracnose, is the most important disease in the crop. To date, there is no biological product for its control. For this reason, the aim of this study is to investigate a biological compound that can reduce the incidence and damage of anthracnose in sorghum production and also provide a more sustainable alternative for the crop. Bacteria isolated from honey and identified by sequencing the 16S rDNA region as belonging to the genus *Bacillus* spp. were subjected to *in vitro* tests to select the strains with the best antagonism to the pathogen. The lipopeptides of these bacteria were extracted and the presence of Surfactin, Fengicin and Iturin in the extract was verified. In the greenhouse, the bacteria and extracts were sprayed on sorghum plants, where the best treatments were selected for field testing using the chlorophyll index and affected leaf area. The incidence, severity and leaf area affected by anthracnose in the field were evaluated and it was concluded that three isolates could be used as agents to control anthracnose in sorghum, in the talc formulation and in the lipopeptide formulation. Further studies are needed to evaluate field efficiency and improve the lipopeptide formulation.

Key words: biocontrol; *Bacillus*; metabolite.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>Introdução.....</b>	<b>5</b>
<b>2</b>	<b>Material e métodos.....</b>	<b>6</b>
2.1	Identificação da bactéria.....	7
2.2	Ensaio de antagonismo.....	8
2.3	Produção de bactérias e extratos.....	9
2.4	Ensaio em casa de vegetação.....	10
2.5	Ensaio de campo.....	11
<b>3</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>12</b>
3.1	Identificação das bactérias.....	12
3.2	Ensaio em casa de vegetação.....	16
3.3	Ensaio de campo.....	18
<b>4</b>	<b>Discussão.....</b>	<b>19</b>
4.1	Ensaio <i>In vitro</i> .....	19
4.2	Ensaio em casa de vegetação.....	21
4.3	Ensaio a campo.....	22
<b>5</b>	<b>Conclusões.....</b>	<b>23</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>24</b>

## 1 Introdução

A Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO, 2023) declarou o ano de 2023 como o "Ano Internacional do Sorgo". O objetivo é promover seu cultivo devido a seus múltiplos benefícios nutricionais e à saúde, bem como sua adequação ao cultivo em condições climáticas adversas e variáveis. Essa campanha está alinhada com 6 das 17 metas de desenvolvimento sustentável, incluindo Ação Climática, Fim da Fome e Consumo e Produção Sustentáveis.

No Brasil, a produção de sorgo tem aumentado nos últimos anos (IBGE, 2023) devido a crescente demanda para alimentação animal, produção de etanol e sua adoção em substituição ao milho nas situações de déficit hídrico decorrente dos efeitos do *la niña*, além disso, acordos para exportação do grão tem sido fechados, o que deve aumentar a demanda e seu preço.

Uma maneira de melhorar a produtividade das culturas é controlar as doenças que reduzem a produtividade. A antracnose do sorgo foi relatada pela primeira vez no Togo em 1902 e atualmente é a principal doença da cultura em todo o mundo. É uma doença causada pelo fungo *Colletotrichum graminicola* que infecta folhas, caules e panículas (Mathur *et al.*, 2002). A antracnose pode causar perdas de rendimento de 50 a 70%, reduzir a germinação e pode ser disseminada por sementes (Ali *et al.*, 1992; Thomas *et al.*, 1995).

Esse patógeno é controlado principalmente por fungicidas químicos, que permanecem no solo, no ar, na água e nos organismos vivos, contribuindo para a perda da biodiversidade (Goulet *et al.*, 2023; Pesce *et al.*, 2023; Corrêa *et al.*, 2025). Além disso, os casos de resistência de patógenos a fungicidas aumentaram, assim como o preço e as sanções contra seu uso (Bruce *et al.*, 2017; Pertot *et al.*, 2017; Price *et al.*, 2015; MA; Michailides 2005).

O desafio de reduzir o uso de pesticidas químicos tem sido uma tarefa recorrente e essencial. O desenvolvimento e o registro de agentes de biocontrole estão crescendo em todo mundo (Pesce *et al.*, 2023; Adesina *et al.*, 2023; Meng *et al.*, 2022). Dentre os organismos que se destacam na produção de bioinsumos está o gênero *Bacillus*, devido à características como formação de endósporos, o que garante maior resistência por este organismo às condições de aplicação e formulação garantindo um produto estável (Ongena & Jacques, 2008).

Entretanto, a característica que realmente faz deste um grupo interessante no uso como biopesticida, é a capacidade de produzir antibióticos como os lipopeptídeos, os quais são divididos em três famílias de moléculas; surfactina, iturina e fengicina (Ongena & Jacques, 2008).

Ambas as moléculas possuem propriedades que agem contra a camada lipídica de bactérias, vírus, fungos e leveduras. Podem agir sinergicamente complementando organismos-alvo e mecanismos de ação (Maget-Dana, *et al.*, 1992; Ongena, *et al.*, 2007; Romero, *et al.*, 2007).

Até o momento não há nenhum agente de controle biológico registrado no Brasil contra este patógeno, portanto, atendendo aos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável, como o registro de agentes de biocontrole, qualquer pesquisa sobre novos agentes biológicos que possam controlar doenças e melhorar a produtividade dos alimentos é incentivada (FAO, 2021).

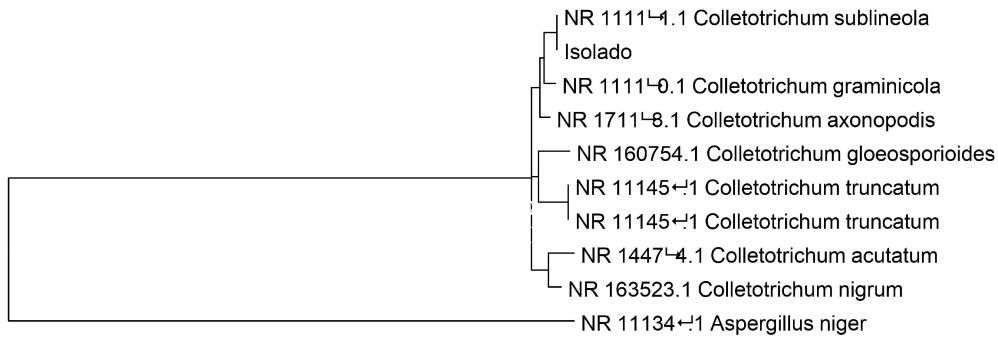
Então, objetivou-se desenvolver e avaliar o potencial de uma coleção de bactérias e seus lipopeptídeos para o controle da antracnose da cultura do sorgo.

## 2 Material e métodos

O patógeno usado neste estudo foi coletado de plantas infectadas em uma área agrícola do município de Maripá, Paraná, Brasil, nas seguintes coordenadas: 24026'11.6 "S 53 051'34.7 "W.

Os esporos de *C. graminicola* foram produzidos em placas de Petri com meio Farinha de aveia-ágar (6% de farinha de aveia, 3% de ágar), o fungo foi plantado no centro e incubado em BOD a 25°C e fotoperíodo de 12h durante 10 dias. Posteriormente os micélios foram lavados com 10 mL de solução salina 0,85% NaCl para obtenção da suspensão de esporos e calibrada para a concentração de  $1 \times 10^4$  esporos mL<sup>-1</sup> para uso nos experimentos (Valério *et al.*, 2005).

Figura 1. Árvore filogenética de patógeno isolado de Sorgo.



Para confirmação da identidade do patógeno foi feito o sequenciamento da região ITS-4 do DNA genômico seguido pelo multialinhamento das sequências feito no software ClustalW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) e construção de árvore filogenética pelo método de *maximum-likelihood* através do software Mega X (<https://www.megasoftware.net/>) juntamente com as espécies prováveis cujas sequências de referência foram obtidas através do site BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Figura 1). O DNA foi extraído conforme Duarte *et al.* (2019).

Conforme a figura 1, o fungo isolado foi agrupado junto de *Colletotrichum sublineola*, no entanto, conforme relatado por Costa *et al.* (2003), esta nomenclatura não foi bem aceita e raramente é atribuída a isolados oriundos de *Sorghum bicolor*, por isso, confirmamos a identidade como *C. graminicola*.

## 2.1 Identificação da bactéria

As bactérias usadas neste estudo pertencem a coleção de microrganismos do laboratório de biologia do solo da UFPR-Setor Palotina e são oriundas de isolamento de amostras de mel conforme a norma de coleta de produtos de origem animal para análises microbiológicas (BRASIL, 2020). O isolamento foi feito pelo método de plaqueamento de diluições seriadas em placas com meio DYGS (Rodrigues Neto *et al.*, 1986).

A identificação das cepas foi escolhida como "MELTA" porque elas foram isoladas do mel e TA são as iniciais de *Tetragonisca angustula*, a abelha que produziu esse mel.

Realizou-se a extração de DNA de todas as cepas seguindo o protocolo baseado em CTAB (Minas *et al.*, 2011). Em seguida, foi feita uma PCR (reação em cadeia da polimerase) de acordo com o protocolo 16S (Weissburg *et al.*, 1991) usando os primers fD1 e rD1. O produto da PCR foi purificado e sequenciado pela ACTgene

Análises Moleculares Ltd. (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil) usando o sequenciador automático AB 3500 Genetic Analyzer equipado com capilares de 50 cm e polímero POP7 (Applied Biosystems) Os dados de sequenciamento foram coletados usando o software Data Collection 3 (Applied Biosystems).

As sequências *forward* e *reverse* foram analisadas no BioEdit para criar a sequência de *consenso* (HALL, 2021). Em seguida, essas sequências foram submetidas ao BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para encontrar espécies semelhantes. As três espécies mais semelhantes para cada isolado foram selecionadas e suas sequências de referência foram baixadas para construir a árvore filogenética.

Primeiramente, todas as sequências foram multialinhadas com o ClustalW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>), então usamos o software Mega X (<https://www.megasoftware.net/>) para criar a árvore filogenética (Tamura K., 2021; Thompson *et al.*, 1994).

## 2.2 Ensaio de antagonismo

O ensaio de antagonismo *in vitro* foi desenvolvido por meio da técnica de dupla cultura (Paulitz *et al.*, 1992), as bactérias foram cultivadas em meio DYGS (Rodrigues Neto *et al.*, 1986) a 270°C por 24 horas e o patógeno, *C. graminicola*, foi cultivado em meio farinha de aveia-ágar (Valerio *et al.*, 2005) a 25°C com 12 horas de luz LED. Discos de 5 mm do fungo foram colocados no centro das placas de Petri com meio Batata Dextrose Agar (BDA), as bactérias foram semeadas “riscadas” em meio de cultura BDA, dentro de placas de Petri e, em seguida, armazenadas na incubadora BOD a 250°C com 12 horas de luz (Kiraly *et al.*, 1970; Tuite, 1969). Quando as hifas dos fungos nas placas controle, encostaram nas bordas das placas de Petri foi medido o crescimento radial dos fungos, utilizando um paquímetro digital.

Esses testes foram feitos com 6 repetições e repetidos duas vezes, em um delineamento completamente casualizado.

O controle foi calculado com a fórmula descrita por Gaigole *et al.* (2011):

$$I = (C-T)/C \times 100$$

Onde; I é a taxa de inibição, C é o crescimento radial do patógeno nas placas de controle e T é o crescimento radial do patógeno nas placas de tratamento.

### 2.3 Produção de bactérias e extratos

As bactérias foram produzidas em meio líquido DYGS a 27°C, 220 rpm por 72h em agitador orbital, depois disso, centrifugadas a 2200 rpm por 10 min, ressuspensas em 50 mL de solução de salina 0,85% de NaCl e Tween 20 (1:1000) e, em seguida, essa solução foi misturada com 100g de formulação à base de talco (81,5g de talco, 15g de CaCO<sub>3</sub>, 2,5g de glicose, 1g de carboximetilcelulose), seca a 55°C por 48h, moída com almofariz e pistilo e armazenada em geladeira até o uso (Martínez-Álvarez *et al.*, 2016), a formulação visa manter a estabilidade e viabilidade do inóculo por mais tempo.

Para calibrar a concentração dos inóculos, a UFC (Unidade Formadora de Colônia) foi obtida por meio de diluição seriada de 1g dos inóculos e espalhada em 100µL em placas de Petri com meio DYGS e incubada em BOD nas mesmas condições que o crescimento das bactérias para a técnica de cultura dupla, as placas foram contadas e a concentração calculada.

O extrato de lipopeptídeos da bactéria foi obtido conforme relatado por Jia *et al.* (2023) com algumas modificações, as bactérias foram cultivadas em frascos de vidro de 2,5 L com 2 L de meio de cultura DYGS líquido (sem adição de ágar), com ar provido de um inalador com filtro bacteriológico 0,45 µm sob banho maria a 35°C durante 72h. Após o cultivo, o caldo foi centrifugado para remover as células bacterianas, o sobrenadante foi acidificado para pH 2,0 com uso de HCl 6M, deixado *overnight* a 4°C e novamente centrifugado, agora para recuperar os lipopeptídeos precipitados, estes foram então ressuspensos em 24 ml de metanol, para análise de espectrometria de massas foi usado MeOH grau HPLC, para uso nos experimentos foi utilizado MeOH normal, a solução foi então deixada em temperatura ambiente até a completa evaporação do metanol, pesada para quantificação da produção e então o extrato foi diluído em 6 ml de NaOH 1M e armazenado em geladeira para uso.

Os extratos das bactérias selecionadas foram submetidas a análise de espectrometria de massas para confirmação da produção de lipopeptídeos pela Central de análises químicas do instituto de biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul conforme a metodologia a seguir. Os produtos foram dissolvidos em uma solução de 50% (v/v) de acetonitrila de grau cromatográfico (Tedia, Fairfield, OH, EUA), 50% (v/v) de água deionizada e 0,1% de ácido fórmico. As soluções foram infundidas diretamente e individualmente na fonte ESI por meio de uma bomba de

seringa (Harvard Apparatus) a uma taxa de fluxo de 150  $\mu\text{L min}^{-1}$ . ESI(+)-MS foi adquirido usando um espectrômetro de massa microTof (Q-TOF) híbrido de alta resolução e alta precisão (5  $\mu\text{L/L}$ ) (Bruker<sup>®</sup> Scientific) nas seguintes condições: as tensões do capilar e do cone foram ajustadas para +3500 V e +40 V, respectivamente, com uma temperatura de dessolvatação de 100°C. Os íons de diagnóstico em diferentes frações foram identificados pela comparação de sua massa exata ( $m/z$ ) com compostos identificados em estudos anteriores.

Para aquisição e processamento dos dados de espectrometria de massa foi usado o software de análise de dados QTOF-control (Bruker<sup>®</sup> Scientific). Os dados foram coletados na faixa de  $m/z$  de 70-2000 na velocidade de duas varreduras por segundo, fornecendo a resolução de 50.000 (FWHM) em  $m/z$  200. Após estes foram analisados no software Mzmine (Schmid *et al.*, 2023).

#### 2.4 Ensaio em casa de vegetação

Para o ensaio em casa de vegetação, foram semeados dois híbridos (PR401-Priorizi<sup>®</sup> e ALVO-Nugrain<sup>®</sup>) escolhidos conforme relatado por produtores como sendo cultivares mais resistentes e suscetíveis a antracnose respectivamente, com seis repetições e doze tratamentos em delineamento inteiramente casualizado, o efeito das bactérias foi testado em duas formulações, em talco e em lipopeptídeos, também foram utilizados três controles e dois tratamentos comerciais, um controle sem inoculação da doença, para contrapor os efeitos com uma planta sadia e dois controles com apenas a formulação de diluição das bactérias, a formulação de talco e de hidróxido de sódio.

Os tratamentos seguiram o esquema a seguir: T0: controle sem inoculação da doença; T1: controle Talco; T2: MELTA04; T3: MELTA02; T4: MELTA05; T5: MELTA07; T6: controle NaOH<sup>+</sup>Água; T7: extrato de MELTA04; T8: extrato de MELTA02; T9: extrato de MELTA05; T10: extrato de MELTA07; T11: controle biológico comercial Bombardeiro<sup>®</sup> (*B. Subtilis*, *B. Velezensis*, *B. Pumilus*); T12: controle químico comercial Alade<sup>®</sup> (Benzovindiflupir, Ciproconazol, Difenconazol).

O solo usado nesses ensaios do tipo Latossolo vermelho eutroférico típico foi coletado na área do campus da UFPR-Setor Palotina, analisado e corrigido com  $\text{CaCO}_3$  três meses antes da semeadura. A fertilização foi feita no mesmo dia da semeadura, de acordo com a necessidade equivalente da análise do solo (150 (+50

após a emergência) kg de nitrogênio, 56 kg de fósforo e 50 kg de potássio por hectare).

Aos 30 e 37 dias após a emergência, as plantas foram pulverizadas com o inóculo por meio de um pulverizador manual, as bactérias diluídas na concentração de  $1 \times 10^6$  CFU mL<sup>-1</sup> e os lipopeptídeos na concentração de 50 µg mL<sup>-1</sup>, a concentração de ambos os produtos foi calculada e diluída a partir das contagem de UFC e pesagem realizadas após a produção, respectivamente. Cada planta foi pulverizada com 30 mL da respectiva solução.

Após 24 horas última aplicação dos tratamentos, a segunda folha abaixo da folha bandeira foi submetida a fermentos utilizando-se uma placa de agulhas com uma agulha por centímetro quadrado e então pulverizada com a suspensão de esporos de *C. graminicola*.

Aos 7, 14 e 21 dias após a inoculação, as plantas foram avaliadas quanto ao índice de clorofila com o equipamento Clorofilog (FALKER) e, no final do experimento aos 22 dias após a inoculação, a segunda folha abaixo da folha bandeira foi coletada e escaneada para analisar o percentual da área afetada pela doença, utilizando o pacote do RStudio Pliman (OLIVOTO, 2022).

Os dados da técnica de dupla cultura foram analisados no software R, usando o pacote *ExpDes.pt* (Ferreira et al. 2014).

## 2.5 Ensaio de campo

O experimento foi implantado na fazenda experimental da Universidade Federal do Paraná - Palotina, em um Latossolo vermelho eutroférico típico. O clima da região é classificado como subtropical por Köppen, com temperaturas acima de 22 °C e mais de 30 mm de chuva no mês mais seco (Alvares *et al.*, 2013).

Foram usados dois híbridos de sorgo, o NU420<sup>®</sup> e o ALVO<sup>®</sup>, ambos da Nuseed<sup>®</sup> (<https://nuseed.com/br/cultura/sorgo/>) cuja emergência ocorreu dia 14/10/24.

Para esse estudo, foram utilizados 8 tratamentos com 5 repetições seguindo um delineamento em blocos casualizados, cada parcela foi composta de 8 linhas com espaçamento de 0,45 m e 4 m de comprimento. Os tratamentos utilizados foram: T0- controle absoluto; T1: controle Talco; T2: MELTA05; T3: MELTA07; T4: extrato de MELTA05; T5: extrato de MELTA04; T6: controle biológico comercial

Bombardeiro<sup>®</sup> (*B. Subtilis*, *B. Velezensis*, *B. Pumilus*); T7: controle químico comercial Alade<sup>®</sup> (Benzovindiflupir, Ciproconazol, Difenconazol).

Da mesma forma que na casa de vegetação, as bactérias foram aplicadas na concentração de  $1 \times 10^6$  CFU mL<sup>-1</sup> e os lipopeptídeos na concentração de 50µg mL<sup>-1</sup> e a quantidade de calda aplicada foi a equivalente a 200 L ha<sup>-1</sup>.

Foram realizadas três aplicações dos tratamentos, aos 20, 35 e 50 dias após a emergência da cultura. Uma semana após cada aplicação foi realizada uma avaliação de incidência, contando o número de plantas com sintomas, e uma avaliação de severidade, onde as plantas da área útil da parcela foram avaliadas conforme metodologia de Trojan e Pria (2018).

No decorrer do desenvolvimento da cultura, foram realizadas quatro aplicações de inseticidas químicos (Clorpirifós e Lambda-Cialotrina) e três capinas manuais para controle de plantas daninhas.

Após o florescimento da cultura, as panículas já fecundadas foram protegidas com sacos de papel ou TNT contra o ataque de pássaros.

Assim como no ensaio em casa de vegetação, 3 folhas por parcela foram coletadas após a última avaliação e digitalizadas para análise do percentual de área foliar afetada pela doença.

Na maturidade fisiológica as panículas foram colhidas manualmente, deixadas em estufa a 50°C ou ao sol para secarem por um dia para facilitar a debulha, debulhadas e então as sementes foram submetidas a análise de umidade e pesagem para aferir a produtividade (kg ha<sup>-1</sup>).

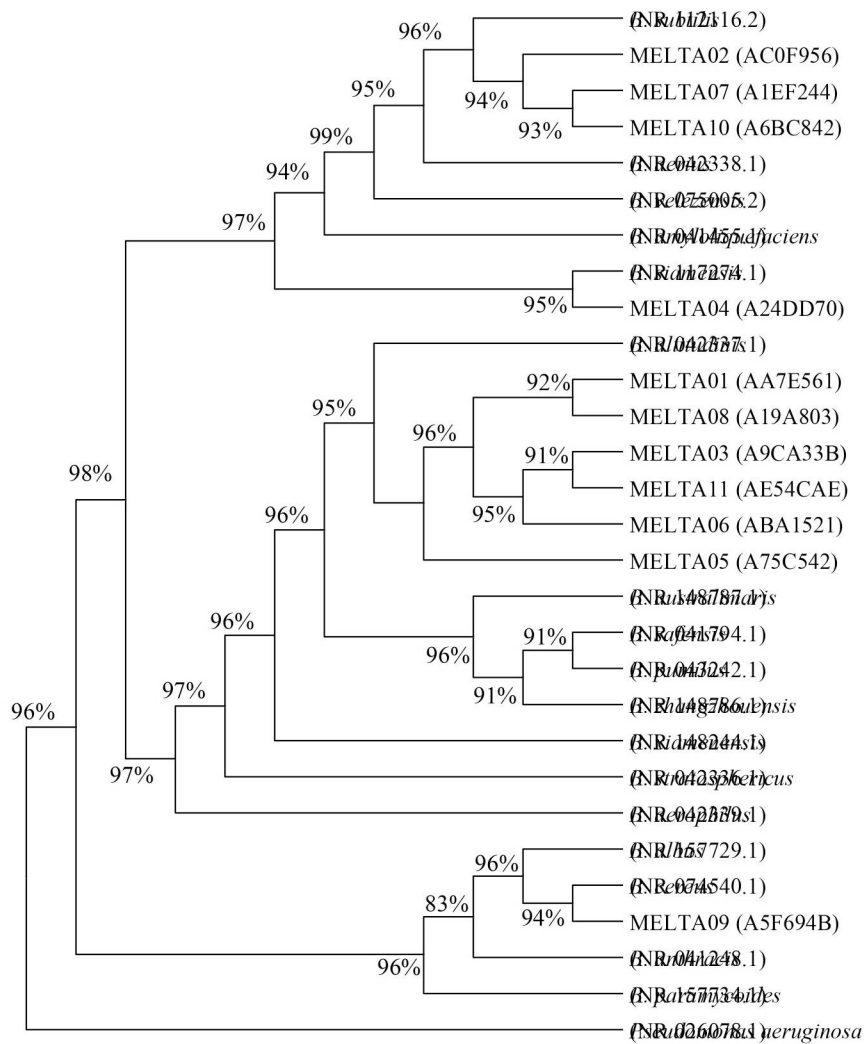
Os dados foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste Tukey ( $p < 0.05$ ), utilizando o pacote *ExpDes.pt* (Ferreira et al., 2014).

### **3 Resultados**

#### **3.1 Identificação das bactérias**

O alinhamento múltiplo foi realizado com o método de probabilidade máxima e o modelo de 3 parâmetros de Tamura (Tamura, 1992). Uma distribuição discreta de Gamma foi usada para modelar as diferenças de taxa evolutiva entre os locais (5 categorias (+G, parâmetro = 0,4224)). Foi possível encontrar com relativa precisão os gêneros e as espécies de cada isolado utilizados neste estudo (Figura 2).

Figura 2 - Árvore filogenética das bactérias isoladas do mel e utilizadas para o estudo de biocontrole do *Colletotrichum graminicola*.



Legenda: em parêntesis; Código Sisgen. Bactérias isoladas do Mel foram designadas MELTA01 a 11.

À medida que as bactérias foram identificadas, estas foram registradas no Sisgen com os códigos apresentados na Figura 2.

Conforme o agrupamento e a similaridade das sequências obtidas com as sequências tipo depositadas no GenBank sugerimos as espécies descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Espécie mais provável, com base no sequenciamento da região 16S DNAr, das cepas de bactérias isoladas do mel, e sua respectiva porcentagem de inibição *in vitro* contra *C. graminicola*.

Isolados	Código Sisgen	Espécie mais próxima	Comprimento (pb)	Similaridade (%)	Inibição (%)	Tukey (p<0,05)
MELTA01	AA7E561	<i>Bacillus altitudinis</i>	1453	99,25	51,5	ab
MELTA02	AC0F956	<i>Bacillus subtilis</i>	1480	99,46	67,2*	a
MELTA03	A9CA33B	<i>Bacillus altitudinis</i>	1435	99,03	50,0	ab
MELTA04	A24DD70	<i>Bacillus siamensis</i>	1497	99,33	67,2*	a
MELTA05	A75C542	<i>Bacillus altitudinis</i>	1481	99,59	75,8*	a
MELTA06	ABA1521	<i>Bacillus altitudinis</i>	1511	99,09	66,2	a
MELTA07	A1EF244	<i>Bacillus subtilis</i>	1461	99,31	69,2*	a
MELTA08	A19A803	<i>Bacillus altitudinis</i>	1509	99,46	61,1	ab
MELTA09	A5F694B	<i>Bacillus cereus</i>	1479	99,39	33,3	b
MELTA10	A6BC842	<i>Bacillus subtilis</i>	1503	99,60	54,5	ab
MELTA11	AE54CAE	<i>Bacillus altitudinis</i>	1494	99,32	49,5	ab
CV (%)						17,84

\*Isolados selecionados para os próximos testes.

A Tabela 1 mostra os resultados da inibição em ensaios *in vitro*, o teste de antagonismo revelou quatro isolados com inibição acima de 67%, estes foram para os testes em casa de vegetação e identificação do extrato (MELTA02, MELTA04, MELTA05 e MELTA07).

Apenas uma bactéria (MELTA07) alcançou um percentual de inibição superior a 70%, e outra que não alcançou 50% (MELTA09), mostrando que todas possuem em algum grau uma capacidade de inibir o crescimento de *C. graminicola* isolados do sorgo.

As massas exatas e os lipopeptídeos dos isolados MELTA02, MELTA04, MELTA05 e MELTA07 foram analisadas no equipamento ESI-QTOF-MS e comparadas com a literatura (Tabela 2).

Tabela 2. Massa e metabólitos secundários produzidos pelas cepas MELTA02, MELTA04, MELTA05 e MELTA07 utilizadas neste estudo.

Isolados	Massa observada	[M+H] <sup>+</sup>	[M+Na] <sup>+</sup>	Metabólito secundário identificado	Referência
4, 5	488,2353	489,2431		7-o-malonyl macrolactin A	Chen <i>et al.</i> (2018)
4, 2	510,2615	511,2693		7-o-malonyl macrolactin A	Chen <i>et al.</i> (2018)
4	580,3007	581,3085		Bacillaene A	Chen <i>et al.</i> (2018)
4	582,3040	583,3118		Bacillaene B	Chen <i>et al.</i> (2018)
4	602,2929	603,3007		Bacillaene A	Chen <i>et al.</i> (2018)
5	604,3943	605,4021		Bacillaene B	Chen <i>et al.</i> (2018)
7	994,6103		1017,600	Iturina A	Zhao <i>et al.</i> (2013)
7	1008,6341	1009,6419		Surfactina	Pathak <i>et al.</i> (2014); Pecci <i>et al.</i> (2010); de Souza <i>et al.</i> (2018)

7	1016,6011	1017,6089	Surfactina	Chen <i>et al.</i> (2019); Jemil <i>et al.</i> (2017)
7	1022,6512	1023,6590	Surfactina	Pathak <i>et al.</i> (2014); de Souza <i>et al.</i> (2018)
2, 4, 5, 7	1030,6153	1031,6231	Surfactina	Chen <i>et al.</i> (2019); Jemil <i>et al.</i> (2017); Pecci <i>et al.</i> (2010)
2, 7	1036,6637	1037,6715	Surfactina	Pathak <i>et al.</i> (2014); de Souza <i>et al.</i> (2018)
4	1044,6286	1045,6364	Iturina A	Zhao <i>et al.</i> (2013); Caldeira <i>et al.</i> (2011)
2, 4, 5, 7	1044,6298	1045,6376	Surfactina	Chen <i>et al.</i> (2019); Pathak <i>et al.</i> (2014); Pecci <i>et al.</i> (2010); Jemil <i>et al.</i> (2017)
2	1050,6902	1051,6980	Surfactina	Pathak <i>et al.</i> (2014); Jemil <i>et al.</i> (2017)
2, 4, 5, 7	1058,6441	1059,6519	Surfactina	Chen <i>et al.</i> (2019); Pecci <i>et al.</i> (2010)
7, 5, 4	1064,6888	1065,6966	Iturina A	Chen <i>et al.</i> (2019); Yu <i>et al.</i> (2002); Jemil <i>et al.</i> (2017)
2, 4, 5, 7	1072,6600	1073,6678	Surfactina	Chen <i>et al.</i> (2019)
7, 5, 4	1077,6315	1078,6393	Iturina A (C15)	Chen <i>et al.</i> (2019); Jemil <i>et al.</i> (2017)
7, 5, 2	1080,6298	1081,6376	Iturina A2	Yu <i>et al.</i> (2002)
7, 2	1447,7709	1448,7787	Fengicina A (C15)	Bie <i>et al.</i> (2009); Jemil <i>et al.</i> (2017)
2	1461,8016	1462,8094	Fengicina A	de Souza <i>et al.</i> (2018)
2, 4, 7	1463,7686	1464,7764	Fengicina A	Chen <i>et al.</i> (2019); Bie <i>et al.</i> (2009)
2, 4, 7	1475,7954	1476,8032	Fengicina B	Chen <i>et al.</i> (2019)
2, 4, 7	1476,8200	1477,8278	Fengicina	de Souza <i>et al.</i> (2018); Bie <i>et al.</i> (2009); Jemil <i>et al.</i> (2017)
4, 7, 2	1477,7831	1478,7909	Fengicina	Chen <i>et al.</i> (2019); Bie <i>et al.</i> (2009); Jemil <i>et al.</i> (2017)
2	1489,8359	1490,8437	Fengicina B	de Souza <i>et al.</i> (2018); Bie <i>et al.</i> (2009)
4, 7, 2	1491,7981	1492,8059	Fengicina B	Chen <i>et al.</i> (2019); Jemil <i>et al.</i> (2017)
4, 7, 2	1505,8132	1506,8210	Fengicina B	de Souza <i>et al.</i> (2018); Jemil <i>et al.</i> (2017); Bie <i>et al.</i> (2009); Pecci <i>et al.</i> (2010); Chen <i>et al.</i> (2019)
7	739,3969*	1477,7860	Fengicina B	de Souza <i>et al.</i> (2018); Jemil <i>et al.</i> (2017)
7	746,4055*	1491,8032	Fengicina B	de Souza <i>et al.</i> (2018); Jemil <i>et al.</i> (2017)
7	753,4102*	1505,8126	Fengicina B	de Souza <i>et al.</i> (2018); Jemil <i>et al.</i> (2017)

\* Sinal de carga dupla. 2, 4, 5 e 7: MELTA02, MELTA04, MELTA05 e MELTA07, respectivamente.

Muitos estudos têm sido publicados com a identificação de lipopeptídeos e outros metabólitos secundários como citado na Tabela 2, pelo mesmo método e em bactérias do mesmo gênero, *Bacillus* sp. Observou-se que os isolados MELTA02, MELTA04 e MELTA07 produzem todos os principais lipopeptídeos em estudo,

iturina, fengicina e surfactina. No isolado MELTA05 apenas não foi identificado a Fengicina.

Além destes lipopeptídeos, moléculas relacionadas ao metabolismo secundário de *Bacillus*, Macrolactina e Bacileno foram identificadas nos isolados MELTA04 e MELTA05, e o isolado MELTA02 apenas Macrolactina.

### 3.2 Ensaio em casa de vegetação

A análise de clorofila agrupou os tratamentos em dois grupos pelo teste de Scott-knott (Tabela 3), os que tiveram um índice de clorofila semelhante ao controle e os que se assemelharam ao tratamento apenas inoculado com o patógeno. Os dados de Clorofila B não foram significativos.

Tabela 3. Índices de clorofila e Área sintomática em plantas de sorgo sob aplicação de *Bacillus* e extratos e em condições de Antracnose.

Tratamento	Clorofila total	Area sintomática (%)
0	46,62 a	0,43 b
1	36,67 b	0,44 b
2	37,89 b	5,88 a
3	40,50 a	2,44 b
4	42,77 a	0,27 b
5	45,55 a	0,51 b
6	42,83 a	9,57 a
7	41,69 a	2,45 b
8	39,54 b	2,16 b
9	42,79 a	2,32 b
10	35,20 b	5,60 a
11	32,75 b	0,66 b
12	38,11 b	9,04 a
CV (%)	15,62	196,30

Legenda: Tratamento 0: controle sem inoculação da doença; 1: controle Talco; 2: MELTA04; 3: MELTA02; 4: MELTA05; 5: MELTA07; 6: controle NaOH+Água; 7: extrato de MELTA04; 8: extrato de MELTA02; 9: extrato de MELTA05; 10: extrato de MELTA07; 11: controle biológico comercial Bombardeiro<sup>®</sup>; 12: controle químico comercial Alade<sup>®</sup>. Ca: Índice de clorofila A; Cttotal: Índice de clorofila total; CV: Coeficiente de variação; Valores da cultivar PR401; Médias seguidas por letras diferentes diferem pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

As avaliações de área foliar sintomática realizadas através da digitalização das folhas (Tabela 3) evidenciam a distinção dos tratamentos que se sobressaíram com

uma área sintomática menor, de acordo com o agrupamento pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

O conjunto dos resultados de Clorofila e Área sintomática serviram para o planejamento da próxima etapa. Assim, selecionamos duas bactérias e dois extratos para estudo de campo, MELTA05 e MELTA07, MELTA05 e MELTA04, respectivamente.

As avaliações de massa de parte aérea e radicular tanto frescas como secas em casa de vegetação não tiveram diferença significativa (Tabela 4).

Tabela 4. Aspectos agronômicos de plantas de sorgo inoculadas com formulações de *Bacillus* spp. para o controle biológico de *C. graminicola*.

Tratamento	Altura (cm)	MFPA (g)	MFR (g)	MSPA (g)	MSR (g)
0	29,99	21,74	18,70	5,33	4,47
1	36,56	26,36	10,65	6,71	5,74
2	41,27	28,54	9,04	7,87	5,68
3	34,07	25,45	8,97	6,66	5,68
4	34,10	24,50	8,75	6,10	5,98
5	31,95	25,59	12,67	6,26	5,57
6	34,25	22,89	11,67	5,67	5,02
7	29,33	19,14	12,00	4,51	5,31
8	34,92	26,80	10,46	6,56	6,05
9	38,62	27,42	11,70	6,55	5,23
10	33,95	28,59	13,93	7,07	6,83
11	35,82	29,09	10,37	7,68	5,75
12	30,40	22,72	10,75	4,97	4,28
CV (%)	26,62	32,64	66,60	35,62	50,98
Cultivar					
Pr401	39,01 (a)	25,35	10,57	6,77	5,46
Alvo	29,48 (b)	25,24	12,46	5,83	5,55

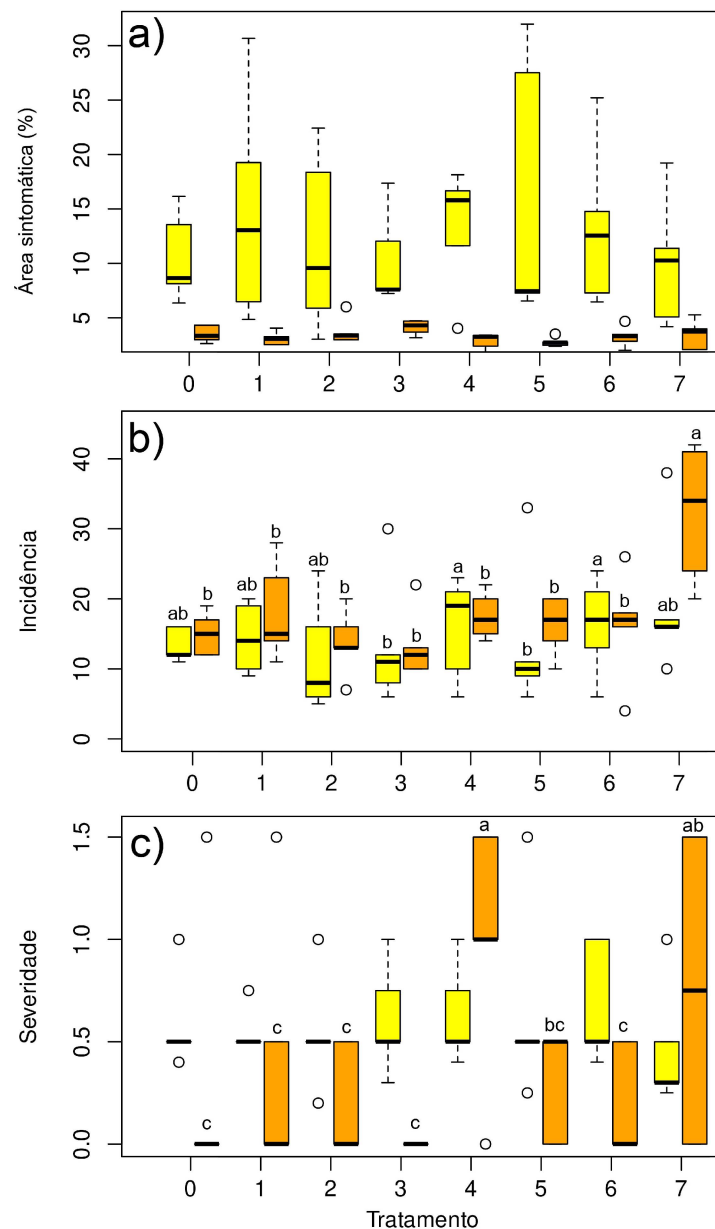
Descrição: MFPA: Massa fresca de parte aérea; MFR: Massa fresca de raiz; MSPA: Massa seca de parte aérea; MSR: Massa seca de raiz; CV (%): Coeficiente de variação; Tratamento 0: controle sem inoculação da doença; 1: controle Talco; 2: MELTA04; 3: MELTA02; 4: MELTA05; 5: MELTA07; 6: controle NaOH+Água; 7: extrato de MELTA04; 8: extrato de MELTA02; 9: extrato de MELTA05; 10: extrato de MELTA07; 11: controle biológico comercial Bombardeiro®; 12: controle químico comercial Alade®.

Durante a condução deste experimento notamos uma fitotoxidez nos tratamentos com extrato de lipopeptídeos, o que se acentuou no controle (Tratamento 6). Isto pode ter relação com a forma de diluição dos lipopeptídeos, que é feita em NaOH seguida por diluição em água destilada.

### 3.3 Ensaio de campo

Para a cultivar Alvo, conforme exposto na Figura 2b, a bactéria MELTA05 e o extrato da bactérias MELTA04 apresentaram incidência significativamente ( $p>0,01$ ) menor que o extrato da bactéria MELTA05 e o controle biológico com o produto comercial Bombardeiro no período avaliado. Nota-se também semelhança entre os controles químico e biológico, denotando que ambos não diferiram em permitir a incidência da doença no mesmo período de tempo.

Figura 3. Área sintomática, severidade e incidência média de Antracnose nas cultivares Alvo e NU420 a campo sob aplicações de bactérias isoladas do mel e seus extratos.



Legenda: Amarelo: Cultivar Alvo, Laranja: Cultivar NU420. Letras se referem ao teste de tukey ( $p < 0,01$ ) entre os tratamentos dentro da mesma cultivar, coeficiente de variação (CV) Incidência-Alvo: 27,64%, CV Incidência-NU420: 28,33%, CV Severidade-Alvo: 36,95%, CV Severidade-NU420: 80,71%, CV Área sintomática-Alvo: 54,56%, CV Área sintomática-NU420: 33,42%. Normalidade dos resíduos  $p = 0,951$  (Shapiro-Wilk), Homogeneidade de variância  $p = 0,232$ . Tratamento 0: controle absoluto; 1: controle Talco; 2: MELTA05; 3: MELTA07; 4: extrato de MELTA05; 5: extrato de MELTA04; 6: controle biológico comercial Bombardeiro®; 7: controle químico comercial Alade®.

Fonte: O autor

A avaliação de severidade (Figura 3c) indica que além de uma maior incidência o controle químico, referente ao tratamento 7, também teve uma maior severidade que os demais.

Comparando-se o comportamento das cultivares quanto a área foliar sintomática Figura 3a, a cultivar Alvo, como esperado, foi mais afetada pela antracnose (12,54%) em detrimento da cultivar NU420 (3,25%) considerando o teste de tukey a 1% (CV=66,4%) (Tabela 5).

Tabela 5. Comportamento médio das cultivares sob aplicação de formulações de *Bacillus* spp. para o controle biológico da Antracnose do sorgo.

Cultivar	Incidência (%)	Severidade (%)	Area foliar afetada (%)
Alvo	14,77 (b)	0,59 (a)	12,54 (a)
NU420	18,22 (a)	0,40 (b)	3,25 (b)
CV (%)	38,3	80,01	66,4
p-valor	0,028	0,036	0

Descrição: CV: Coeficiente de variação.

## 4 Discussão

### 4.1 Ensaio *In vitro*

Conforme exposto na Figura 2 o arranjo da árvore filogenética demonstra com alta similaridade que as bactérias em estudo pertencem ao gênero *Bacillus*. Estes arranjos corroboram com outros estudos que separam em diferentes clados *B. subtilis* e *B. cereus*, agrupando *B. Cereus*, *B. Albus* e *B. Anthracis* (Goto *et al.*, 2000; Wang & Sun, 2009; Gupta *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2023).

Desta forma é possível afirmar a identidade destes isolados quanto ao gênero e ainda dentro destes clados considerar as espécies mais semelhantes, conforme relatado na tabela 1, descartando as espécies que se arranjam nos clados diferentes.

Numa primeira triagem para aferir o potencial das bactérias isoladas, elas passaram pelo teste de dupla cultura contra o fungo *C. graminicola*. Quatro isolados

obtiveram uma inibição próxima de 70%, percentual de corte também adotado por outros estudos, por isso foram selecionados para os próximos testes (Ercole *et al.*, 2024; Prom *et al.*, 2017; Szilagyi-Zecchin *et al.*, 2014).

O método utilizado se mostrou mais eficaz e comparável do que os citados acima, uma vez que Prom *et al.* (2017) não mediram as colônias, apenas avaliaram qualitativamente a inibição e Ercole *et al.* (2024) estriaram as bactérias em apenas um lado da placa, tornando o processo mais moroso, até que o fungo ocupe a placa e impraticável em fungos com raio de crescimento menor ou mais lento.

Considerando o potencial de biocontrole e que estes organismos são do gênero *Bacillus* encontramos os metabólitos secundários Fengicina, Surfactina e Iturina nas amostras dos extratos, os quais já são de conhecimento da comunidade científica a capacidade de produção destas moléculas neste gênero (Ongena & Jacques, 2008).

As fengicinas, são moléculas oriundas do metabolismo secundário e possuem forte atividade fungitóxica, já as surfactinas não possuem atividade fungitóxica, mas em complementaridade, são antivirais, antimicoplasmas e antibacterianas por se ancorarem na camada lipídica interferindo em sua integridade. As iturinas possuem propriedades de permeabilização de membranas contra fungos, mas não exibem atividade contra vírus e limitada ação contra bactérias (Ongena & Jacques, 2008).

Estudos têm relatado efeito sinérgico quando mais de uma família de lipopeptídeos é produzida por uma bactéria, Koumoutsi *et al.* (2004) observou melhor controle de *Fusarium oxysporum* quando Bacilomicina D e Fengicina estiveram associadas, Thimon *et al.* (1992) and Romero *et al.* (2007) observaram efeito sinérgico entre Iturina-surfactina e Iturina-fengicina, respectivamente, também é possível observar um maior espectro de patógenos controlados quando as moléculas são associadas, Chen *et al.* (2018) e Dimikic *et al.* (2013) observaram controle de até dez patógenos com bactérias capazes de produzir surfactina, iturina e bacilomicina D.

Estas moléculas representam um potencial enorme de uso destes isolados, pois vários trabalhos como reportado por Sani *et al.* (2024) já observaram mecanismos de indução de resistência em diversas espécies e patógenos. Rodriguez *et al.* (2018) sugerem ainda que a resistência sistêmica induzida pela surfactina tenha uma performance melhor, com respostas mais robustas e menor custo metabólico.

Outro fator importante na detecção destes metabólitos é a permanência dessas moléculas no limbo foliar, Romero *et al.* (2007) observaram a ocorrência até 12 dias

após a aplicação das bactérias, o que propicia um efeito duradouro na inibição do desenvolvimento do patógeno.

As massas encontradas possuem um perfil parecido com os relatados na literatura para análises em organismos do gênero *Bacillus*. Sabendo da produção destes metabólitos, passou-se para a avaliação da eficiência em casa de vegetação, com ensaio em plantas de sorgo.

#### 4.2 Ensaio em casa de vegetação

Observou-se que alguns tratamentos evitaram a redução do teor de clorofila provocado pela incidência de antracnose (Dildey, 2014), o teor de clorofila influencia diretamente na produtividade e parâmetros produtivos das plantas (Lubian *et al.*, 2023), Kumar *et al.* (2021) já observaram aumento expressivo no conteúdo de clorofila em pimenta, por isso, este efeito durante a infecção de *Colletotrichum* sp. pode estar relacionado a aplicação de lipopeptídeos, que além de agir contra o patógeno também produz efeitos na promoção de crescimento vegetal.

Nesta etapa o melhor tratamento foi a formulação em talco da bactéria MELTA05 (Tratamento 4), que comparada com o controle (Tratamento 1) reduziu em aproximadamente 40% a área foliar sintomática (Tabela 3).

Considerando os tratamentos de extrato de lipopeptídeos, o extrato do isolado MELTA02 (Tratamento 8) reduziu em 77% a área foliar sintomática considerando o controle dos extratos (Tratamento 6). Esta redução pode estar relacionada com a indução de resistência sistêmica, principalmente relacionada às surfactinas e fengicinas, detectadas em todas as estirpes. A indução de resistência já foi observada em outras espécies e no patossistema de *Colletotrichum* sp. (Yamamoto *et al.*, 2015; Ongena *et al.*, 2007).

Por outro lado, o controle dos extratos esteve com uma área afetada elevada, provavelmente em função de uma fitotoxidez por ser baseada em hidróxido de sódio, mesmo com um pH aceitável (pH=8), não existe consenso entre a melhor forma de diluição para uso destes extratos, Wang *et al.* (2023) e Ding *et al.* (2017) utilizaram hidróxido de sódio a 2 M, outras opções são a utilização de tampão fosfato (Khochamit *et al.*, 2015), metanol (Ding *et al.*, 2017) e liofilização seguida de suspensão em água deionizada, que não é um processo acessível a qualquer laboratório (Chen *et al.*, 2019).

Os extratos se saíram piores na redução da doença, reforçando a necessidade de aperfeiçoamento na formulação, pois em casa de vegetação houveram sintomas de fitotoxidez nas plantas tratadas e a campo na primeira aplicação também notou-se alguns sintomas, Papadopoulou *et al.* (2022) também observaram efeitos tóxicos moderados em altas concentrações de lipopeptídeos em *Lemna minor* L.

Isto reforça a necessidade de pesquisar as melhores formas de uso, concentração dos lipopeptídeos e teste de novas formulações, pois as mudanças climáticas exigem que tenhamos alternativas aos microrganismos, uma vez que eles podem não se adaptar as condições ambientais na superfície da folha (Tut *et al.*, 2023; Zhou *et al.*, 2024), já os lipopeptídeos são substâncias estáveis e resistem a condições adversas (Ayed *et al.*, 2014).

Os efeitos em casa de vegetação mostram que as bactérias conseguiram se estabelecer na folha e agir contra o patógeno, fato importante pois são bactérias isoladas de outro ecossistema e que precisam mostrar adaptação para sua utilização como agentes de controle de doenças foliares.

### 4.3 Ensaio a campo

No presente estudo a campo, observou-se que, para a cultivar Alvo, tratamentos biológicos como o extrato de lipopeptídeos MELTA04 (T5) e a formulação de talco MELTA07 (T3) se destacaram (Figura 2b). Especificamente os tratamentos 2, 3 e 6 demonstraram as menores severidades da doença, equiparando-se ao controle (T1) (Figura 2c), mesmo que, para esta cultivar, não tenha havido diferença estatística geral entre os tratamentos quanto à severidade (Figura 2b).

Curiosamente, a cultivar NU420 apresentou maior incidência de antracnose justamente no tratamento químico (Tratamento 12), mas que se traduziu em uma área sintomática e severidades comparáveis aos outros tratamentos, de modo que este tratamento agiu no progresso da doença além da infecção. Ao longo das avaliações, o isolado MELTA05 consistentemente apresentou os melhores resultados na redução de severidade e incidência, seguido por MELTA07, reforçando o potencial de agentes biológicos específicos.

A literatura corrobora tanto o potencial quanto os desafios do manejo biológico. Estudos com *Trichoderma* spp. em sorgo, por exemplo, demonstraram reduções iniciais significativas na incidência (20%) e severidade (43%) da antracnose (Vasanthakumari; Shivanna, 2014), e controle similar com redução de 43% na

severidade em aplicações foliares repetidas (Rana *et al.*, 2020). Contudo, ambos os experimentos evidenciaram uma limitação comum: a proteção não se manteve ao longo de todo o ciclo da cultura e a eficiência foi inferior à do controle químico tradicional, indicando a necessidade de aplicações mais frequentes e prolongadas dos bioinsumos para conter o avanço da doença.

Entretanto, a otimização do manejo com bioinsumos pode superar essas limitações e até mesmo equiparar ou exceder a eficácia dos químicos. Pesquisas com *Bacillus* em diversas culturas são exemplos: Sawant *et al.* (2016) alcançaram até 62% de controle da antracnose, aproximando-se dos 74% do controle químico. Lamine Senghor *et al.* (2007) obtiveram uma redução de 51% na incidência da doença em manga com aplicações de *Bacillus* a cada 10 dias, comparável aos 58% do controle químico. Resultados ainda mais expressivos foram observados por Choub *et al.* (2021), que, utilizando *Bacillus* sp. em noqueiras, conseguiram uma redução de 85% na severidade da antracnose em relação à testemunha e, notavelmente, 25% superior ao controle químico. O denominador comum nestes casos de sucesso foi a aplicação dos bioinsumos durante todo o ciclo de produção avaliado, inclusive com repetições em diferentes safras.

Este panorama demonstra que, com um manejo estratégico e persistente, a diferença de eficácia entre o controle químico e o biológico pode ser drasticamente reduzida, tornando os bioinsumos alternativas viáveis e, em certos cenários, até superiores.

## 5 Conclusões

Os isolados MELTA04, MELTA05 e MELTA07 têm potencial para mitigar a incidência e severidade da antracnose e a perda de clorofila, pelo menos em cultivares mais suscetíveis.

Torna-se necessário aprimorar a formulação de lipopeptídeos para aplicação em plantas, para minimizar efeitos fitotóxicos.

## REFERÊNCIAS

- Adesina, OS, Whitfield S, Sallu SM, Sait SM, Pittchar J (2023) Bridging the gap in agricultural innovation research: a systematic review of push–pull biocontrol technology in sub-Saharan Africa. *International Journal of Agricultural Sustainability*. <https://doi.org/10.1080/14735903.2023.2232696>
- Ali, MEK, Warren, HL (1992) Anthracnose of sorghum. In: Milliano, WAJ, Frederiksen, RA, Bengston, GD (ed) *Sorghum and millets diseases: a second world review*, Patancheru, A.P. 502-324, Índia: International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics.
- Alvares, CA, Stape, JL, Sentelhas, PC, Gonçalves, JLM, Sparovek, G (2013) Köppen's climate classification map for Brazil. *Meteorologische Zeitschrift*. <http://dx.doi.org/10.1127/0941-2948/2013/0507>
- Ayed HB, Hmidet N, Béchet M, Chollet M, Chataigné G, Leclère V, Jacques P, Nasri, M (2014) Identification and biochemical characteristics of lipopeptides from *Bacillus mojavensis* A21. *Process Biochemistry*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2014.07.001>
- Bruce TJA, Smart LE, Birch ANE, Blok VC, MacKenzie K, Guerrieri E, Cascone P, Luna E, Ton J (2017) Prospects for plant defence activators and biocontrol in IPM – Concepts and lessons learnt so far. *Crop Protection*. <https://doi.org/10.1016/J.CROPRO.2016.10.003>
- Chen L, Heng J, Qin S, Bian K (2018) A comprehensive understanding of the biocontrol potential of *Bacillus velezensis* LM2303 against *Fusarium* head blight. *PLoS ONE* 13(6): e0198560. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198560>
- Chen MC, Wang JP, Zhu YJ, Liu B, Yang WJ, Ruan CQ (2019) Antibacterial activity against *Ralstonia solanacearum* of the lipopeptides secreted from the *Bacillus amyloliquefaciens* strain FJAT-2349. *J Appl Microbiol*. <https://doi.org/10.1111/jam.14213>
- Corrêa NB, Risse NO, Barreiros MAB, Albrecht LP, Albrecht AJP, Grange L (2025). Microbial activity of a soil cultivated with soybean under the application of pre-emergent herbicides. *Observatório De La Economía Latinoamericana*. <https://doi.org/10.55905/oelv23n1-156>
- Costa RV, Casela CR, Zambolim L, Ferreira AS (2003) A antracnose do sorgo. *Fitopatologia Brasileira*. <https://doi.org/10.1590/S0100-41582003000400001>
- Dilley ODF (2014) Interação trichoderma-feijoeiro e seus efeitos na fisiologia e indução de resistência contra antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*). Dissertação, Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Disponível em: <https://tede.unioeste.br/handle/tede/1245>. Acesso em: 13 Feb 2025.
- Dimkić I, Šivković S, Berić T, Ivanović Ž, Gavrilović V, Stanković S, Fira D (2013) Characterization and evaluation of two *Bacillus* strains, SS-12.6 and SS-13.1, as potential agents for the control of phytopathogenic bacteria and fungi. *Biological Control*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2013.03.012>
- Ding T, Su B, Chen X, Xie S, Gu S, Wang Q, Huang D and Jiang H (2017) An Endophytic Bacterial Strain Isolated from *Eucommia ulmoides* Inhibits Southern Corn Leaf Blight. *Front. Microbiol*. 8:903. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2017.00903>
- Duarte LT, Cortes MVCB, Filippi MCC, Silva-Lobo VL (2019) Protocolo de extração de DNA genômico para os principais fungos fitopatogênicos do arroz. *Embrapa Arroz e Feijão. Boletim de pesquisa e desenvolvimento*, 54. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1112790>. Acesso em: 06 mai. 2025.
- Ercole TG, Kava VM, Petters-Vandresen DAL, Gomes MEN, Aluizio R, Ribeiro RA, Hungria M, Galli LV (2024). Unlocking the growth-promoting and antagonistic power: A comprehensive whole genome study on *Bacillus velezensis* strains. *Gene*. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2024.148669>

FAO (2023) International year of millets. Disponível em: <https://www.fao.org/millets-2023/en>. Acesso em: 10 Fev 2025

FAO (2021) The FAO Pesticide Registration Toolkit elected as a SDG Good Practice! Disponível em: <https://www.fao.org/pesticide-registration-toolkit/news/news-detail/en/c/1417354/>. Acesso em: 21 Fev 2024

Ferreira E, Cavalcanti P, Nogueira D (2014) ExpDes: An R Package for ANOVA and Experimental Designs. Applied Mathematics. <https://doi.org/10.4236/am.2014.519280>

Gaigole AH, Wagh GN, Khadse AC (2011) Antifungal activity of Trichoderma species against soil borne pathogen. Asiatic Journal of Biotechnology Resources, 2:461-465

Goulet F, Aulagnier A, Fouilleux E (2023) Moving beyond pesticides: Exploring alternatives for a changing food system. Environmental Science & Policy. <https://doi.org/10.1016/j.envsci.2023.06.007>

Gupta RS, Patel S, Saini N, Chen S (2020) Robust demarcation of 17 distinct *Bacillus* species clades, proposed as novel Bacillaceae genera, by phylogenomics and comparative genomic analyses: description of *Robertmurraya kyonggiensis* sp. nov. and proposal for an emended genus *Bacillus* limiting it only to the members of the Subtilis and Cereus clades of species. International journal of systematic and evolutionary microbiology. <https://doi.org/10.1099/ijssem.0.004475>

Goto K, Omura T, Hara Y, Sadaie Y (2000) Application of the partial 16S rDNA sequence as an index for rapid identification of species in the genus *Bacillus*. The Journal of General and Applied Microbiology. <https://doi.org/10.2323/jgam.46.1>

Hall T (2021) BioEdit. Disponível em: <https://bioedit.software.informer.com/download/>. Acesso em: 02 may 2024

IBGE. Produção agrícola municipal. 1988-2023. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/Tabela/1612>. Acesso em: 05 fev 2025.

Jia Q, Fan Y, Duan S, Qin Q, Ding Y, Yang M, Wang Y, Liu F, Wang C (2023) Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* XJ-BV2007 on Growth of *Alternaria alternata* and Production of Tenuazonic Acid. Toxins. <https://doi.org/10.3390/toxins15010053>

Khochamit N, Siripornadulsil S, Sukon P, Siripornadulsil W (2015) Antibacterial activity and genotypic–phenotypic characteristics of bacteriocin-producing *Bacillus subtilis* KKU213: potential as a probiotic strain. Microbiological Research. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2014.09.004>

Kiraly Z, Klement A, Solimosy F, Voros J (1970) Methods in Plant Pathology. Akademiai Kiadó, Budapest

Koumoutsis A, Chen XH, Henne A, Liesegang, H, Hitzeroth G, Franke P, Vater J, Borriss R (2004) Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. J Bacteriol. 186(4):1084-1096. <https://doi.org/10.1128/JB.186.4.1084-1096.2004>

Kumar A, Rabha J, Jha DK (2021) Antagonistic activity of lipopeptide-biosurfactant producing *Bacillus subtilis* AKP, against *Colletotrichum capsici*, the causal organism of anthracnose disease of chilli. Biocatalysis And Agricultural Biotechnology. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102133>

Lamine Senghor A, Liang WJ, Ho WC (2007) Integrated control of *Colletotrichum gloeosporioides* on mango fruit in Taiwan by the combination of *Bacillus subtilis* and fruit bagging. Biocontrol Science and Technology. <https://doi.org/10.1080/09583150701527409>

Lubian C, Molin LMD, Dudek G, Risse NO, Luchese AV, Missio VC, Missio RF (2023) Índices de clorofila em genótipos de milho (*Zea mays*) com sintomas de enfezamento. Observatório de la economía latinoamericana. <https://doi.org/10.55905/oelv21n11-061>

Ma Z, Michailides TJ (2005) Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop Protection*. <https://doi.org/10.1016/J.CROPRO.2005.01.011>

Maget-Dana R, Thimon L, Peypoux F, Ptak M (1992) Surfactin/iturin A interactions may explain the synergistic effect of surfactin on the biological properties of iturin A. *Biochimie*. [https://doi.org/10.1016/0300-9084\(92\)90002-v](https://doi.org/10.1016/0300-9084(92)90002-v)

Mathur K, Thakur RP, Neya A, Marley PS, Casela CR (2002) Sorghum anthracnose-problem and Management Strategies. In: Leslie JF (ed) *Sorghum and millets diseases*. Iowa State Press, Ames, IA, pp 211-220. <https://doi.org/10.1002/9780470384923.ch36>

Martínez-Álvarez JC, Castro-Martínez C, Sánchez-Peña P, Gutiérrez-Dorado R, Maldonado-Mendoza IE (2016). Development of a powder formulation based on *Bacillus cereus* sensu lato strain B25 spores for biological control of *Fusarium verticillioides* in maize plants. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s11274-015-2000-5>.

Meng J, Zhang X, Han X, Fan B (2022) Application and Development of Biocontrol Agents in China. *Pathogens*. <https://doi.org/10.3390/pathogens11101120>

Minas K, McEwan NR, Newbold CJ, Scott KP (2011) Optimization of a high-throughput CTAB-based protocol for the extraction of qPCR-grade DNA from rumen fluid, plant and bacterial pure cultures. *FEMS Microbiology Letters*. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02424.x>

Olivoto T (2022) Lights, camera, pliman! An R package for plant image analysis. *Methods in Ecology and Evolution*. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.13803>

Ongena M, Jacques P (2008) *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.12.009>

Ongena M, Jourdan E, Adam A, Paquot M, Brans A, Joris B, Arpigny JL, Thonart P (2007) Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environ Microbiol*. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01202.x>

Papadopoulou E-A, Giaki K, Angelis A, Skaltsounis A-L, Aliferis KA. (2022) A Metabolomic Approach to Assess the Toxicity of the Olive Tree Endophyte *Bacillus* sp. PTA13 Lipopeptides to the Aquatic Macrophyte *Lemna minor* L. *Toxics*. <https://doi.org/10.3390/toxics10090494>

Paulitz TC, Zhou T, Rankin L (1992) Selection of Rhizosphere Bacteria for Biological Control of *Pythium Aphanidermatum* on Hydroponically Grown Cucumber. *Biological Control*. [https://doi.org/10.1016/1049-9644\(92\)90063-J](https://doi.org/10.1016/1049-9644(92)90063-J)

Pertot I, Caffi T, Rossi V, Mugnai L, Hoffmann C, Grando MS, Gary C, Lafond D, Duso C, Thierry D, Mazzoni V, Anfora G (2017) A critical review of plant protection tools for reducing pesticide use on grapevine and new perspectives for the implementation of IPM in viticulture. *Crop Protection*. <https://doi.org/10.1016/J.CROPRO.2016.11.025>

Pesce S *et al* (2023) Main conclusions and perspectives from the collective scientific assessment of the effects of plant protection products on biodiversity and ecosystem services along the land–sea continuum in France and French overseas territories. *Environmental Science and Pollution Research*. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-26952-z>

Price CL, Parker JE, Warrilow AG, Kelly DE, Kelly SL (2015), Azole fungicides - understanding resistance mechanisms in agricultural fungal pathogens. *Pest. Manag. Sci*. <https://doi.org/10.1002/ps.4029>

Prom L, Medrano E, Isakeit T, Jacobsen R, Droleskey R (2017) A Pictorial illustration of the inhibition of mycelial growth and spore germination of various sorghum fungal pathogens by a *Bacillus* species. *Res J Plant Pathol*. 1(1):002.

- Rana M, Singh Y, Srivastava S (2020). In vivo evaluation of fungicides and biocontrol agents against anthracnose of sorghum. *Plant Cell Biotechnology And Molecular Biology*, 21(59-60): 8-14. <https://ikprress.org/index.php/PCBMB/article/view/5618>
- Rodrigues Neto J, Malavolta Júnior VA, Victor O (1986) Meio simples para isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* tipo B. *Summa Phytopathologica*. 12:16
- Rodríguez J, Tonelli ML, Figueredo MS, Ibáñez F, Fabra A (2018) The lipopeptide surfactin triggers induced systemic resistance and priming state responses in *Arachis hypogaea* L.. *Eur J Plant Pathol*. <https://doi.org/10.1007/s10658-018-1524-6>
- Romero D, de Vicente A, Rakotoaly RH, Dufour SE, Veening JW, Arrebola E, Cazorla FM, Kuipers OP, Paquot M, Pérez-García A (2007) The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca*. *Mol Plant Microbe Interact*. <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-4-0430>
- Sani A, Qin W, Li J, Liu Y, Zhou L, Yang S, Mu B (2024) Structural diversity and applications of lipopeptide biosurfactants as biocontrol agents against phytopathogens: a review. *Microbiological Research*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2023.127518>
- Schmid R, Heuckeroth S, Korf A *et al* (2023) Integrative analysis of multimodal mass spectrometry data in MZmine 3. *Nat Biotechnol*. <https://doi.org/10.1038/s41587-023-01690-2>
- Szilagyi-Zecchin VJ, Ikeda AC, Hungria M, Adamoski D, Kava-Cordeiro V, Glienke C, Galli-Terasawa (2014) Identification and characterization of endophytic bacteria from corn (*Zea mays* L.) roots with biotechnological potential in agriculture. *AMB Expr*. <https://doi.org/10.1186/s13568-014-0026-y>
- Tamura K (1992) Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G + C-content biases. *Molecular Biology and Evolution*. 9:678-687.
- Tamura K, Stecher G, Kumar S (2021) MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>.
- Thimon L, Peypoux F, Maget-Dana R, Roux B, Michel G (1992) Interactions of bioactive lipopeptides, iturin A and surfactin from *Bacillus subtilis*. *Biotechnol Appl Biochem*. 16(2):144-151. <https://doi.org/10.1111/j.1470-8744.1992.tb00218.x>
- Thomas MD, Sissoko I, Sacko M (1995) Development of Leaf Anthracnose and its Effect on Yield and Grain Weight of Sorghum in West Africa. *Plant Dis*. 80:151-153. <https://doi.org/10.1094/PD-80-0151>
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>
- Trojan DG, Pria MD (2018) Validação de escala diagramática para quantificação da severidade da antracnose da folha do milho. *Summa Phytopathologica*. <http://dx.doi.org/10.1590/0100-5405/172675>
- Tuite J (1969) *Plant Pathological methods*. Minneapolis: Burgess Pub. Company. 239 p.
- Tut G, Magan N, Xu X (2023) Influence of abiotic factors on kinetics of viable populations of biocontrol agents in the phyllosphere of lettuce and strawberry leaves. *Plant Pathology*. <https://doi.org/10.1111/ppa.13719>
- Valério HM, Rêsende MA, Weikert-Oliveira RC, Casela CR (2005) Virulence and molecular diversity in *Colletotrichum graminicola* from Brazil. *Mycopathologia*. <https://doi.org/10.1007/s11046-005-0373-y>

Vasanthakumari MM, Shivanna MB (2014) Biological control of sorghum anthracnose with rhizosphere and rhizoplane fungal isolates from perennial grasses of the Western Ghats of India. *Eur J Plant Pathol.* <https://doi.org/10.1007/s10658-014-0425-6>

Wang K, Shu C, Bravo A, Soberón M, Zhang H, Crickmore N, Zhang J (2023) Development of an Online Genome Sequence Comparison Resource for *Bacillus cereus* sensu lato Strains Using the Efficient Composition Vector Method. *Toxins.* <https://doi.org/10.3390/toxins15060393>

Wang W, Sun M (2009) Phylogenetic relationships between *Bacillus* species and related genera inferred from 16s rDNA sequences. *Brazilian Journal of Microbiology.* <https://doi.org/10.1590/S1517-83822009000300013>

Weissburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ (1991) 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. *Journal of Bacteriology.* 173(2):697-703

Yamamoto S, Shiraishi S, Suzuki S (2015). Are cyclic lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* S13-3 responsible for the plant defence response in strawberry against *Colletotrichum gloeosporioides*?. *Letters in Applied Microbiology.* <https://doi.org/10.1111/lam.12382>

Zhou J, Zhang X, Qu Z, Zhang C, Wang F, Gao T, Yao Y, Liang J (2024) Progress in Research on Prevention and Control of Crop Fungal Diseases in the Context of Climate Change. *Agriculture.* <https://doi.org/10.3390/agriculture14071108>