

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**AVALIAÇÃO DE ANTIBIOSE DA BACTÉRIA *Bacillus*  
JAB01 SOBRE *Sclerotinia sclerotiorum* SOB  
ENSAIO COM SOJA (*Glycine max.* L) EM CASA DE  
VEGETAÇÃO**

**MAX HERVOT DE MATTOS VAZ**

Orientador(a): Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos

Co-orientador(a): Doutoranda Paula Klotz Brandão Rodrigues

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**AVALIAÇÃO DE ANTIBIOSE DA BACTÉRIA *Bacillus*  
JAB01 SOBRE *Sclerotinia sclerotiorum* SOB  
ENSAIO COM SOJA (*Glycine max.* L) EM CASA DE  
VEGETAÇÃO**

**MAX HERVOT DE MATTOS VAZ**

Orientador(a): Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos  
Co-orientador(a): Doutoranda Paula Klotz Brandão Rodrigues

**Trabalho apresentado à Faculdade de Ciências  
Agrárias e Veterinárias - UNESP, Câmpus de  
Jaboticabal, para graduação em ENGENHARIA  
AGRONÔMICA.**

## FICHA CATALOGRÁFICA

V393a

Vaz, Max Hervot de Mattos

Avaliação de antibiose da bactéria *Bacillus JAB01* sobre *Sclerotinia sclerotiorum* sob ensaio com soja (*Glycine max. L.*) em casa de vegetação / Max Hervot de Mattos Vaz. -- Jaboticabal, 2023

56 p. : il., tabs., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Engenharia Agrônômica) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientadora: Eliana Gertrudes de Macedo Lemos

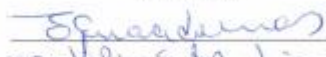
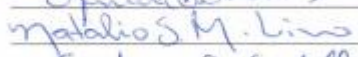
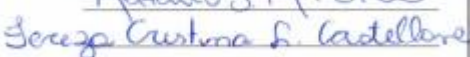
Coorientadora: Paula Klotz Brandão Rodrigues

1. Controle Biológico. 2. Biotecnologia microbiana. 3. *Bacillus* (Bacteria). 4. Mofo (Botânica) Controle. 5. Soja. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

## CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

|                                                                                                               |                                                                                                                                                                  |                                                                                      |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
|                              | <b>UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA</b><br>CÂMPUS DE JABOTICABAL                                                                                                   |   |
| <b>DEPARTAMENTO:</b> Departamento de Biotecnologia Agropecuária e Ambiental                                   |                                                                                                                                                                  |                                                                                      |
| <b>CERTIFICADO DE APROVAÇÃO</b><br>TRABALHO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA                                           |                                                                                                                                                                  |                                                                                      |
| <b>TÍTULO:</b>                                                                                                | AVALIAÇÃO DE ANTIBIOSE DA BACTÉRIA <i>Bacillus</i> JAB01 SOBRE <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> SOB ENSAIO COM SOJA ( <i>Glycine max.</i> L) EM CASA DE VEGETAÇÃO |                                                                                      |
| <b>ACADÊMICO:</b>                                                                                             | Max Hervot de Mattos Vaz                                                                                                                                         |                                                                                      |
| <b>CURSO:</b>                                                                                                 | Engenharia Agrônômica                                                                                                                                            |                                                                                      |
| <b>ORIENTADOR (ES):</b>                                                                                       | Prof. Dr <sup>a</sup> . Eliana Gertrudes de Macedo Lemos<br>Doutoranda Paula Klotz Brandão Rodrigues                                                             |                                                                                      |
| Aprovado e corrigido de acordo com as sugestões da Banca Examinadora                                          |                                                                                                                                                                  |                                                                                      |
| <b>BANCA EXAMINADORA:</b>                                                                                     |                                                                                                                                                                  |                                                                                      |
|                                                                                                               | (Nomes)                                                                                                                                                          | (Assinaturas)                                                                        |
| <b>Presidente</b>                                                                                             | Eliana Gertrudes de Macedo Lemos                                                                                                                                 |  |
| <b>Membro</b>                                                                                                 | Natália Sarmanho Monteiro Lima                                                                                                                                   |  |
| <b>Membro</b>                                                                                                 | Tereza Cristina Luque Castellane                                                                                                                                 |  |
| Jaboticabal 03 / 07 / 2023                                                                                    |                                                                                                                                                                  |                                                                                      |
| Aprovado em reunião do Conselho do Departamento em: 12/07/2023                                                |                                                                                                                                                                  |                                                                                      |
| <br>Chefe do Departamento |                                                                                                                                                                  |                                                                                      |

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer a todos da Unesp/FCAV, à minha orientadora Dr<sup>a</sup>. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos por ser paciente e me auxiliar sempre que precisei, assim como todos os integrantes do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas, em especial minha coorientadora Doutoranda Paula Klotz Brandão Rodrigues e também o Doutorando Luis Angel Chicoma Rojas que me auxiliaram em diversos ensaios e construção de conhecimento. Sou grato à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo por me conceder uma bolsa de iniciação científica (Fapesp - 2022/01847-6) e colaborar para meu crescimento acadêmico. Agradeço aos membros da minha banca, que estiveram comigo durante minha jornada acadêmica. Quero agradecer meus demais professores, ao professor Dr. Pedro Luis da Costa Aguiar Alves por me disponibilizar a casa de vegetação e recursos para poder realizar o ensaio, meus colegas e amigos que fiz na faculdade, e principalmente minha família (pai, mãe e irmão) e minha querida companheira Rafaella, que mesmo distantes sempre estiveram comigo me dando forças. Obrigada a todos!

## OFERECIMENTOS

Dedico essa minha conquista ao meu querido primo Alexandre que me inspirou a entrar na universidade e completar essa fase de minha vida.

## ÍNDICE

|                                                                                                                                    |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. INTRODUÇÃO .....                                                                                                                | 1  |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA .....                                                                                                     | 4  |
| 2.1. A cultura da soja no Brasil .....                                                                                             | 4  |
| 2.2. Mofo-branco .....                                                                                                             | 5  |
| 2.3. Controle biológico de insetos pragas e de fitopatógenos .....                                                                 | 9  |
| 2.4. Bactérias do gênero <i>Bacillus</i> com potencial de biocontrole .....                                                        | 11 |
| 3. OBJETIVO .....                                                                                                                  | 14 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS .....                                                                                                       | 15 |
| 4.1. Isolado e condições de cultivo .....                                                                                          | 15 |
| 4.2. Teste <i>in vitro</i> de compatibilidade com <i>Bradyrhizobium</i> .....                                                      | 16 |
| 4.3. Avaliação de atividade enzimática do isolado .....                                                                            | 16 |
| 4.4. Avaliação <i>in vitro</i> de atividade antagonista do <i>Bacillus</i> JAB01 contra <i>S. sclerotiorum</i> .....               | 17 |
| 4.4.1. Ensaio de bacterização de sementes de soja .....                                                                            | 17 |
| 4.4.2. Bioensaio de atividade antagonista por substâncias difusíveis .....                                                         | 17 |
| 4.4.3. Germinação e viabilidade de escleródio e produção de ácido oxálico .....                                                    | 18 |
| 4.4.4. Efeitos de COVs na germinação de escleródios .....                                                                          | 19 |
| 4.4.5. Ensaio com substâncias difusíveis e COVs em folhas destacadas .....                                                         | 19 |
| 4.5. Avaliação de biocontrole do <i>Bacillus</i> JAB01 contra <i>S. sclerotiorum</i> em plantas de soja em casa de vegetação ..... | 21 |
| 4.5.1. Avaliação de germinação de sementes .....                                                                                   | 21 |
| 4.5.2. Avaliação de atividade antagonista do <i>Bacillus</i> JAB01 contra <i>S. sclerotiorum</i> em plantas de soja .....          | 21 |
| 4.6. Forma de análise dos resultados .....                                                                                         | 23 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....                                                                                                    | 24 |
| 6. CONCLUSÕES .....                                                                                                                | 41 |
| 7. LITERATURA CITADA .....                                                                                                         | 42 |

## RESUMO

A soja é uma das principais culturas do agronegócio brasileiro e mundial. Um dos principais obstáculos no agronegócio é a presença e o ataque de pragas e doenças. O mofo-branco é uma doença causada pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum* que pode reduzir drasticamente a produção de soja no Brasil, além de diversas outras culturas que o patógeno atinge. O controle por meio de cultivares resistentes é pouco observado pelo fato da dificuldade de prospecção de genótipos menos suscetíveis. O controle mais comum desta doença é o químico, entretanto, este causa desequilíbrio no ecossistema e expõe a perigo a saúde de organismos não-alvo e seres humanos. Por causa disso, alternativas eficientes e de menor impacto sobre o meio ambiente se mostram necessárias. Diante do exposto, este trabalho de iniciação científica teve como finalidade avaliar o antagonismo do *Bacillus* JAB01 contra *S. sclerotiorum* em condições *in vitro* através de ensaios de compatibilidade com outros microrganismos, de cultura dupla com fitopatógenos, de atividade enzimática do isolado; e, *in vivo* em plantas de soja cultivadas em casa de vegetação inoculadas com ambos os microrganismos. O *Bacillus* JAB01 produziu substâncias difusíveis e COVs capazes de proteger sementes e folhas destacadas de soja *in vitro*. Os metabólitos secundários do isolado também foram capazes de inibir a germinação de escleródios em condições *in vitro*, demonstrando ser uma ferramenta promissora para reduzir a quantidade das estruturas de resistência em áreas contaminadas. Por fim, o *Bacillus* JAB01 reduziu significativamente a incidência da doença em plantas de soja em condições de casa de vegetação. Os resultados obtidos indicam que o *Bacillus* JAB01 tem potencial como agente de biocontrole do mofo branco *in vitro* e *in vivo*.

**Palavras-chave:** mofo branco; biocontrole; microrganismo antagonista



## SUMMARY

Soybean is one of the main crops of Brazilian and world agribusiness. One of the main obstacles in agribusiness is the presence and attack of pests and diseases. White mold is a disease caused by the fungus *Sclerotinia sclerotiorum* that can drastically reduce soybean production in Brazil, in addition to several other crops that the pathogen affects. The control through resistant cultivars is little observed due to the difficulty of prospecting less susceptible genotypes. The most common control of this disease is chemical, however, this causes imbalance in the ecosystem and exposes the health of non-target organisms and humans to danger. Because of this, efficient alternatives with less impact on the environment are necessary. In view of the above, this scientific initiation work aimed to evaluate the antagonism of *Bacillus* JAB01 against *S. sclerotiorum* under *in vitro* conditions through compatibility assays with other microorganisms, dual culture with phytopathogens, enzymatic activity of the isolate; and, *in vivo* in soybean plants grown in greenhouse inoculated with both microorganisms. *Bacillus* JAB01 produced diffusible substances and VOCs capable of protecting seeds and detached leaves of soybean *in vitro*. The secondary metabolites of the isolate were also able to inhibit the germination of sclerotia under *in vitro* conditions, demonstrating to be a promising tool to reduce the amount of resistance structures in contaminated areas. Finally, *Bacillus* JAB01 significantly reduced the disease incidence in soybean plants under greenhouse conditions. The results obtained indicate that *Bacillus* JAB01 has potential as a biocontrol agent of white mold *in vitro* and *in vivo*.

**Keywords:** white mold; biocontrol; antagonist microorganism

## 1. INTRODUÇÃO

Atualmente, a soja [*Glycine max* (L.) Merr.] constitui uma das culturas mais importantes da economia mundial. O grão pode ser comercializado bruto ou servir para inúmeros subprodutos resultantes de seu beneficiamento, como, por exemplo, o óleo, o leite, farelo para ração, entre outros. A soja se destacou como a principal cultura em crescimento durante as últimas décadas, graças aos avanços tecnológicos cuja finalidade é permitir o aumento da produtividade (Schmoller, 2021).

O Brasil é citado atualmente como o maior produtor mundial de soja seguido logo pelo Estados Unidos da América. O grão cultivado em todas as regiões do país, em que o estado de Mato Grosso corresponde à maior produção no país, totalizando uma área de 12,086 milhões de hectares com a produção equivalente a 45,6 milhões de tonelada (Conab, 2023)

Para que sejam atingidos níveis de produtividade maiores, são necessárias metodologias de controle de fitopatógenos, sendo a de método químico a mais utilizada (Perez, 2023). Entretanto, o uso abusivo de defensivos agrícolas vem sendo questionado, uma vez que ocorre a contaminação do meio ambiente e também dos subprodutos (Spanhol, 2017).

Constituindo-se um fungo fitopatogênico e necrotrófico, o mofo-branco se manifesta em qualquer parte da planta, com abundante formação de micélio cottonoso de coloração branca, característica que dá origem ao nome comum. O agente causal é a *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, o qual infecta mais de

600 espécies de plantas em todo o mundo, com ênfase para culturas de importância econômica como algodão, tomate, girassol, feijão e soja (Liang e Rollins, 2018). Representa uma das principais doenças da soja com alta capacidade destrutiva da cultura (Meyer *et al.*, 2021).

Conforme os autores Bolton *et al* (2006), a disseminação da doença ocorre, principalmente, por meio de sementes infectadas com o micélio do fungo ou contaminadas por escleródios. Os escleródios são estruturas de sobrevivência e disseminação resistentes à degradação física, química e biológica (Bolton *et al.*, 2006; Schmoller, 2021; Villarreal-Delgado *et al.*, 2021; França *et al.*, 2021). A produção de escleródios é constante e pode persistir no solo por longos períodos, podendo chegar até a 11 anos, dificultando a erradicação do patógeno (Brustolin, Reis, Pedron, 2016).

Dessa forma, há uma preocupação notória em relação ao controle desse fitopatógeno, sendo discutidos métodos alternativos ao controle químico devido às consequências negativas geradas por esse tipo de manejo. A utilização de microrganismos e/ou seus metabólitos isolados constitui uma alternativa ambientalmente sustentável e economicamente viável para o manejo de pragas e doenças.

Entre os microrganismos utilizados no controle biológico, as bactérias têm grande importância, visto a alta capacidade de antibiose por meio da produção de compostos antimicrobianos que são, dessa forma, explorados na prospecção de metabólitos bioativos (Li *et al.*, 2012; Sabaté *et al.*, 2018). Diversas pesquisas apontaram a atividade antagônica de bactérias que inibem o crescimento micelial

e a germinação de esporos e de fungos causadores de doenças em plantas (Sabaté *et al.*, 2018; Salwan e Sharma, 2020).

Além da capacidade de possuir ação antagonista contra fitopatógenos, algumas espécies do gênero são reconhecidas por aumentar o rendimento das culturas e a resposta imune da planta por meio do sistema de resistência induzida (SRI) (Schmoller, 2021). Segundo Dibelle (2023), os mecanismos de resistência sistêmica induzida constituem a produção tanto de metabólitos secundários, que promovem a inibição e/ou a redução do desenvolvimento de fungos fitopatogênicos, quanto de enzimas que degradam a parede celular (EDPC - Enzimas Degradadoras de Parede Celular), como quitinases, proteases, glucanases que podem estar associadas à defesa da planta.

Além disso, são também produzidos compostos orgânicos voláteis (COVs), as quais são moléculas gasosas com capacidade de interação com a planta no solo, tendo como consequência a promoção do crescimento do vegetal, direta ou indiretamente (Dibelle, 2023; Li *et al.*, 2015).

Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo a avaliação do potencial do *Bacillus* JAB01 como agente de biocontrole do mofo-branco, em condições *in vitro* e *in vivo* em casa de vegetação com plantas de soja.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. A cultura da soja no Brasil

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] surgiu originalmente no continente asiático, especificamente na região da China, onde são relatados o uso da planta como componente da alimentação do povo nativo há mais de 5.000 anos (Hüller, 2017). No Brasil, a leguminosa foi introduzida no estado do Rio Grande do Sul em 1914, no município de Santa Rosa.

Atualmente, a cultura é produzida em todas as regiões do país, graças ao melhoramento genético da planta que possibilitou a introdução de cultivares adaptadas às condições climáticas das diferentes regiões (Rodrigues, 2023). O Brasil é citado hoje como o maior produtor e exportador mundial de soja. E o estado de Mato Grosso apresenta a maior produção no país, totalizando 45,6 milhões de toneladas do grão produzidos em uma área de 12,086 milhões de hectares (Conab, 2023)

Conforme relatado pela Conab, no Brasil a produção de grãos na safra de 2022/23 foi estimada 15,8% maior comparado a safra anterior. Em primeiro lugar, dentre os grãos com crescimento da produção, a soja se destacou apresentando um volume de cerca de 155,7 milhões de toneladas, volume superior a produção do ciclo anterior em até 24% (Conab, 2023). Ainda conforme os autores, a área cultivada de soja conta com mais 2,5 milhões de hectares, 6,1% maior do que na safra de 2021/22.

A vantagem que a soja apresenta no mercado é a sua ampla diversidade de subprodutos provenientes do processamento dos grãos. Entre esses subprodutos, destacam-se o óleo, farelo, biodiesel, alimentação animal e até mesmo para consumo humano (Schmoller, 2021). Dessa forma, a soja representa o principal produto agrícola comercializado globalmente (Rodrigues, 2023). A soja é o principal produto de exportação nacional, representando 38% das exportações do agronegócio (CEPEA, 2023).

Conforme o CEPEA relatou, em 2022 o PIB da cadeia produtiva da soja e do biodiesel foi de R\$ 673,7 bilhões, o que constitui em torno de 27% de todo o PIB do agronegócio brasileiro. De acordo com o relatório publicado pelo centro de pesquisa, a participação da soja no PIB do agronegócio nacional em 2010 era de 9%, 18% a menos do que a percentagem demonstrada atualmente.

## **2.2. Mofo-branco**

O mofo-branco é um patógeno que infecta mais de 600 espécies de plantas em todo o mundo (Bolton *et al.*, 2006; Hüller, 2017; Brustolin, Reis, Pedron, 2016). O agente causal da doença é a *Sclerotinia sclerotiorum*, um fungo fitopatogênico e necrotrófico que se manifesta em qualquer parte da planta com abundante formação de micélio cottonoso de coloração branca, característica que dá origem ao nome comum (Schomoller, 2021; Ferreira, 2023). São atribuídas diversas denominações para as doenças causadas pelo patógeno, entre elas, podridão aquosa, podridão branca da haste, podridão de esclerotinia (Ferreira, 2023; Rissato, 2017).

Meyer *et al.* (2018) destacam que o mofo-branco tem maior ocorrência e severidade em períodos chuvosos com temperaturas amenas (18 a 22 °C), quando o solo permanece úmido e com uma alta umidade relativa do ar (>75%); pois esses fatores favorecem a infecção do patógeno na cultura hospedeira (Ferreira, 2023; Hüller, 2017; Juliatti *et al.*, 2016).

De acordo com Bolton *et al.* (2006), a disseminação da doença ocorre, principalmente, por meio de lotes de sementes infectadas pelo micélio do fungo ou contaminadas por escleródios. Os escleródios são estruturas de sobrevivência e disseminação e são resistentes à degradação física, química e biológica (Bolton *et al.*, 2006; Schmoller, 2021; Villarreal-Delgado *et al.*, 2021; França *et al.*, 2021). A produção de escleródios é constante e eles podem se manter no solo por longos períodos que atingem até 11 anos, característica que dificulta a erradicação do patógeno (Brustolin, Reis, Pedron, 2016).

O fato de haver sombreamento e presença de matéria orgânica no campo proporciona uma temperatura mais amena nos primeiros centímetros de solo, o que permite que os escleródios permaneçam viáveis nesse ambiente (Bolton *et al.*, 2006). Dessa forma, ao atingir condições favoráveis, a estrutura de resistência pode germinar e produzir micélio, fenômeno denominado germinação miceliogênica (Hüller, 2017).

Além disso, os escleródios podem germinar carpogenicamente e, assim, surgirem estruturas denominadas apotécios que produzem ascósporos, os quais são liberados e atingem as partes aéreas das plantas (Hüller, 2017; Brustolin, Reis, Pedron, 2016). No momento em que os ascósporos atingem o tecido

vegetal, pode ser observada a formação de micélio (Sagata *et al.*, 2010), constituindo-se outra via de infecção pelo patógeno, normalmente em partes senescentes e suscetíveis da planta no período de florescimento (Juliatti *et al.*, 2016).

A doença é caracterizada pelo surgimento de uma densa massa branca sobre a superfície e por dentro das partes da planta, constituído por micélio do fungo (Ferreira, 2023). Em seguida, podem ocorrer, na área afetada, sintomas como murcha, podridão úmida, tombamento e murcha de plântula, e em certos casos, até levar à morte de plantas adultas (Rissato, 2017).

Para o desenvolvimento e formação de escleródios de *S. sclerotiorum* é necessário que esse esteja em um meio ácido. Assim, o fungo acidifica o microambiente ao redor a um nível apropriado por meio da secreção do ácido oxálico (Xu *et al.*, 2015). De acordo com Cunha (2010), um ambiente ácido favorece o funcionamento de enzimas produzidas pelo fungo que degradam a parede celular (EDPCs), para facilitar a penetração e infecção do patógeno no hospedeiro. À medida que a concentração de ácido oxálico aumenta e o pH extracelular diminui, cria-se um ambiente propício para a atividade ideal dessas enzimas (Farzand *et al.*, 2020).

De acordo com a literatura, a produção de enzimas líticas e a de ácido oxálico representam fatores de patogenicidade do patógeno (Juliatti *et al.*, 2016; Sagata *et al.*, 2010; Hüller, 2017; Liang e Rollins, 2018; Ferreira, 2023). Enzimas como pectinases, celulasas, betaglucanases, xilanases e glicosidades são responsáveis pela degradação da parede celular do hospedeiro, a fim de facilitar



a penetração do fungo (Bolton *et al.*, 2006). Ademais, a secreção de ácido oxálico por parte do fungo reduz o pH do tecido vegetal, desregulando o funcionamento de abertura dos estômatos e proporcionando um ambiente mais favorável para o funcionamento das enzimas líticas (Juliatti *et al.*, 2016; Hüller, 2017)

Visto que o mofo-branco é um fungo necrotrófico e que apresenta a produção de estruturas de resistência com alta taxa de sobrevivência e diversas formas de infecção, esse é considerado uma das maiores preocupações para o setor de produção de culturas hospedeiras (Juliatti *et al.*, 2016). Dentre as culturas afetadas pela doença, destacam-se as de maior importância econômica como soja, feijão, tomate, algodão e girassol (Ferreira, 2023).

O mofo-branco é uma das principais doenças da soja e possui capacidade de reduzir a produtividade da lavoura de 20 a 30% (Meyer *et al.*, 2021). As perdas podem chegar a até 70% em situações de manejos mal realizados e condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento do patógeno. Ainda de acordo com os autores, a doença está presente em aproximadamente 28% da área de produção nacional de soja.

Atualmente, uma das principais medidas de controle do patógeno é o uso de fungicidas foliares, a fim de promover a proteção das plantas da infecção pelo fungo (Meyer *et al.*, 2018). Além disso, métodos de controle cultural com espécies não hospedeiras e de controle biológico com microrganismos antagonistas são ferramentas com potencial de uso.

### **2.3. Controle biológico de insetos pragas e de fitopatógenos**

Um dos principais fatores de produção da cultura da soja é o controle de pragas e doenças que provocam danos à cultura e, conseqüentemente, prejuízos que comprometem a produtividade e aumentam os custos. Dessa forma, torna-se imprescindível o uso de estratégias eficientes de manejo de pragas e patógenos.

A utilização do controle químico é uma das principais ferramentas amplamente exploradas, uma vez que esse controle possui uma resposta rápida e eficiente. Todavia, o uso indiscriminado de agrotóxicos provoca desequilíbrio no ecossistema e gera uma pressão de seleção na população de pragas, com a possibilidade de surgir indivíduos resistentes (Ferreira, 2023). Ademais, tal uso reduz a população de inimigos naturais da área (Schunemman *et al.*, 2017), há um aumento na quantidade de pragas e por consequência no custo de produção. O monitoramento por meio da amostragem sistemática de patógenos, bem como a escolha de ferramentas de controle de menor impacto, são cruciais para a obtenção de melhores resultados. A informação mais precisa e real da situação para a tomada de decisão é fundamental para a escolha e aplicação dos produtos recomendados (Parra *et al.*, 2002).

O monitoramento sistemático constitui uma das bases do manejo integrado de pragas (MIP) e representa uma ferramenta de extrema importância para o controle das pragas da cultura. Segundo a Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), o MIP:

“significa a consideração cuidadosa de todas as técnicas de controle de pragas disponíveis e subsequente integração de medidas apropriadas que reduzam o desenvolvimento de populações de pragas mantendo os custos com

inseticidas e outras intervenções em níveis que são economicamente justificados. O uso racional também reduz e minimiza os riscos para a saúde humana e para o meio ambiente. O MIP enfatiza o crescimento de uma cultura saudável com o mínimo possível de impacto nos agroecossistemas e possibilita a ação dos mecanismos naturais de controle de pragas.”

Ehler (2006) compreende que o termo “integrado” do MIP sugere que se deva adotar como critério de tomada de decisão a razão entre os inimigos naturais e seus respectivos alvos e que se utilize práticas compatíveis e não prejudiciais aos agentes de controle biológico. Fica evidente, nesse momento, que o uso de inseticidas deve seguir tais premissas a fim de preservar a população de inimigos naturais, de reduzir os custos com aplicações mais racionais e eficientes, e de diminuir a possibilidade do desenvolvimento de populações de pragas resistentes aos ingredientes ativos.

Com a ascensão progressiva da agricultura sustentável e sua exigência por práticas de baixo impacto no meio ambiente, o controle biológico constitui um dos principais componentes para contribuir com tais avanços (Stenberg *et al.*, 2021). O controle biológico de pragas e fitopatógenos é realizado por meio da ação de predadores e parasitóides, e da ação de microrganismos entomopatogênicos e antimicrobianos representados por bactérias, vírus e fungos. (Degrande-Vivan 2012).

De acordo com Schunemman *et al.* (2017) e Fuentes (2021), o uso de microrganismos para o controle de pragas e patógenos representa uma alternativa em evidência, haja visto que este se apresenta como uma ferramenta de alta especificidade sobre os ecossistemas, além de permitir uma redução no uso de produtos químicos. Ademais, tal uso possibilita realizar uma multiplicação, dispersão e produção em meios artificiais, reduz a exposição ao

risco de toxicidade para o meio ambiente e para o ser humano, graças à seletividade do controle microbiano (Farzand *et al.*, 2020).

#### **2.4. Bactérias do gênero *Bacillus* com potencial de biocontrole**

Frente à necessidade de busca por novas alternativas para o controle de doenças de plantas, o uso de bactérias e seus metabólitos é uma ferramenta de manejo sustentável com resultados já mencionados na literatura.

As bactérias do gênero *Bacillus* são microrganismos formadores de esporos, naturais do solo, encontrados amplamente ao redor do mundo. A capacidade de gerar endósporos representa uma ferramenta de resistência e permite a sobrevivência e perpetuação das espécies em diferentes ambientes e situações de estresse (Villarreal-Delgado *et al.*, 2017).

Classificadas como bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP), essas estão associadas às plantas e conferem a elas proteção contra fitopatógenos, como também fornecem atributos de promoção de crescimento. São exemplos desse gênero *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. licheniformis* (Dibelle, 2023). Observa-se, assim, que o gênero *Bacillus* tem devido destaque no manejo de fitopatógenos por mecanismos de controle direto ou indireto.

As características benéficas proporcionadas às plantas por estas bactérias incluem a atividade antagonista contra diferentes fitopatógenos, o estímulo da resistência sistêmica induzida, o aumento da produtividade, a solubilização de minerais, entre outras (Salwan e Sharma, 2020). Tais

características se dão através da produção de diferentes metabólitos como antibióticos, lipopeptídeos antimicrobianos, fitohormônios, sideróforos, assim como de enzimas líticas responsáveis pela degradação da parede celular de diversos fungos fitopatogênicos (Sabaté *et al.*, 2018; Santos, 2021; Abreu *et al.*, 2022); ademais, são produzidos compostos orgânicos voláteis (COVs) capazes de promover uma interação benéfica com a planta (Dibelle, 2023).

De acordo com Villarreal-Delgado *et al.* (2021), o fundamento para a pesquisa e para a utilização de diferentes espécies de bactérias do gênero *Bacillus* como agentes de controle biológico está associado à capacidade de produção dos diferentes metabólitos, mencionados anteriormente.

Metabólitos secundários são compostos de baixa massa molecular que não são essenciais para o desenvolvimento do microrganismo, mas que em situações de estresse são secretados a fim de superar o desafio (Harwood *et al.*, 2018). Essas moléculas bioativas e complexas são produzidas na fase log e estacionária de crescimento (Pereira, 2023).

Consoante os autores Chaurasia *et al.* (2004), um isolado de *Bacillus subtilis* conseguiu causar danos nas estruturas de seis fungos fitopatogênicos através da liberação de um conjunto de COVs. Esses compostos produzidos por espécies de *Bacillus* demonstram atividade de biocontrole diretamente contra fitopatógenos ou indiretamente, ao induzir a resistência sistêmica da planta (Massawe *et al.*, 2018). Giorgio *et al.* (2015) revelaram que diferentes estirpes bacterianas foram capazes, por meio da produção de COVs, de reduzir o desenvolvimento micelial de *S. sclerotiorum* e de causar perda de pigmentação

em *Fusarium oxysporum* e *Macrophomina phaseolina*. Os autores destacam a importância dos compostos na inibição da germinação dos escleródios, visto que estes representam fator-chave na sobrevivência do patógeno.

Massawe *et al.* (2018) também relataram a atividade de biocontrole de COVs de *Bacillus* contra *S. sclerotiorum* ao observar a redução do desenvolvimento micelial e da produção de ácido oxálico, assim como a inibição da produção e germinação de escleródios.

Diversos estudos mostraram que a síntese de metabólitos secundários produzidos por bactérias é de grande relevância para a supressão de fitopatógenos, representando uma ferramenta de biocontrole ambientalmente sustentável contra fungos fitopatogênicos (Silva *et al.*, 2020; Abreu *et al.*, 2022). Segundo Souza *et al.* (2015), estirpes bacterianas de *Bacillus* quando analisadas em condições *in vitro* demonstraram redução significativa do crescimento de fungos em grãos de soja, inibindo o desenvolvimento de fungos filamentosos em aproximadamente 100%.

Desse modo, diante da necessidade de alternativas mais sustentáveis para o controle de fitopatógenos, em especial dos fungos, o uso de espécies de *Bacillus*, segundo vários autores é uma das ferramentas de manejo com maior destaque. O destaque se dá pelo fato de haver a compatibilidade com o meio ambiente, a redução do uso de produtos químicos, a reconstituição da microbiota e, pela eficiência no controle de pragas e fitopatógenos (Smolinska e Kowalska, 2018; Ferreira, 2023; Goussous *et al.*, 2019; Rahman *et al.*, 2016; Sabaté *et al.*, 2018).

### 3. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho de iniciação científica foi avaliar o potencial da atividade antagonista do isolado bacteriano *Bacillus* JAB01 contra o fungo fitopatogênico *Sclerotinia sclerotiorum* em folhas destacadas de soja *in vitro* e também *in vivo*, sob ensaio em casa de vegetação com plantas de soja inoculadas com o fitopatógeno e o isolado bacteriano.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Isolado e condições de cultivo

O isolado bacteriano encontra-se armazenado em freezer a -80°C do LBMP e foi obtido de solo cultivado com mimosa [*Mimosa pudica* (L.)]. Para os testes preliminares, foi cultivado em meio Luria-Bertani (LB) a 30°C e 150 r.p.m por 4 horas de acordo com a curva de crescimento bacteriano do isolado.

Em um estudo prévio de bioprospecção com 51 isolados bacterianos, um isolado (JAB01) foi identificado como promissor contra o fungo *Sclerotinia sclerotiorum*. Inicialmente, o isolado bacteriano foi identificado como *Bacillus fungorum* de acordo com resultados do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA. Entretanto, tais resultados não são confiáveis para determinar taxonomia a nível de espécie, apenas a nível de gênero. Portanto, esse foi nomeado *Bacillus* JAB01.

Foi feito o sequenciamento do genoma completo de *Bacillus* JAB01 pela doutoranda Paula Klotz Brandão Rodrigues, como parte do seu trabalho de tese no Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas (LBMP) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” /FCAV – Jaboticabal e com base nos resultados obtidos, foi identificada a espécie do isolado bacteriano que, aqui, será mantida em sigilo por questões de confidencialidade.

O fungo fitopatogênico *Sclerotinia sclerotiorum* utilizado foi obtido da empresa Jco Biofertilizer, e esse foi mantido por repicagens contínuas em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA). Para a obtenção dos escleródios, o



patógeno foi cultivado em meio BDA à temperatura de 25 °C durante um período de no mínimo 14 dias até a formação dos mesmos.

#### **4.2. Teste *in vitro* de compatibilidade com *Bradyrhizobium***

As estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5080, 5079, 589, 5019 foram retiradas do estoque (freezer -80) do LBMP e então repicadas em meio de cultura sólido Ty (Behringer, 1974) para obtenção de colônia isolada. Então a colônia isolada foi transferida para 5mL de meio Ty, o qual foi cultivado a 30 °C e 150 r.p.m. por 12h, e então inoculado em 50 mL do mesmo meio e cultivados por mais 48h.

Em seguida, 500 µl da cultura crescida foram adicionados sobre placa de Petri com meio sólido (Ty) e espalhados sobre a superfície do mesmo até a homogeneização, mantendo sob repouso até a absorção total do líquido.

Após esses procedimentos, 15 µl do cultivo do *Bacillus* JAB01 em meio LB foi adicionado no centro da placa de Petri contendo Ty com as respectivas estirpes de *Bradyrhizobium japonicum*. As culturas foram colocadas em estufa, tipo BOD a 30 °C por 48 horas até obtenção de  $10^8$  células.

#### **4.3. Avaliação de atividade enzimática do isolado**

Diferentes tipos de meio contendo substratos enzimáticos específicos foram utilizados para verificar a atividade enzimática do *Bacillus* JAB01. 10 µL da solução bacteriana cultivada em meio LB líquido foram adicionados em quatro pontos equidistantes um do outro em placas e incubadas a 30 °C durante 4 dias.

Foi avaliada a atividade enzimática do *Bacillus* JAB01 para as enzimas protease, amilase, celulase, esterase e lipase. As metodologias seguidas para testar a produção dessas enzimas foram descritas, respectivamente, por Perneel *et al.* (2007), Hazarika *et al.* (2019), Gomashe, Gulhane, Belzawar, (2013), Hackenschmidt *et al.* (2014) e Boonmahome e Mongkolthananaruk (2013).

#### **4.4. Avaliação *in vitro* de atividade antagonista do *Bacillus* JAB01 contra *S. sclerotiorum***

##### **4.4.1. Ensaio de bacterização de sementes de soja**

Após a desinfecção da superfície das sementes de soja através de 3 lavagens com hipoclorito de sódio (5%) durante 1 minuto, intercaladas com água estéril, essas foram imersas em cultura bacteriana diluída de *Bacillus* JAB01 por 30 min. Adaptando o método de Abdullah *et al.* (2008), dois discos de micélio (7 mm de diâmetro) de *S. sclerotiorum* foram colocados em ambos os lados de uma placa de BDA. Cinco sementes inoculadas com a bactéria foram então colocadas em fila entre os dois discos de micélio. Após incubação de 30 dias a 25°C, o número de sementes germinadas de forma saudável e o de plântulas infectadas foram registradas no décimo e trigésimo dia após o início do ensaio. Sementes não tratadas com o isolado bacteriano foram usadas como controle e o experimento foi realizado com cinco repetições.

##### **4.4.2. Bioensaio de atividade antagonista por substâncias difusíveis**

A atividade antagonista do isolado bacteriano foi avaliada contra o fitopatógeno por meio da técnica da placa de cultura dupla. Os discos de micélio de *S. sclerotiorum* (~5 mm Ø) cultivados em meio sólido de BDA foram retirados com uma pinça esterilizada e depositados no centro de placas de BDA Petri. No extremo da placa (~2,5 cm do centro) 10 µl ( $1,13 \times 10^8$  UFC/ml) do *Bacillus* JAB01 foram inoculados. As placas foram incubadas a 25 °C em um B.O.D (Demanda de Bio-Oxigênio) durante 5 dias. As zonas de inibição foram medidas a partir da borda da colônia JAB01 até ao limite do crescimento micelial do fungo. Como controle, foram utilizadas placas de BDA inoculadas com 10 µl de meio LB estéril e o fungo. Cada tratamento foi executado em três placas de repetição e reproduzido pelo menos três vezes.

Também foi avaliada a atividade antagonista do isolado com outros fungos fitopatógenos de importância para a cultura da soja, sendo eles o *Fusarium*, *Macrophomina* e *Colethotricum* spp.

#### **4.4.3. Germinação e viabilidade de escleródio e produção de ácido oxálico**

Para a avaliação da germinação dos escleródios, uma alíquota de 100 µL ( $1,13 \times 10^8$  UFC/ml) de suspensão bacteriana foram espalhados com uma alça de Drigalsky esterilizada em uma placa de Petri com meio BDA. Depois, foram depositados dois escleródios nas extremidades das placas e incubados a 25°C. A germinação foi avaliada ao fim de 7 dias. Além dessa metodologia, os escleródios foram submersos durante 1 minuto numa suspensão de esporos

( $1,13 \times 10^8$  UFC/ml) do antagonista, depois foram recolhidos e transferidos para uma placa de Petri contendo BDA.

Após a avaliação da germinação, dos escleródios foram recolhidos e a superfície foi esterilizada através de 3 lavagens com hipoclorito de sódio (5%) durante 1 minuto, intercaladas com água estéril para eliminar o inóculo JAB01. Após a desinfecção, os escleródios foram recolhidos e transferidos para placas de Petri contendo meio BDA complementado com 50 mg/L azul de bromofenol para avaliar a viabilidade da germinação miceliogênica e a produção de ácido oxálico.

#### **4.4.4. Efeitos de COVs na germinação de escleródios**

Adaptando a metodologia apresentada por Da Silva *et al.* (2022) foram substituídas placas de Petri normais por placas de Petri bipartidas. Para avaliar os efeitos dos COVs do *Bacillus* JAB01 na germinação de escleródios de *S. sclerotiorum*, esses foram retirados de uma placa de *S. sclerotiorum* e colocados em um dos lados de uma placa de Petri dividida. Do outro lado da placa, 50 µl da solução bacteriana, cultivada nas condições descritas anteriormente, foram espalhados com uma alça de Drigalsky e as placas foram seladas com parafilme e mantidas em BOD a 25 °C. Após 5 dias, a germinação micelial da estrutura de resistência do fungo foi avaliada.

#### **4.4.5. Ensaio com substâncias difusíveis e COVs em folhas destacadas**

Folhas completamente expandidas selecionadas de plantas de soja no estágio V3/V4 foram separadas, enxaguadas com água destilada estéril, e secas

ao ar. As folhas de soja foram colocadas em placas de Petri de plástico (8 por 8 cm), sobre uma folha de papel toalha úmido para evitar o contato direto com a água, e os seus pecíolos foram envolvidos com algodão umedecido para evitar o seu ressecamento.

Para o ensaio com substâncias difusíveis, os tratamentos com o isolado bacteriano foram inoculados 30 µl da solução de *Bacillus* JAB01, crescida conforme descrito anteriormente (Tópico 4.1) nas folhas e espalhados por toda a superfície foliar com alça de Drigalsky. Discos de micélio de *S. sclerotiorum* de ~7mm foram retirados de placas preparadas como descrito anteriormente e colocados na parte superior da folha sobre a nervura central. As folhas do tratamento controle não foram inoculadas com o isolado bacteriano. Todos os tratamentos foram incubados a 25 °C por um período de aproximadamente 10 dias. O ensaio foi realizado com 5 repetições

Para o ensaio com COVs, um único folíolo foi colocado em uma placa de Petri bipartida de 9 cm de diâmetro, seguindo os mesmos procedimentos do teste acima. Do outro lado da placa, 60 µl da solução bacteriana, cultivada nas condições descritas anteriormente, foram espalhados sobre meio LB com uma alça de Drigalsky e as placas foram seladas com parafilme e mantidas em BOD a 25 °C durante 5 dias. Após 5 dias, a incidência da doença foi avaliada e a atividade antagonista foi analisada em termos da presença de sintomas da doença. Cada tratamento possuía cinco repetições e o experimento foi replicado três vezes.

#### **4.5. Avaliação de biocontrole do *Bacillus* JAB01 contra *S. sclerotiorum* em plantas de soja em casa de vegetação**

##### **4.5.1. Avaliação de germinação de sementes**

Para o ensaio de germinação de sementes, vasos quadrados de aproximadamente 1,5L foram preenchidos com substrato composto por areia grossa e vermiculita na proporção de 1:1. Esses foram semeados com sementes de soja da cultivar comercial “BMX Valente”, com o uso de 12 sementes por vaso. Foram utilizados 6 tratamentos, sendo esses: T1 = controle (só sementes); T2 = sementes inoculadas com *Bacillus* JAB01; T3 = sementes inoculadas com *Bacillus* JAB01 + cultura líquida de micélio; T4 = sementes inoculadas com cultura líquida de micélio; T5 = sementes inoculadas com *Bacillus* JAB01 e aplicação da solução bacteriana após emergência das plântulas; T6 = semente inoculadas com *Bacillus* JAB01 + cultura líquida de micélio e aplicação da solução bacteriana após emergência das plântulas. Cada tratamento composto por 3 repetições.

##### **4.5.2. Avaliação de atividade antagonista do *Bacillus* JAB01 contra *S. sclerotiorum* em plantas de soja**

Foi realizado o preparo e a limpeza da casa de vegetação para então proceder à disposição dos vasos. A mistura do solo foi feita na proporção de 4 partes de terra para 1 de areia, 1 de substrato e 1 de esterco curtido. Vasos com capacidade de 7 litros foram então preenchidos com a mistura e colocados na casa de vegetação.

Para a semeadura, foram feitos cinco orifícios por vaso com 3 cm de profundidade, onde então foram colocadas as sementes. Após a emergência das plântulas, duas delas foram desbastadas, sendo a parcela útil formada por um vaso com três plantas.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), com 3 repetições. Sementes de soja comerciais da cultivar “BMX Valente”, tratadas com fungicida sem espectro de ação para controle de *S. sclerotiorum*. As sementes comerciais foram gentilmente cedidas pela empresa Ourofino Agrociência, localizada em Ribeirão Preto - São Paulo.

A inoculação dos microrganismos foi feita quando as plantas se encontravam no estágio V3/V4. Os tratamentos utilizados foram T1 = controle (só semente); T2 = inoculação só do *Bacillus* JAB01; T3 = inoculação do *Bacillus* JAB01 e do fungo *S. sclerotiorum*; T4 = inoculação só do fungo *S. sclerotiorum*.

Para isto, o fungo foi cultivado em um Erlenmeyer de 500 ml com 250 ml de meio BDA líquido, ao qual foram adicionados 30 discos de micélio em crescimento ativo. O frasco inoculado foi mantido sob agitação de 200 r.p.m. em 28 °C por 5 dias. As massas miceliais dos discos foram coletadas e centrifugadas em tubos Falcon por 15 minutos a 11,5 G e 4 °C e, ao final, foi retirado o sobrenadante. Os tubos foram centrifugados novamente por um período de mais 10 minutos nas mesmas condições. O sobrenadante foi novamente retirado. A massa micelial centrifugada foi ressuspensa com água destilada previamente esterilizada e então pronta para inoculação. Tal inoculação foi realizada de acordo com a metodologia de gota de micélio descrita por Chen e Wang (2005),

com a adição de um ferimento de aproximadamente 2 cm no caule principal das plantas com um bisturi, entre o 2º e 3º trifólio. A suspensão de micélio homogeneizado foi gotejada no ferimento numa dosagem de cerca de 1 ml/planta, com o uso de uma pipeta. Em seguida, as plantas que compunham o tratamento com o antagonista foram inoculadas com 60 µl da solução bacteriana cultivada como descrito anteriormente. Por fim, os ferimentos foram selados com parafilme. Durante as inoculações, os recipientes contendo a suspensão de micélio e a solução bacteriana foram agitados frequentemente para mantê-los uniformemente suspensos.

#### **4.6. Forma de análise dos resultados**

Os resultados dos experimentos dos tópicos 4.5.1 e 4.5.2 foram submetidos a análise de variância pelo teste F a nível de 5% de significância. Ao obter-se as médias, essas foram submetidas ao teste de Tukey a 5% de probabilidade utilizando-se do programa Sisvar Versão 5.6.



## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos revelaram que não houve interferência da bactéria *Bacillus* JAB01 em relação ao desenvolvimento das estirpes de *Bradyrhizobium*, demonstrando com isso que há compatibilidade entre os microrganismos em questão (Fig. 1).

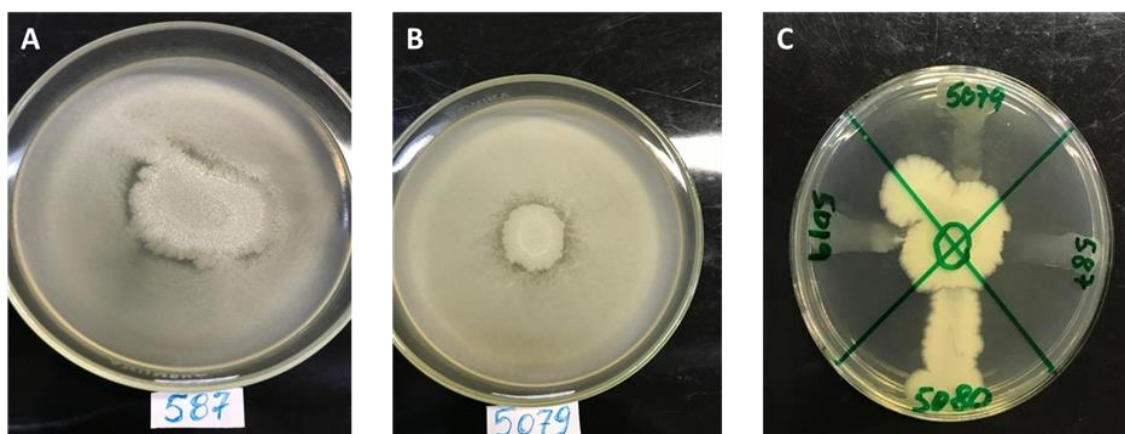


Figura 1. (A, B) Cultivo de estirpes de *Bradyrhizobium*; (C) Teste de compatibilidade com o isolado.

A compatibilidade entre os inoculantes das culturas é de extrema importância, em especial para a soja em que o fornecimento de nitrogênio se dá estritamente por meio de bactérias fixadoras de nitrogênio, como o *B. japonicum*; torna-se imprescindível testes de compatibilidade para a utilização de microrganismos inoculantes sem efeitos deletérios ao outro (Spagnhol *et al.*, 2020). Dessa forma, o *Bacillus* JAB01 pode ser utilizado juntamente desses inoculantes que são indispensáveis para o cultivo da soja.

Os resultados de atividade enzimática do *Bacillus* JAB01 foram positivos para todos os substratos enzimáticos aqui testados, comprovando que a bactéria é capaz de produzir enzimas com atividade de degradação (Fig. 2).

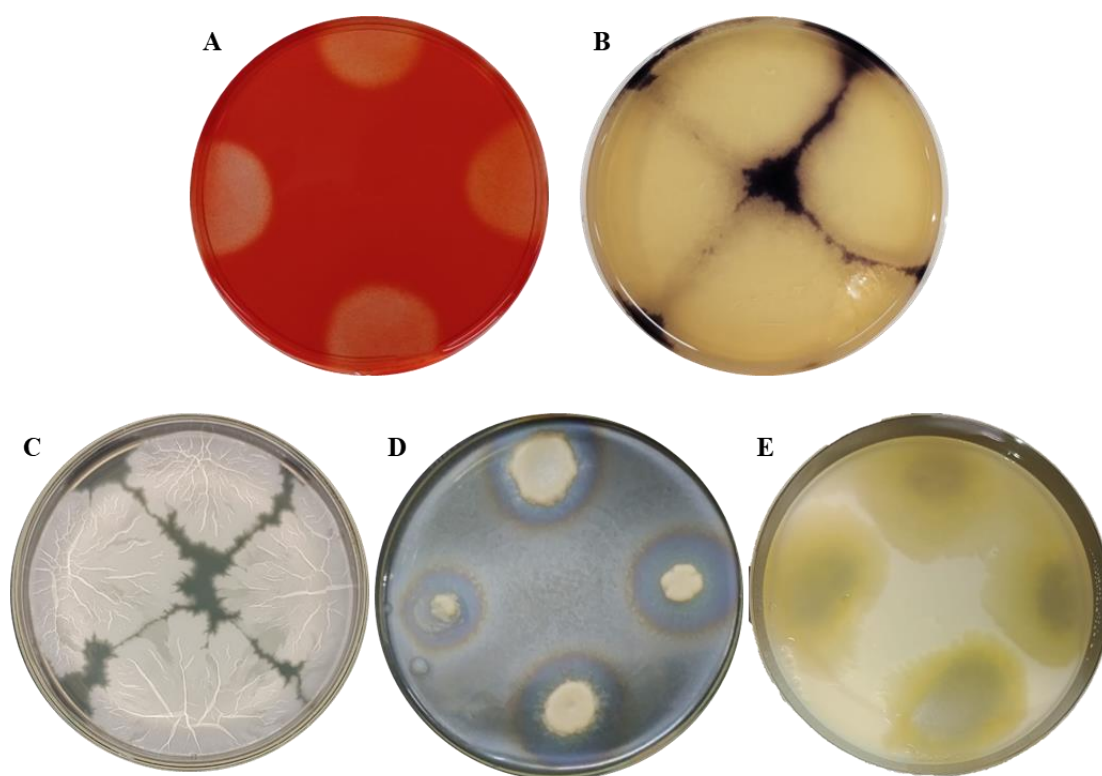


Figura 2. Atividade enzimática do *Bacillus* JAB01 para substratos de importância agroindustrial. (A) CMC; (B) Amilase; (C) Lipase; (D) Esterase; (E) Protease.

Salwan e Sharma (2020) explanaram que o *Bacillus* sp. SBA12 apresenta potencial de biocontrole de fitopatógenos, em particular para a *Phytophthora infestans* e a *Sclerotinia sclerotiorum*, por conta da diversidade de proteínas, da produção de metabólitos secundários antimicrobianos e da presença de enzimas degradadoras de parede celular como endoglucanases, amilases e proteases

Os resultados obtidos no ensaio de bacterização de sementes demonstraram que o tratamento das sementes imersas na solução bacteriana do *Bacillus* JAB01 foi capaz de causar um halo de inibição do crescimento micelial e da produção de escleródios do fungo *S. sclerotiorum*, no décimo e no trigésimo dia após a execução do ensaio, em comparação com o controle (Fig. 3).

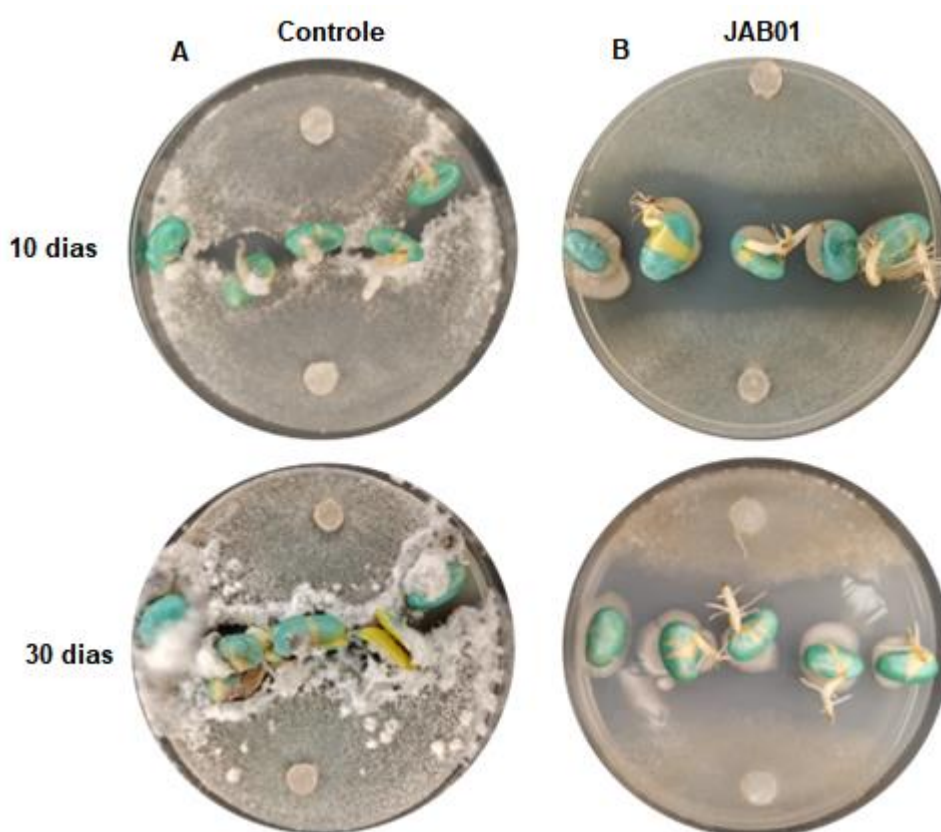


Figura 3. Efeito de supressão do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* em sementes de soja tratadas com o *Bacillus* JAB01 após 10 e 30 dias de incubação. (A) Sementes de soja não tratadas em placas de BDA contendo discos de micélio em crescimento ativo; (B) Sementes de soja tratadas com a solução bacteriana em placas de BDA contendo discos de micélio em crescimento ativo.

O tratamento de sementes com inoculantes têm se consolidado como uma das principais estratégias para o controle de doenças na fase inicial das

plantas. A proteção das sementes de soja *in vitro* do *Bacillus* JAB01 contra a *S. sclerotiorum* observadas nesse trabalho soma à compatibilidade do isolado com os inoculantes. Diante disso, o isolado bacteriano pode ser utilizado como inoculante pré emergente, já que o efeito foi observado em até 30 dias, protegendo as sementes de fitopatógenos relacionados ao início da cultura.

Segundo Sabaté *et al.* (2018), a imersão de sementes de feijão branco em solução bacteriana de três diferentes cepas de *Bacillus* foi capaz de inibir em 100%, em placas de Petri contendo meio BDA, o desenvolvimento micelial do fungo fitopatogênico *S. sclerotiorum*. De acordo com Rahman *et al.* (2016), a bacterização de sementes de mostarda foi capaz de evitar a colonização por parte da *S. sclerotiorum*, enquanto que as não tratadas foram acometidas pelas hifas do fungo 7 dias após incubação, resultados que vão de encontro ao nosso.

Os resultados revelaram que o *Bacillus* JAB01 possui metabólitos secundários difusíveis com atividade de interesse. Os resultados mostraram que JAB01 foi capaz de reduzir quase que por completo o desenvolvimento micelial em comparação com o controle (Fig. 4).

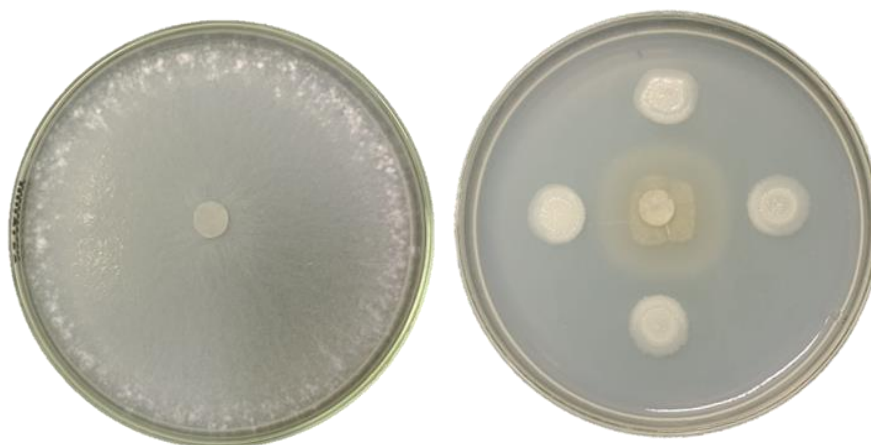


Figura 4. Efeito de atividade antagonista por substâncias difusíveis de JAB01 contra *S. sclerotiorum*.

Os resultados obtidos mostraram que não houve atividade antagonista do *Bacillus* JAB01 em relação ao desenvolvimento de outros fungos fitopatógenos (Fig. 5).

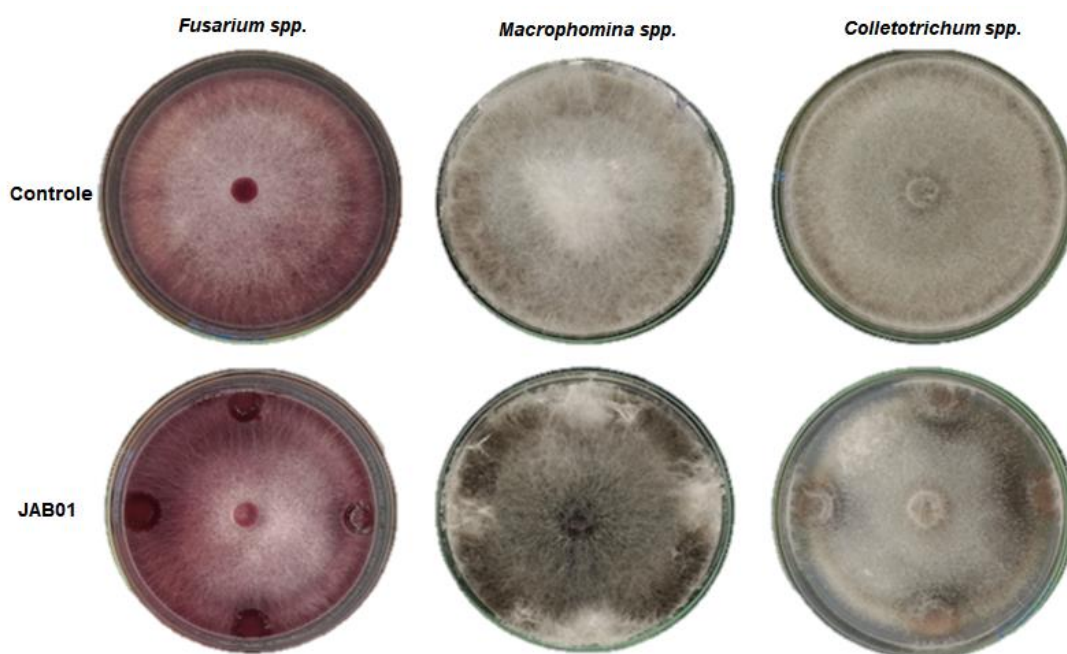


Figura 5. Avaliação de atividade antagonista por substâncias difusíveis contra outros fungos de importância econômica para a soja.

Fungos fitopatógenos de importância agrícola como *Fusarium oxysporum*, *Alternaria solani*, *Phytophthora infestans*, *Colletotrichum spp*, *Botrytis cinerea*, entre outros patógenos de solo, são frequentemente mencionados em relatos de biocontrole por parte de isolados de *Bacillus* (Noble, 2005; Panth, Hassler, Baysal-Gurel, 2020; Ji *et al.*, 2013; Shafi, Tian, Ji, 2017).

O isolado CNU114001, identificado como um *Bacillus amyloliquefaciens* por Ji *et al.* (2013), foi testado *in vitro* o seu potencial como agente de biocontrole

de fungos fitopatogênicos em ensaios de cultura dupla com diferentes concentrações da substância antifúngica bruta. De acordo com os autores, os resultados demonstraram que o isolado foi capaz de inibir o crescimento micelial de *A. panax*, *B. cinerea*, *P. grisea* e *S. sclerotiorum* com a menor concentração tratada (50 ppm).

O estudo dirigido por Rahman *et al.* (2016) demonstrou que, em condições *in vitro*, por meio de ensaio de cultura dupla em placas com meio BDA, diferentes isolados de *Bacillus* suprimiram o crescimento micelial de *S. sclerotiorum* entre 65.9 a 82.5%. Ainda, segundo os autores, alguns dos isolados produziram também uma variedade de COVs com capacidade de reduzir o crescimento micelial, atingindo valor de até 54,4% pelo isolado RNB-92.

Os nossos resultados demonstraram que os metabólitos secundários difusíveis emitidos pelo *Bacillus* JAB01 possuem efeitos fungistáticos para o *S. sclerotiorum*, fato evidenciado pela inibição completa da germinação dos escleródios 7 dias após eles serem tratados com a suspensão bacteriana (Fig. 6).

Além disso, em meio BDA suplementado com azul de bromofenol (Fig. 7), foi observado que o escleródio tratado com o isolado não emitiu ácido oxálico. Isso pode se explicar pelo fato do azul de bromofenol ser um indicador de base ácido que emite cor azul a  $\text{pH} \geq 4,6$  e cor amarela a  $\text{pH} \leq 4,6$  (Kreft e Kreft, 2009). Neste estudo, a coloração amarela não era visível em placas com escleródios tratados.



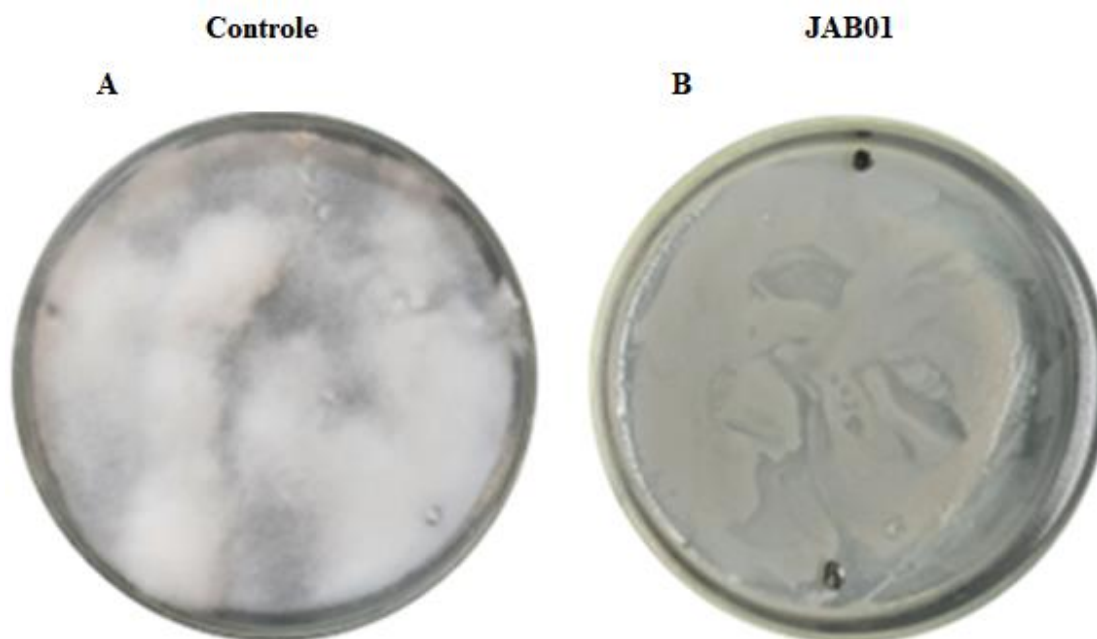


Figura 6. Avaliação da germinação miceliogenica de escleródios após 7 dias em meio BDA.

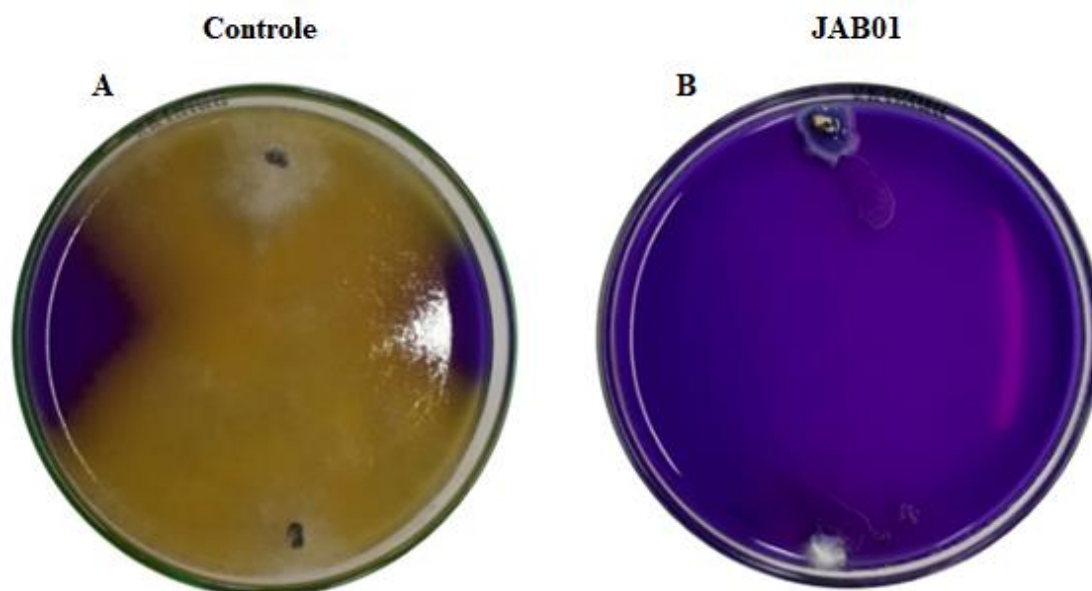


Figura 7. Germinação miceliogenica de escleródio e produção de ácido oxálico em meio BDA suplementado com azul bromophenol.

É relatado na literatura acerca do tema que a produção do ácido oxálico pela *S. sclerotiorum* está intimamente associada com a infecção da planta

hospedeira. Foi observado que esse composto atua na desregulação das células sentinelas (Cunha, 2010), a qual mantém abertos os estômatos e facilita a entrada das hifas, bem como a redução do pH favorece a atividade de EDPCs (Ferreira, 2023; Smolinska e Kowalska, 2018). A importância do ácido oxálico no processo de infecção do hospedeiro pelo fungo leva Cunha (2010) e Fang *et al.* (2015) a destacarem o uso de plantas transgênicas com capacidade de degradar o oxalato pelo gene oxalato descarboxilase (OxDC), esse sendo produzido por espécies de *Bacillus* (Zhou *et al.*, 2023; Reinhardt *et al.*, 2003)

A capacidade de inibir o crescimento de diversos fitopatógenos foi avaliada *in vitro* por Giorgio *et al.* (2015), e seis isolados de rizobactérias demonstraram atividade de biocontrole por meio de substâncias difusíveis e de COVs. Os autores ainda avaliaram os COVs isolados e relataram que o isolado de *S. sclerotiorum* USB-F593 foi o mais afetado dentre os fungos fitopatogênicos testados.

Os resultados obtidos demonstraram que *Bacillus* JAB01 produz COVs capazes de inibir a germinação miceliogênica de escleródios. No tratamento controle (Fig. 8A), o escleródio foi capaz de germinar e colonizar a placa enquanto que, no tratamento com o isolado bacteriano, não houve germinação da estrutura de resistência (Fig. 8B). A exposição ao conjunto de compostos voláteis produzidos pelo isolado demonstrou inibir a germinação do escleródio por até 30 dias (Fig. 8B).



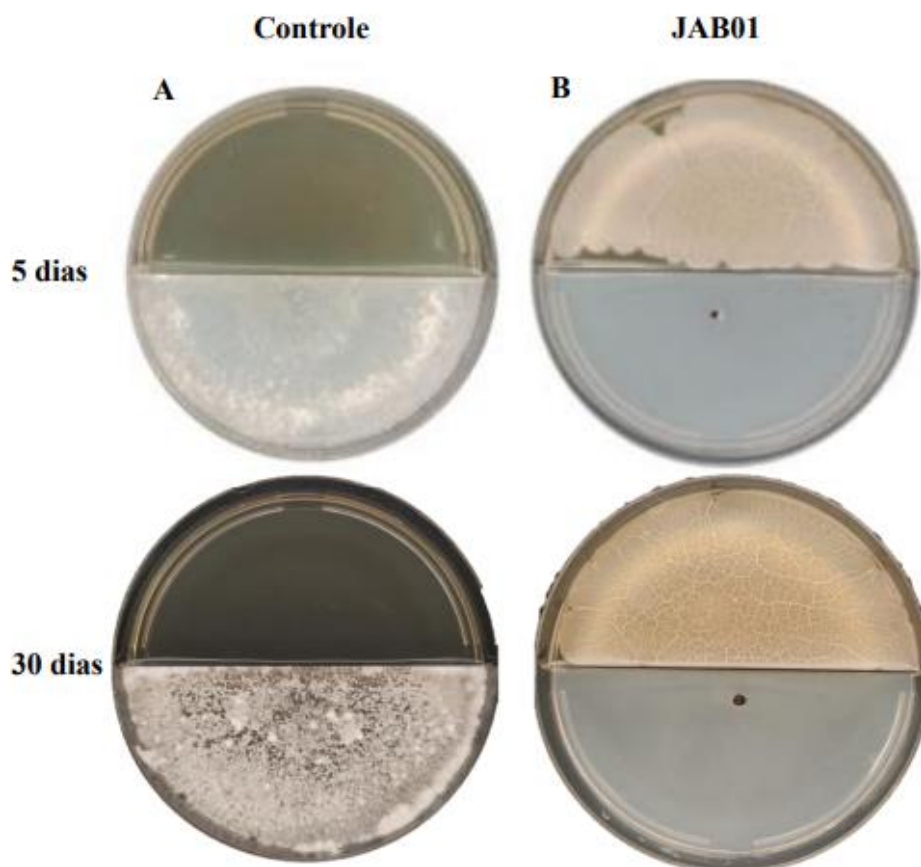


Figura 8. Efeitos de atividade antagonista de COVs do *Bacillus* JAB01 na germinação miceliogênica de escleródios após 5 e 30 dias de incubação. (A) Placa bipartida com meio de cultura LB em um lado e em outro, meio BDA contendo um escleródio; (B) Placa bipartida com meio de cultura LB inoculado com o *Bacillus* JAB01 em um lado e em outro, meio BDA contendo um escleródio.

De acordo com Massawe *et al.* (2018), diferentes isolados do gênero *Bacillus* foram avaliados quanto à capacidade de inibir a germinação de escleródios saudáveis sob efeito dos COVs produzidos pelas bactérias, e revelou-se que esses não germinaram. Resultados parecidos foram relatados por Weisskopf (2013) que aponta a inibição da germinação de escleródios por compostos orgânicos voláteis produzidos por bactérias. A prospecção de

métodos de controle dos escleródios constitui um dos principais focos do manejo dessa doença, uma vez que a estrutura de resistência dificulta a erradicação do patógeno.

Santos (2021) testou a viabilidade de COVs para o controle do crescimento micelial e para a germinação de escleródios, entretanto, os resultados evidenciaram que o conjunto de voláteis produzidos pelo isolado não tem potencial de biocontrole. Porém, por meio da exposição à solução dos isolados de *Bacillus* por 30 minutos, a ação de metabólitos secundários e enzimas líticas foi capaz de inibir em até 100% a germinação dos escleródios.

Segundo os resultados obtidos no ensaio para substâncias difusíveis, a produção de metabólitos secundários difusíveis por parte do *Bacillus* JAB01 foi capaz de suprimir o desenvolvimento do fungo fitopatogênico *S. sclerotiorum* em folhas de soja destacadas. A progressão da doença foi muito menor nas folhas que receberam o tratamento (Fig. 9B), quando comparadas ao controle (Fig. 9A), no qual a folha de soja foi colonizada em torno de 80% da área foliar, em 5 dias após a inoculação do fungo.

Ao longo de 5 dias de incubação das placas bipartidas, foi possível observar os efeitos dos COVs do *Bacillus* JAB01 sobre a colonização da *S. sclerotiorum* em folhas de soja. No quinto dia, os resultados demonstraram que a progressão da doença nas folhas de soja tratadas com os COVs foi quase nula (Fig. 9D), ao passo que, nas folhas que não foram expostas aos COVs, a doença acometeu mais da metade da área foliar (Fig. 9C).

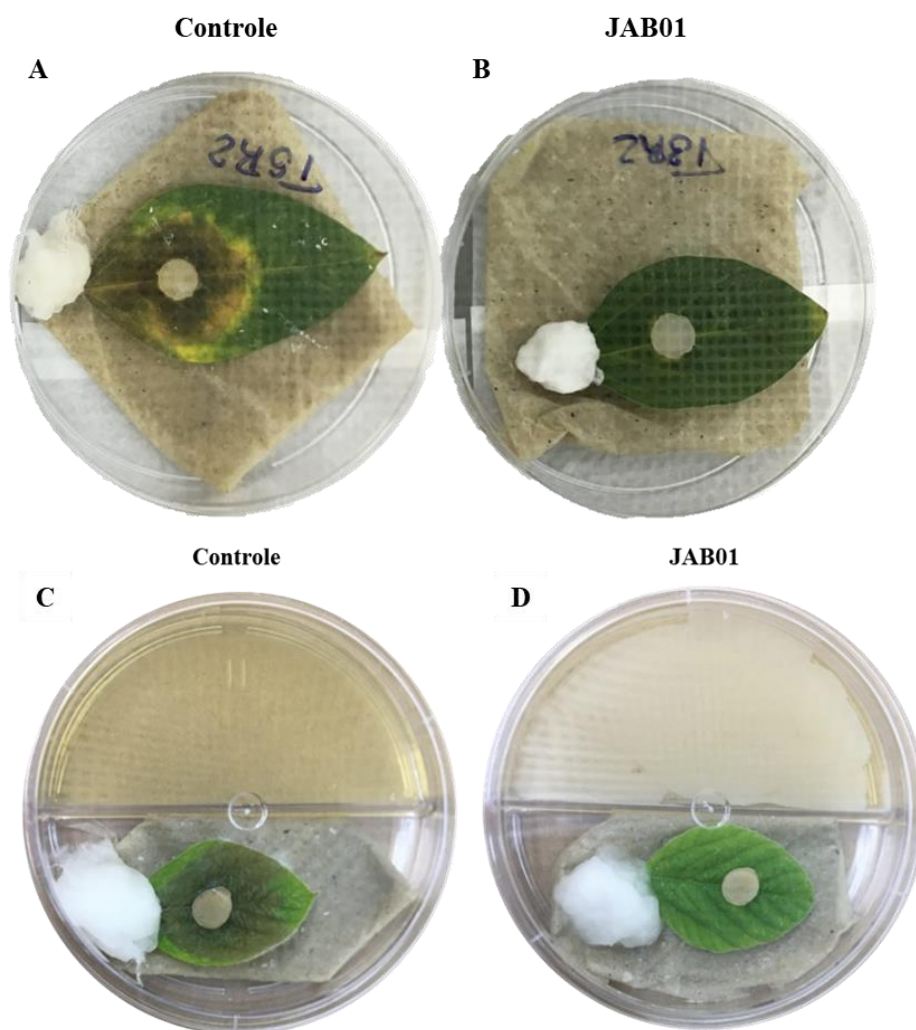


Figura 9. Efeito do *Bacillus* JAB01 na supressão do desenvolvimento do fitopatógeno *S.sclerotiorum* em folhas destacadas de soja. (A) Folha destacada de soja com disco de micélio em crescimento ativo; (B) Folha destacada de soja com disco de micélio em crescimento ativo e inoculada com o *Bacillus* JAB01; (C) Placa bipartida com meio LB em um lado e em outro, um folíolo de soja com disco micelial de *S. sclerotiorum*; (D) Placa bipartida com meio LB inoculada com o *Bacillus* JAB01 em um lado e em outro, um folíolo de soja com disco micelial de *S. sclerotiorum*.

Em ensaios de folhas destacadas, foram obtidos resultados semelhantes, em que o uso de espécies de *Bacillus* foi capaz de proteger as folhas contra

infecção do fungo *S. sclerotiorum* (Spanhol *et al.*, 2020; Sahman *et al.*, 2016). De acordo com os autores, o tratamento das folhas com as soluções bacterianas, apresentou potencial de biocontrole através de substâncias difusíveis que reduziram as lesões necróticas; ademais, a atividade de biocontrole também foi observada em folhas de soja pelo tratamento por COVs (Massawe *et al.*, 2018).

A atividade antagonista do *Bacillus* JAB01 é de grande interesse na prevenção do fungo fitopatogênico tanto para pré emergência das sementes quanto para proteção das partes aéreas das plantas em períodos de maior vulnerabilidade a doença. Além disso, o *Bacillus* JAB01 pode ser usado em períodos de florescimento da cultura a fim de proteger as partes aéreas das plantas da infecção da *S. sclerotiorum*, tendo em vista os resultados positivos *in vitro* de redução de incidência e severidade em folhas destacadas de soja.

Para avaliação da taxa de germinação, foi realizada a contagem de plântulas emergidas. Os resultados demonstraram que não houve diferença significativa entre os tratamentos em relação ao número de sementes germinadas (Fig. 10, Gráfico 1, Tabela 1).

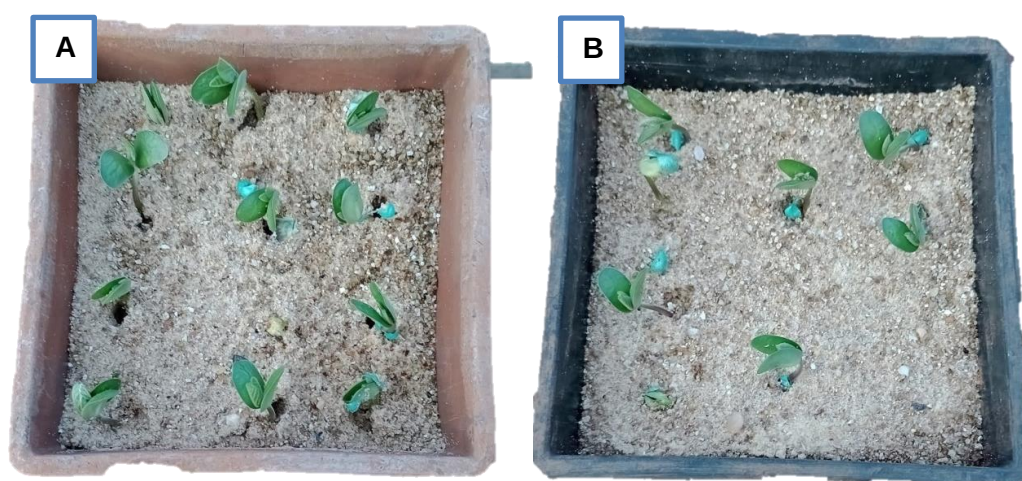


Figura 10. Ensaio de germinação de sementes de soja tratadas com *Bacillus* JAB01 na presença de *S. sclerotiorum*; (A) 7 dias após a semeadura (repetição do tratamento de inoculação do *Bacillus* JAB01 + cultura líquida de micélio de *S. sclerotiorum*; (B) 7 dias após a semeadura (repetição do tratamento de semente inoculação da cultura líquida de micélio de *S. sclerotiorum*).

| -           | Descrição metodológica                                                                                                                          | Número de sementes germinadas | Média de sementes germinadas por repetição | Germinação de sementes (%) |
|-------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------------------|----------------------------|
| TRATAMENTOS |                                                                                                                                                 | TOTAL = 36                    | TOTAL = 12                                 |                            |
| T1          | T1 = controle (só sementes);                                                                                                                    | 31 a                          | 10,3                                       | 92                         |
| T2          | T2 = sementes inoculadas com <i>Bacillus</i> JAB01;                                                                                             | 32 a                          | 10,7                                       | 92                         |
| T3          | T3 = sementes inoculadas com <i>Bacillus</i> JAB01 + cultura líquida de micélio;                                                                | 26 a                          | 8,7                                        | 75                         |
| T4          | T4 = sementes inoculadas com cultura líquida de micélio;                                                                                        | 23 a                          | 7,7                                        | 67                         |
| T5          | T5 = sementes inoculadas com <i>Bacillus</i> JAB01 e aplicação da solução bacteriana após emergência das plântulas;                             | 23 a                          | 8                                          | 67                         |
| T6          | T6 = semente inoculadas com <i>Bacillus</i> JAB01 + cultura líquida de micélio e aplicação da solução bacteriana após emergência das plântulas; | 23 a                          | 7,7                                        | 67                         |

Tabela 1. Avaliação de germinação de sementes.

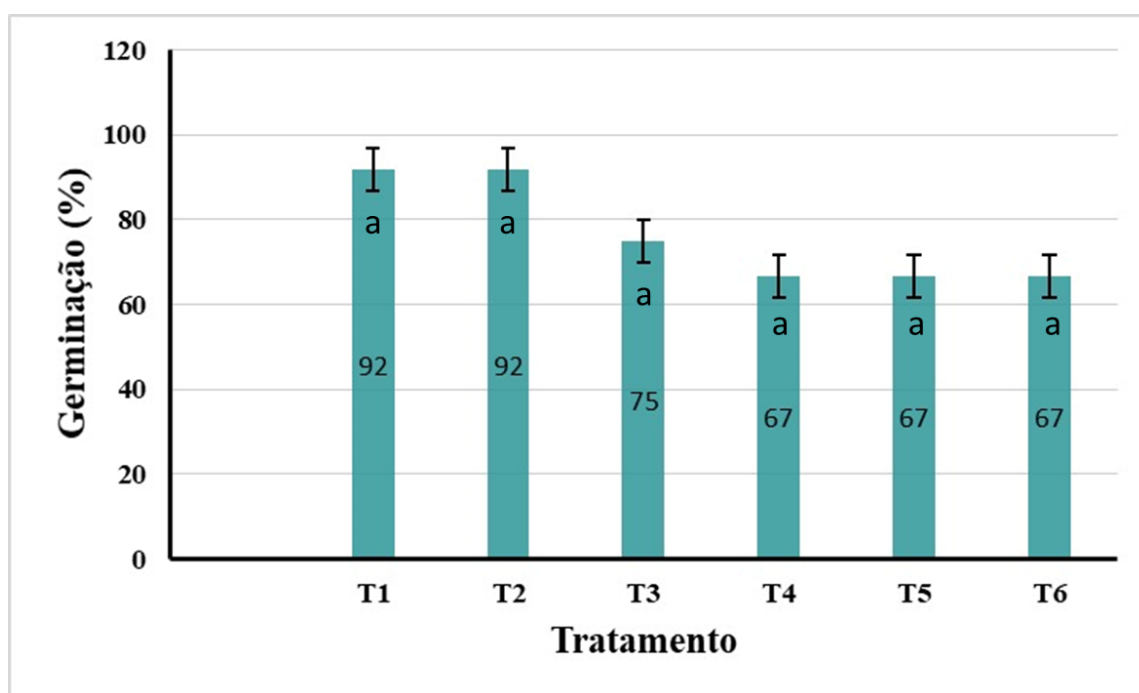


Gráfico 1. Germinação de sementes em casa de vegetação.

De acordo com Rahman *et al.* (2016) o efeito da bacterização de sementes na germinação e no vigor de plântulas foi observado *in vitro*. Segundo os autores, o tratamento promoveu um crescimento significativo em relação ao controle.

Obteve resultados em casa de vegetação por meio da inoculação com cultura líquida de micélio (Gráfico 2). Após 4 dias da inoculação, as plantas que compunham os tratamentos (Tabela 2) de controle negativo (só o fungo na planta) já apresentavam o sintoma de murcha, fato que, em menos de 3 dias, foi capaz de causar o ressecamento das partes afetadas (Fig. 11C). Já nas plantas do tratamento de interação entre o fungo e o isolado bacteriano, não foram observados sintomas visíveis da doença e as plantas desenvolveram-se normalmente (Fig. 11B)



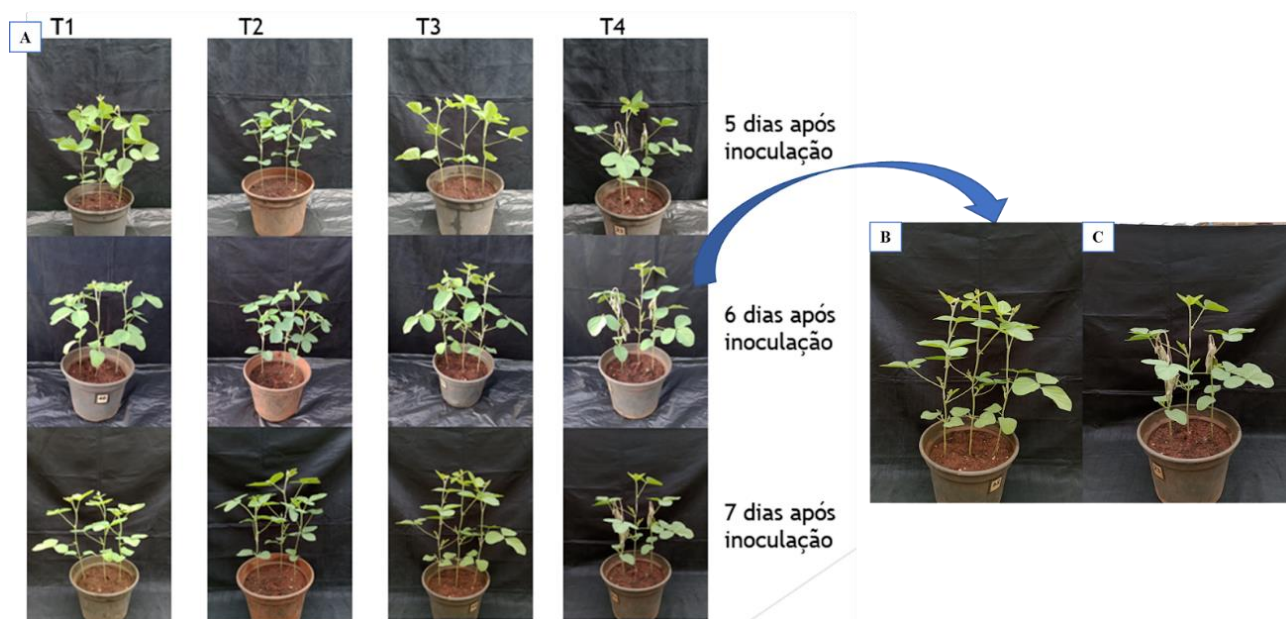


Figura 11. (A) Ensaio de inoculação com cultura líquida de micélio de *S. sclerotiorum* em plantas de soja; (B) Tratamento T3 (*Bacillus* JAB01 + cultura líquida de micélio) 7 dias após inoculação; (C) Tratamento T4 (cultura líquida de micélio) 7 dias após inoculação.

| -           | Descrição metodológica                                                                                  | Número de plantas infectadas | Média de incidência por repetição | Incidência em plantas (%) |
|-------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|-----------------------------------|---------------------------|
| TRATAMENTOS |                                                                                                         | TOTAL = 15                   | TOTAL = 3                         |                           |
| T1          | T1 = controle (só semente de soja);                                                                     | 0 b                          | 0                                 | 0                         |
| T2          | T2 = plantas de soja inoculadas apenas com o <i>Bacillus</i> JAB01;                                     | 0 b                          | 0                                 | 0                         |
| T3          | T3 = plantas de soja inoculadas com o <i>Bacillus</i> JAB01 e solo com o fungo <i>S. sclerotiorum</i> ; | 2 b                          | 0,4                               | 13                        |
| T4          | T4 = plantas inoculadas somente do fungo <i>S. sclerotiorum</i> (controle negativo);                    | 13 a                         | 2,2                               | 73                        |

Tabela 2. Avaliação de atividade antagonista do *Bacillus* JAB01 contra *S. sclerotiorum* em plantas de soja.

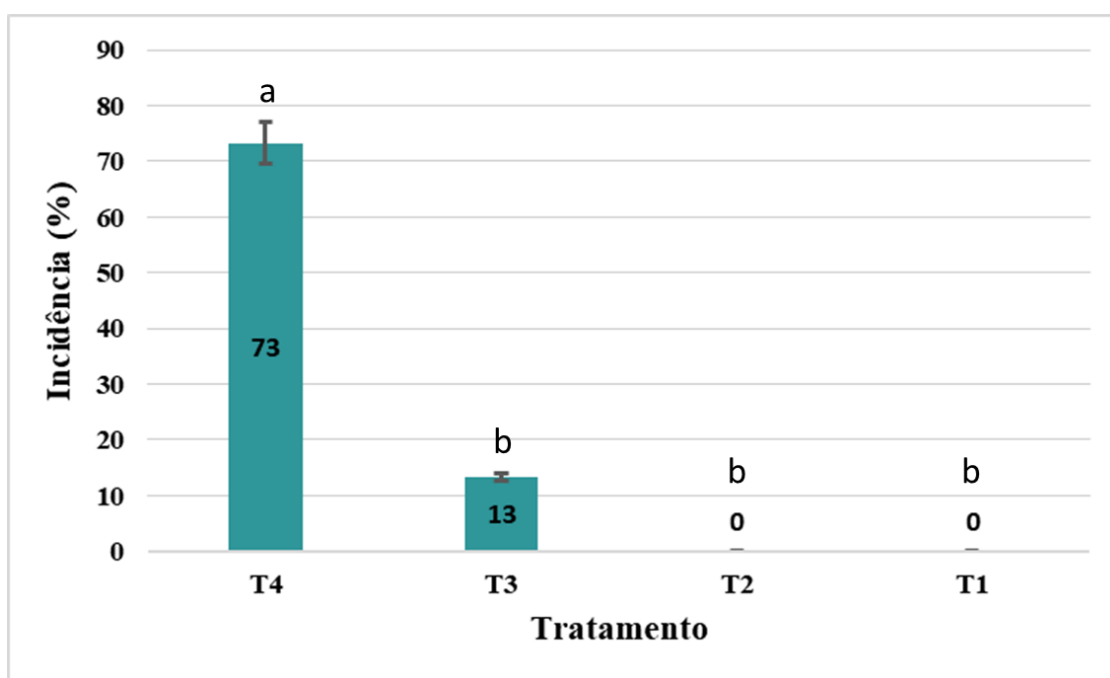


Gráfico 2. Incidência de mofo-branco em plantas de soja em casa de vegetação.

Em vista dos resultados *in vitro*, estudos são realizados em condições de casa de vegetação, a fim de avançar com o conhecimento de biocontrole de microrganismos. Por exemplo, ensaios em casa de vegetação com plantas de tomate, tratamentos com espécies de *Bacillus* têm demonstrado resultados positivos, reduzindo a infecção por fitopatógenos (Etesami, Jeong, Glick, 2023).

De acordo com Cheng *et al.* (2022), um *Bacillus amyloliquefaciens* foi capaz de reduzir os danos causados pela *S. sclerotiorum* em plantas de soja, haja visto que o controle apresentou murchas e folhas necróticas. Já as plantas tratadas com o isolado bacteriano não foram observados tais sintomas, resultados que estão em concordância com os nossos.

Nossos resultados estão de acordo com resultados anteriores na literatura acerca do tema aqui tratado. Cheng *et al.* (2022) expuseram que *B. amyloliquefaciens* CH-2 foi capaz de reduzir significativamente a incidência do



mofo-branco em plantas de soja *in vivo*. Sabaté *et al.* (2018) relatou que os isolados *Bacillus* spp. B19 and P12 and *B. amyloliquefaciens* B14, em combinação, tem potencial para reduzir a incidência do mofo-branco. Diante disso, a prospecção de microrganismos e o potencial desses como agentes de biocontrole torna-se essencial, uma vez que as interações entre os microrganismos são inúmeras e específicas.

## 6. CONCLUSÕES

Conforme os resultados obtidos neste trabalho de iniciação científica, o *Bacillus* JAB01 apresentou grande potencial acerca da atividade antagonista contra o fungo fitopatogênico *S. sclerotiorum*. O isolado bacteriano demonstrou compatibilidade com estirpes de *Bradyrhizobium japonicum*, podendo ser utilizado no tratamento de sementes de soja junto desses inoculantes. O *Bacillus* JAB01 produziu metabólitos secundários capazes de proteger sementes e folhas destacadas de soja *in vitro*, além de inibir a germinação *in vitro* de escleródios sob a exposição dos COVs do isolado. Por fim, o isolado bacteriano foi capaz de reduzir significativamente a incidência do mofo-branco em casa de vegetação em plantas de soja. Portanto, espera-se que os resultados do *Bacillus* JAB01 apresentados neste trabalho possam embasar futuros estudos que avaliem a viabilidade do isolado como produto biológico contra a *S. sclerotiorum* à nível de campo.

## 7. LITERATURA CITADA

ABREU, Luciana de Paiva Santos *et al.* Alternativa sustentável de uso da *Bacillus amyloliquefaciens* no biocontrole de fungos fitopatogênicos: uma revisão. Revista de Ciências Ambientais, v. 16, n. 1, 2022.

BOLTON, Melvin D.; THOMMA, Bart PHJ; NELSON, Berlin D. Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. Molecular plant pathology, v. 7, n. 1, p. 1-16, 2006.

BOONMAHOM, Patcha; MONGKOLTHANARUK, Wiyada. Lipase-producing bacterium and its enzyme characterization. J Life Sci Technol, v. 1, n. 4, p. 196-200, 2013.

BRUSTOLIN, Ricardo; REIS, Erlei Melo; PEDRON, Lucas. Longevity of Sclerotinia sclerotiorum sclerotia on the soil surface under field conditions. Summa Phytopathologica, v. 42, p. 172-174, 2016.

CEPEA, 2023. Disponível em: <  
[CHAURASIA, Bhaskar \*et al.\* Diffusible and volatile compounds produced by an antagonistic \*Bacillus subtilis\* strain cause structural deformations in pathogenic fungi \*in vitro\*. Microbiological research, v. 160, n. 1, p. 75-81, 2005.](https://www.cepea.esalq.usp.br/br/releases/cepea-abiove-cadeia-da-soja-e-do-biodiesel-representou-27-do-pib-do-agronegocio-e-gerou-2-milhoes-de-empregos-em-2022.aspx#:~:text=Cepea%2C%2010%2F05%2F2023,participa%C3%A7%C3%A3o%20era%20de%20apenas%209%25.> Acesso em 25 de abril de 2023</a></p>
</div>
<div data-bbox=)

CHEN, Y.; WANG, D. Two convenient methods to evaluate soybean for resistance to Sclerotinia sclerotiorum. Plant Disease, v. 89, n. 12, p. 1268-1272, 2005.

CHENG, Yunqing *et al.* Dual RNA sequencing analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* and Sclerotinia sclerotiorum during infection of soybean seedlings by *S. sclerotiorum* unveils antagonistic interactions. Frontiers in Microbiology, v. 13, 2022.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos, Brasília, DF, v. 10, safra 2022/23, n. 9 nono levantamento, junho 2023.

CRUCIOL, Giovana Carolina Dourado; COSTA, Maria Luiza Nunes. Influência de metodologias de inoculação de Macrophomina phaseolina no desempenho de cultivares de soja. Summa Phytopathologica, v. 44, p. 32-37, 2018.

CUNHA, Welcimar Gonçalves da. Resistência a Sclerotinia sclerotiorum em plantas de soja geneticamente modificadas para expressar o gene da oxalato descarboxilase de Flammulina velutipes. 2010.

DA SILVA, Lincon Rafael et al. *Sclerotium rolfsii* mycelial profile analysis by MALDI-TOF related to biological control, volatile organic compounds diversity and onion growth promotion, as influenced by *Trichoderma* spp. *Biological Control*, v. 172, p. 104970, 2022.

DIBELLI, Sabrina Custodio. Evidenciação de múltiplos traços de promoção de crescimento vegetal em isolados de comunidades bacterianas associadas a cana-de-açúcar. 2023.

EHLER, Lester E. Integrated pest management (IPM): definition, historical development and implementation, and the other IPM. *Pest management science*, v. 62, n. 9, p. 787-789, 2006.

FANG, W. E. I. et al. Transgenic *Arabidopsis thaliana* expressing a wheat oxalate oxidase exhibits hydrogen peroxide related defense response. *Journal of Integrative Agriculture*, v. 14, n. 12, p. 2565-2573, 2015.

FARZAND, Ayaz et al. Transcriptional profiling of diffusible lipopeptides and fungal virulence genes during *Bacillus amyloliquefaciens* EZ1509-mediated suppression of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathology*, v. 110, n. 2, p. 317-326, 2020.

FERREIRA, Ana Carolina Almeida et al. ATUALIZAÇÕES NAS RECOMENDAÇÕES E SUCESSO DO MANEJO DE MOFO BRANCO EM SOJA NA REGIÃO DE RIO VERDE–GO. 2023.

FRANÇA, Sueny Kelly Santos de et al. Quantification and conceptual validation of the inoculum potential of *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean and bean seeds. *Journal of Seed Science*, v. 43, 2021.

GARCIA, Riccely Ávila et al. Métodos de inoculação de *Sclerotinia sclerotiorum* para triagem de cultivares de soja resistentes ao Mofo-branco. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 50, p. 726-729, 2015.

GIORGIO, Annalisa et al. Biocide effects of volatile organic compounds produced by potential biocontrol rhizobacteria on *Sclerotinia sclerotiorum*. *Frontiers in microbiology*, v. 6, p. 1056, 2015.

GOMASHE, A. V.; GULHANE, P. A.; BEZALWAR, P. M. Isolation and screening of cellulose degrading microbes from nagpur region soil. *Int. J. of Life Sciences*, v. 1, n. 4, p. 291-293, 2013.

GOUSSOUS, Saba J. et al. Biological control of stem rot, *Sclerotinia sclerotiorum* by indigenous *Bacillus subtilis* isolates. *Fresen Environ Bull*, v. 28, n. 12, p. 9517-9525, 2019.

HACKENSCHMIDT, Silke et al. Enhancement of Promiscuous Amidase Activity of a *Bacillus subtilis* Esterase by Formation of a  $\pi$ - $\pi$  Network. *ChemCatChem*, v. 6, n. 4, p. 1015-1020, 2014.

HARWOOD, Colin R. *et al.* Secondary metabolite production and the safety of industrially important members of the *Bacillus subtilis* group. *FEMS microbiology reviews*, v. 42, n. 6, p. 721-738, 2018.

HAZARIKA, Dibya Jyoti *et al.* Lipopeptide mediated biocontrol activity of endophytic *Bacillus subtilis* against fungal phytopathogens. *BMC microbiology*, v. 19, n. 1, p. 1-13, 2019.

Jl, Seung Hyun *et al.* Biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* CNU114001 against fungal plant diseases. *Mycobiology*, v. 41, n. 4, p. 234-242, 2013.

LI, Hui *et al.* Endophytic *Bacillus subtilis* ZZ120 and its potential application in control of replant diseases. *African Journal of Biotechnology*, v. 11, n. 1, p. 231-242, 2012.

LI, Qian *et al.* Biofumigation on post-harvest diseases of fruits using a new volatile-producing fungus of *Ceratocystis fimbriata*. *PLoS One*, v. 10, n. 7, p. e0132009, 2015.

LIANG, Xiaofei; ROLLINS, Jeffrey A. Mechanisms of broad host range necrotrophic pathogenesis in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathology*, v. 108, n. 10, p. 1128-1140, 2018.

MEYER, Maurício C. *et al.* Eficiência de fungicidas para controle de mofo-branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) em soja, na safra 2017/18: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. Londrina: Embrapa Soja, 2018.

MEYER, Maurício C; AGR, Eng; SC, D; *et al.* Eficiência de fungicidas para controle de mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) em soja, na safra 2020 / 2021 – resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. n. Julho, 2021.

NOBLE, R.; COVENTRY, E. Suppression of soil-borne plant diseases with composts: a review. *Biocontrol science and technology*, v. 15, n. 1, p. 3-20, 2005.

NOGUEIRA, Geovane de Almeida *et al.* Métodos de inoculação de *Fusarium solani* e *Sclerotium rolfsii* em meloeiro. *Summa Phytopathologica*, v. 45, p. 59-63, 2019.

PARRA, José Roberto P. *et al.* Controle biológico: terminologia. Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores. São Paulo: Manole, p. 1-16, 2002.

PEREIRA, Priscila Monteiro. *Streptomyces* spp. e seus metabólitos com atividade antifúngica para controle biológico de *Pyrenophora tritici-repentis* e promoção de crescimento de plantas de trigo. 2023.

PERNEEL, Maaïke *et al.* Characterization of CMR5c and CMR12a, novel fluorescent *Pseudomonas* strains from the cocoyam rhizosphere with biocontrol activity. *Journal of applied microbiology*, v. 103, n. 4, p. 1007-1020, 2007.

RAHMAN, Md Muzahid E. *et al.* Suppressive effects of *Bacillus* spp. on mycelia, apothecia and sclerotia formation of *Sclerotinia sclerotiorum* and potential as biological control of white mold on mustard. *Australasian Plant Pathology*, v. 45, p. 103-117, 2016.

RISSATO, Bruna Broti *et al.* Atividade *in vitro* sobre *Sclerotinia sclerotiorum*, indução em mecanismos bioquímicos de defesa e controle de mofo branco em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) por soluções homeopáticas. 2017.

RODRIGUES, Gabriel de Oliveira. Análise do complexo soja no Brasil a partir de índices de desempenho no período de 2000 à 2020. 2023.

SABATÉ, Daniela C.; BRANDAN, Carolina Pérez; PETROSELLI, Gabriela; *et al.* Biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary on common bean by native lipopeptide-producer *Bacillus* strains. *Microbiological Research*, v. 211, n. April, p. 21–30, 2018.

SAGATA, Érika *et al.* Métodos de inoculação e avaliação da resistência de genótipos de soja à *Sclerotinia sclerotiorum*. 2010.

SALWAN, Richa; SHARMA, Vivek. Genome wide underpinning of antagonistic and plant beneficial attributes of *Bacillus* sp. SBA12. *Genomics*, v. 112, n. 4, p. 2894– 2902, 2020.

SCHMOLLER, ISABELA. Biocontrole com *Trichoderma* e *Bacillus* à *Sclerotinia sclerotiorum* na cultura da soja. p. 1–43, 2021. SMOLIŃSKA, Urszula; KOWALSKA, Beata. Smolińska-Kowalska2018\_Article\_BiologicalControlOfTheSoil-bor.pdf. *Journal of Plant Pathology*, p. 1–12, 2018.

SCHÜNEMANN, Rogério *et al.* Insecticidal potential of *Bacillus thuringiensis* for the biological control of neotropical brown stink bug. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, v. 166, n. 2, p. 131-138, 2018.

SILVA, Munique Cristiane Tavares Santos; FERNANDES, Lúgia Maria Gonçalves; FIGUEIREDO, Ana Lúcia. EFEITOS ANTAGÔNICOS DE BACTÉRIAS DO GÊNERO *BACILLUS* NO CONTROLE BIOLÓGICO DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS.

SOUZA, Ricardo Douglas de; MENDONÇA, Elisabeth Aparecida Furtado de; SOARES, Marcos Antônio. Antagonistic activity to pathogenic microorganisms by endophytic bacteria isolated from *Echinodorus scaber* Rataj. *Summa Phytopathologica*, v. 41, p. 229-232, 2015.

STENBERG, Johan A. *et al.* When is it biological control? A framework of definitions, mechanisms, and classifications. *Journal of Pest Science*, v. 94, n. 3, p. 665-676, 2021.

VILLARREAL-DELGADO, María Fernanda *et al.* *Bacillus* sp. FSQ1: a Promising Biological Control Agent Against *Sclerotinia sclerotiorum*, the Causal Agent of

white Mold in Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Biology Bulletin*, v. 48, n. 6, p. 729-739, 2021.

WANG, Jian *et al.* Cerecidins, novel lantibiotics from *Bacillus cereus* with potent antimicrobial activity. *Applied and environmental microbiology*, v. 80, n. 8, p. 2633-2643, 2014.

WEISSKOPF, Laure. The potential of bacterial volatiles for crop protection against phytopathogenic fungi. *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*, v. 2, p. 1352-63, 2013.

XU, Liangsheng *et al.* pH dependency of sclerotial development and pathogenicity revealed by using genetically defined oxalate-minus mutants of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Environmental Microbiology*, v. 17, n. 8, p. 2896-2909, 2015.

ZHOU, Yingjun *et al.* Uncovering the biocontrol mechanism of *Bacillus subtilis* YPS-32 antagonism of *Streptomyces scabies* infection through transcriptome and proteome analysis. 2023.