http://journal.unoeste.br/index.php/ca/index
DOI: 10.5747/ca.2020.v16.n4.a388
ISSN on-line 1809-8215

Colloquium Agrariae

Submetido: 19/03/2020 Revisado: 25/05/2020 Aceito:25/05/2020

Rizobactérias no controle de *Sclerotinia sclerotiorum*, e efeitos no desenvolvimento vegetativo de plântulas de soja

Renata Silva Canuto de Pinho, Bruna Canabarro Pozzebon, Ketlen Raisa Rey Rodrigues, Renata Bolacel Arns, Cezario Almeida Alves, Mireli Duarte Bergmann

Universidade Federal do Pampa – UNIPAMPA, Campus Itaqui, RS. E-mail: bcpozzebon@gmail.com

Resumo

Sclerotinia sclerotiorum é um dos principais patógenos da cultura da soja, reduzindo o potencial produtivo da cultura e causando perdas de até 37%. Por ser habitante de solo, seu manejo é difícil. Porém, a adoção de métodos alternativos, como o uso de antagonistas, pode auxiliar na redução do inóculo do patógeno. Assim, objetivou-se com esse trabalho, selecionar rizobactérias autóctones de soja e verificar o potencial de antagonismo *in vitro* frente à *Sclerotinia sclerotiorum*, bem como o efeito desses isolados na germinação e desenvolvimento vegetativo de plântulas de soja. Para isso, foram conduzidos testes de inibição e índice de velocidade do crescimento micelial, produção de compostos voláteis, produção de metabólitos rizobacterianos e desenvolvimento vegetativo de plântulas de soja. Com relação ao antagonismo, os isolados I1, U4, M6, U13 e M8, foram os mais eficazes. Para a produção de compostos voláteis pelo método de placas sobrepostas, os isolados M8, M10, M9, I1, M6 e U4 tiveram as maiores reduções do crescimento micelial do patógeno. Já para a capacidade dos isolados de produzir metabólitos hidrossolúveis em meio de cultura, verificou-se que os isolados I1, M3, M6 e U13 foram os mais eficazes. Para o desenvolvimento vegetativo de plântulas de soja, com exceção para o comprimento de raízes, em que os isolados M8, I14, M9, I1, M6 e M10 proporcionaram os maiores incrementos no tamanho da raiz, as demais variáveis não apresentaram incrementos significativos quando comparadas com a testemunha. De maneira geral, os isolados M8, M10, M9, I1, M6 e U4 são eficazes na inibição do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum*, produzem compostos orgânicos voláteis que ajudam no controle do patógeno, entretanto, não apresentam incrementos significativos no desenvolvimento vegetativo de plântulas de soja.

Palavras-chave: antagonismo; bactérias benéficas; controle biológico; Podridão de esclerotinea, *Glycine max.*

Rhizobacteria in the control of *Sclerotinia sclerotiorum*, and vegetative development effects of soybean seddlings

Abstract

Sclerotinia sclerotiorum is one of the main pathogens of soybean crop, reducing crop yield potential and causing losses of up to 37%. Because it is a soil inhabitant, its management is difficult. However, the adoption of alternative methods, such as the use of antagonists, may help reduce the pathogen inoculum. Thus, the objective of this work was to select native soybean rhizobacteria and to verify the potential of *in vitro* antagonism against *Sclerotinia sclerotiorum*, as well as the effect of these isolates on the germination and vegetative development of soybean seedlings. For this, tests of inhibition and mycelial growth rate index, production of volatile compounds, production of rhizobacterial metabolites and vegetative development of soybean seedlings were conducted. With respect to antagonism, I1, U4, M6, M8 and U13 isolates were the most effective. For the production of volatile compounds by the overlapping plate method, isolates M8, M10, M9, I1, M6 and U4 had the largest reductions in pathogen mycelial growth. For the ability of isolates to produce water-soluble metabolites in culture medium, it was found that isolates I1, M3, M6 and U13 were the most effective. For the vegetative development of soybean seedlings, except for the root length, in which the isolates M8, I14, M9, I1, M6 and M10 provided the largest increases in root size, the other variables did not show significant increases when compared with the witness. In general,

isolates M8, M10, M9, I1, M6 and U4 are effective in inhibiting mycelial growth of *Sclerotinia sclerotiorum*, produce volatile organic compounds that help control the pathogen, however, they do not show significant increases in the vegetative development of soybean seedlings.
Keywords: antagonism; beneficial bacteria; biological control; Sclerotinia stem rot; *Glycine max.*

Introdução

O fungo *Sclerotinia sclerotiorum* [(Lib.) de Bary 1884], agente causal do mofo branco da soja, é um patógeno de solo, necrotrófico e cosmopolita, capaz de infectar mais de 400 espécies de plantas. Além disso, pode se associar às sementes na forma de micélio dormente ou escleródios, reduzindo drasticamente o potencial germinativo, o vigor e a emergência de plântulas no campo, bem como pode deteriorar as sementes (HENNENBERG *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2017). As perdas com a presença do patógeno no solo podem chegar a 30%, com redução da produção de 37% se considerarmos uma incidência de 50% no campo (FURLAN, 2015). No Brasil, as epidemias de mofo branco estão amplamente distribuídas em várias regiões produtoras, estimando-se que aproximadamente 23% da área cultivada de soja e 100% da área irrigada por pivô central, estejam contaminadas pela presença de escleródios do patógeno (MEYER *et al.*, 2014).

Solos altamente infestados podem comprometer cultivos futuros, pois uma vez introduzido na lavoura, é um patógeno de difícil manejo, devido à produção constante de escleródios a cada ciclo da cultura, capazes de se manter no solo por longos períodos de tempo. Adicionalmente, não se degradam facilmente, em função da presença de melanina que tornam as estruturas rígidas e, principalmente, pela dificuldade dos fungicidas em atingir os sítios de infecção (HENNING, 2009; MARCUZZO; SCHULLER, 2014; SUMIDA *et al.*, 2015).

A doença se manifesta em qualquer parte da planta, tendo início, normalmente, pelas partes mais próximas ao solo, formando manchas de anasarca nos tecidos, que evoluem para coloração castanho-clara, com abundante formação de micélio cotonoso de coloração branca e formação de escleródios (GODOY *et al.*, 2016). O patógeno é disseminado principalmente por sementes e maquinários infestados (CARDOSO *et al.*, 2015; TUPICH *et al.*, 2017).

O alto potencial destrutivo do mofo branco na cultura da soja torna obrigatória a adoção de medidas integradas de manejo (MID), com o objetivo de garantir a sustentabilidade da produção. Diante disso, o controle da doença pode ser mais eficaz por meio da integração de métodos convencionais e alternativos de manejo, como a rotação de culturas, manutenção de cobertura morta, uso de indutores de resistência, controle químico e controle biológico (SUMIDA *et al.*, 2015). No entanto, não existem cultivares resistentes à doença, impossibilitando dessa forma, o controle genético (GÖRGEN *et al.*, 2009).

Diante da dificuldade de obtenção de uma cultivar que apresente resistência durável, para o controle do mofo branco, e devido à alta taxa de progresso da doença, potencial destrutivo do patógeno e permanência das estruturas de resistência no solo por longos períodos de tempo, o principal método de controle da doença ainda é o uso de defensivos químicos para a obtenção de níveis competitivos de produtividade. Para isso, recomenda-se, de maneira geral, o tratamento de sementes e a aplicação preventiva de fungicidas foliares, no período de maior vulnerabilidade da soja, que compreende o início da floração ou fechamento das entrelinhas até o início de formação de vagens (MEYER *et al.*, 2017). Contudo, o incremento dos custos com o controle químico, a perda de eficiência de alguns defensivos, devido à resistência dos organismos alvos, além dos problemas advindos dessas práticas indicam a necessidade da busca de produtos biocompatíveis para o controle de fitopatógenos (GÖRGEN *et al.*, 2009).

Diante disso, torna-se necessário aumentar estudos e recursos dedicados a métodos de controle alternativos no país visando meios de sustentabilidade ambiental e social para a agricultura. O uso de antagonistas aplicados às sementes pode auxiliar na redução do inóculo de *S. sclerotiorum* (GÖRGEN *et al.*, 2009). Nesse contexto, bactérias promotoras de crescimento de plantas (*Plant Growth-Promoting Rhizobacteria* – PGPR) podem atuar como agentes de controle biológico, uma vez que induzem resistência sistêmica em plantas,

produzem antibióticos e sideróforos que inibem o crescimento de patógenos (RAMAMOORTHY *et al.*, 2001). Todavia, antes que um microrganismo chegue de fato a se tornar um produto biológico, são necessários inúmeros testes, como a bioprospecção e seleção *in vitro* dos melhores isolados.

Com base no exposto, torna-se necessário a realização de testes que visem selecionar microrganismos benéficos eficazes no controle de *S. sclerotiorum*, e que, consequentemente, não causem danos às sementes de soja. Dessa forma, objetivou-se com esse trabalho, selecionar rizobactérias autóctones de soja e verificar o potencial de antagonismo *in vitro* frente à *Sclerotinia sclerotiorum*, bem como o efeito desses isolados na germinação e desenvolvimento vegetativo de plântulas de soja.

Material e Métodos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia e Microbiologia do Solo da Universidade Federal do Pampa/Campus Itaqui. O isolado de *Sclerotinia sclerotiorum* foi proveniente da micoteca do Laboratório de Fitopatologia e Microbiologia do Solo da Unipampa/Campus Itaqui. O delineamento experimental utilizado para todos os testes foi o inteiramente casualizado (DIC), com quatro repetições para cada tratamento.

Ao todo, foram isoladas 46 rizobactérias, oriundas de raízes de soja, coletadas de três diferentes locais do estado do Rio Grande do Sul. Destas, 18 foram isoladas de plantas coletadas em Itaqui/RS, 13 de plantas coletadas em Maçambará/RS e 16 de plantas coletadas em Uruguaiana/RS. Para isso, a parte aérea das plantas foi descartada e as raízes foram ligeiramente separadas do solo e cortadas em fragmentos de aproximadamente 5 cm. Posteriormente, foram pesados 10 g de cada amostra, e diluídos em 100 mL de solução salina de NaCl 0,85%. A suspensão foi mantida em agitação contínua em Shaker, sob temperatura ambiente, durante 30 minutos a 140 rpm, a fim de que as bactérias migrassem da rizosfera para a solução salina.

Em seguida, realizou-se uma diluição em série de cada amostra em solução salina de NaCl 0,85%, com fator de diluição 1:10, até 10^{-4} (ROMEIRO, 2007). Alíquotas de 0,1 mL dessa suspensão foram semeadas em placas de Petri contendo meio de cultura 523 de Kado e Heskett (1970). As placas foram incubadas em câmara de crescimento tipo BOD, a 28 °C por 24 h para crescimento das colônias bacterianas. Após esse período, as colônias que apresentaram coloração e morfologia distintas, foram repicadas para tubos inclinados contendo meio 523, para uso na rotina dos testes (OOSTENDORP; SIKORA, 1989, com adaptações).

Para fins de identificação, foi realizada a caracterização morfológica dos isolados, através da observação da coloração, forma, superfície (lisa ou rugosa) e brilho (brilhante, opaca ou translúcida) da colônia e alteração da cor do meio (PINHO *et al.*, 2019). Procedeu-se também ao teste de Gram, através da solubilidade da parede celular da bactéria em Hidróxido de Potássio 3% (KOH-3%) (RYU, 1938).

Após a obtenção e caracterização dos isolados, foi realizado o teste de inibição do crescimento micelial *in vitro* de *S. sclerotiorum*, conforme a metodologia do pareamento de culturas não-quantitativo, proposta por Filippi *et al.* (2011). Para isso, foi transferido um disco de micélio do patógeno de 0,5 cm de diâmetro, para o centro das placas de Petri contendo meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA). Em seguida, as rizobactérias foram repicadas nos quatro extremos da placa de Petri, formando um quadrado no entorno do disco de micélio. Por fim, as placas foram incubadas em BOD, a 25 °C e fotoperíodo de 12 h. Como controle, utilizou-se placas de Petri contendo apenas o disco de micélio de *S. sclerotiorum* no centro do meio de cultura.

Finalmente, avaliou-se o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) de *S. sclerotiorum* e a porcentagem de redução do índice de velocidade de crescimento micelial, através da mensuração diária do crescimento vegetativo do patógeno, nos sentidos vertical e horizontal da placa, a cada 24 h. A última avaliação foi realizada quando o tratamento controle atingiu a borda da placa de Petri (FILIPPI *et al.*, 2011). Os dados obtidos foram utilizados no cálculo do IVCM, através da fórmula: IVCM = Σ (D-Da)/N, onde IVCM = índice de velocidade de crescimento micelial; D = diâmetro médio atual da colônia; Da = diâmetro médio da colônia do dia anterior; N = número de dias após a inoculação (MAIA *et al.*, 2011). Já o percentual de inibição de crescimento micelial foi calculado pela fórmula % inibição = 100 – (CM x 100/T); CM = diâmetro da colônia; T = diâmetro da colônia do tratamento controle (PINHO *et al.*, 2019).

Os 10 isolados mais promissores, obtidos no teste de pareamento de culturas, foram submetidos a testes de produção de compostos orgânicos voláteis e metabólitos hidrossolúveis, assim como seus efeitos sobre o crescimento micelial do fungo. A fim de verificar a capacidade de produção de substancias voláteis dessas rizobactérias, realizou-se o método de placas invertidas e sobrepostas (DICK; HUTCHINSON, 1996). Para isso, os isolados foram repicados para meio de cultura 523 líquido, e foram mantidos sob agitação em Shaker durante 24 h a 120 rpm e temperatura de 28 °C. Decorrido o período de agitação, sob meio de cultura 523 sólido foi adicionado 0,1 mL de suspensão rizobacteriana, que foi espalhada, homogeneamente, com alça de Drigalski sobre o meio de cultura. Já para o patógeno, procedeu-se a repicagem de um disco de 0,5 mm de diâmetro contendo micélio, que foi transferido para o centro de placas de Petri contendo meio de cultura BDA.

Para formar a sobreposição das placas, estas foram colocadas uma sobre a outra, de maneira que a placa contendo a suspensão da rizobactéria ficasse abaixo da placa contendo o disco de micélio do fungo. Para união das placas e para que os metabólitos não escapassem do interior das placas, as mesmas foram vedadas com filme de PVC, e incubadas em câmara de crescimento tipo BOD a 25 °C, até que o crescimento da testemunha atingisse a borda da placa. A testemunha constou de uma placa com meio BDA, contendo disco de 0,5 mm de diâmetro do fungo, sobreposta a uma placa contendo apenas meio de cultura 523. A avaliação constou da mensuração diária do crescimento micelial do patógeno, no sentido vertical e horizontal da placa. O IVCM foi calculado pela fórmula proposta por Maia *et al.* (2011).

Já para análise dos metabólitos hidrossolúveis sobre o crescimento micelial, foi realizado o teste de produção de metabólitos rizobacterianos (ROMEIRO, 2007). Para isso, as rizobactérias foram repicadas para 100 mL de meio de cultura 523 líquido e agitadas em Shaker por 24 h, a 120 rpm e 28 °C para crescimento. Posteriormente, os frascos contendo os meios de cultura com crescimento das bactérias foram autoclavados, por 20 min a 121 °C, para garantir que os isolados sucumbissem, e no meio de cultura ficassem apenas os metabólitos secundários produzidos. Após o resfriamento, foram adicionados 10 mL da suspensão bacteriana autoclavada a 90 mL de meio de cultura BDA. Em seguida, o meio foi homogeneizado manualmente, e vertido em placas de Petri. Após a solidificação do meio contendo os prováveis metabólitos, foi repicado no centro da placa, um disco de 0,5 mm de diâmetro, contendo as estruturas vegetativas do patógeno. Diariamente, mensurou-se o crescimento do patógeno no sentido vertical e horizontal da placa, até que a testemunha (fungo repicado em meio de cultura sem suspensão bacteriana) atingisse a borda da placa. Para avaliação, também foi calculado o IVCM segundo Maia *et al.* (2011).

Após verificar o potencial de antagonismo e produção de compostos voláteis, foram realizados testes para avaliar o desenvolvimento vegetativo de plântulas de soja, para verificar o potencial dos isolados em propiciar incrementos no desenvolvimento de plantas de soja, em condições de casa de vegetação. Para isso, sementes de soja da cultivar Ponta 7166RSF IPRO foram tratadas com a suspensão bacteriana dos isolados. Para o tratamento, inicialmente, os isolados foram crescidos em meio 523, a 28 °C por 24 h, e em seguida, postos em suspensão. O preparo das suspensões constou da adição de solução salina de NaCl 0,85% às colônias, que foram então raspadas com alça de Drigalski, até a obtenção de uma suspensão homogênea de células e ajustadas em espectrofotômetro para OD_{540}=0,5 (PINHO *et al.*, 2019).

Posteriormente, as sementes de soja foram desinfestadas superficialmente através da tríplice lavagem (30 segundos em álcool 70%, 1 minuto em hipoclorito de sódio 1% e três lavagens em água destilada e esterilizada), imersas na suspensão de cada isolado, e agitadas em Shaker a 140 rpm e 28 °C, durante cinco minutos (BEZERRA *et al.*, 2013, com adaptações). Para a testemunha, sementes de soja da mesma cultivar foram imersas apenas em solução salina de NaCl 0,85%.

Após o tratamento, foram semeadas três sementes de cada tratamento, em copos plásticos de 400 mL, contendo substrato comercial. Foi avaliado o índice de velocidade de germinação em solo (IVG) até a emergência de todas as sementes na testemunha. Após 55 dias da semeadura, avaliou-se a altura de plantas (cm), número de folhas (NF) e matéria seca de parte aérea (MSPA) e raiz (MSR). Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância,

e as médias, quando significativas pelo *teste F*, agrupadas pelo Teste de Scott-Knott (*P≤0,05*) no *software* Sisvar, versão 5.6 (FERREIRA, 2011).

Resultados e Discussão

A caracterização morfológica apresentou como características principais, colônias de coloração creme claro, brilho opaco, e nenhuma alteração da cor do meio de cultura 523. A superfície das colônias apresentou forma lisa ou rugosa, com bordas circulares (para colônias lisas) ou irregulares (para colônias rugosas). O teste de solubilidade em KOH a 3% mostrou que não houve aumento da viscosidade para nenhum dos isolados testados, confirmando que todas as rizobactérias são Gram-positivas. Segundo Zarpelon (2007), de acordo com essas características, essas bactérias podem ser identificadas em nível de gênero como *Bacillus* spp. Além disso, Rebière (2015), verificou que a identificação de bactérias do gênero *Bacillus* spp., por características fenotípicas corroboram com os resultados obtidos pela analise de sequencias do gene 16S rDNA. Bactérias do gênero *Bacillus* já são amplamente estudadas como agentes de controle biológico, devido à sua atividade antagônica de amplo espectro contra fungos e bactérias, pela alta capacidade de produção de endósporos e resistência a condições desfavoráveis do ambiente e hospedeiro em razão da produção de endósporos (FERRAZ *et al.*, 2015; FOUSIA *et al.*, 2015).

Com relação ao antagonismo *in vitro*, 11% dos isolados apresentaram potencial de redução do IVCM e redução no crescimento micelial de *S. sclerotiorum*. Desses, os isolados I1, U4, M6, U13 e M8, foram os mais eficazes, apresentando reduções do crescimento micelial do patógeno em torno de 89,1, 70,9, 70,6, 66,0 e 64,2%, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1. Efeito antagônico de rizobactérias no índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e porcentagem de redução do IVCM de *Sclerotinia sclerotiorum, in vitro.*

Tratamento	IVCM	% de redução do IVCM	Tratamento	IVCM	% de redução do IVCM
I1	0,29 a*	89,1	U5	2,16 c*	18,5
U4	0,77 a	70,9	I10	2,16 c	18,5
M6	0,78 a	70,6	M7	2,17 c	18,1
U13	0,90 a	66,0	I12	2,18 c	17,7
M8	0,95 a	64,2	I18	2,18 c	17,7
I14	1,15 b	56,6	U10	2,19 c	17,4
M3	1,30 b	50,9	M1	2,20 c	17,0
I16	1,34 b	49,4	U9	2,21 c	16,6
M9	1,38 b	47,9	I7	2,23 c	15,9
M10	1,44 b	45,7	I9	2,25 c	15,1
I3	1,60 b	39,6	U3	2,27 c	14,3
M13	1,69 c	36,2	M4	2,29 c	13,6
I13	1,79 c	32,5	M11	2,30 c	13,2
U11	1,94 c	26,8	I5	2,35 c	11,3
I4	1,99 c	24,9	U8	2,37 c	10,6
I8	1,99 c	24,9	M12	2,51 c	5,3
U6	2,02 c	23,8	M5	2,55 c	3,8
I11	2,02 c	23,8	U12	2,58 c	2,6
I6	2,06 c	22,3	M2	2,58 c	2,6
I17	2,06 c	22,3	U1	2,60 c	1,9
U14	2,07 c	21,9	I15	2,61 c	1,5
U15	2,10 c	20,8	Testemunha	2,65 c	---
U7	2,10 c	20,8	I2	2,75 c	---
U2	2,11 c	20,4			
CV (%)	**17,77**	**---**		**17,77**	**---**

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna, pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott (*P≤0,05*).

Vários trabalhos têm demonstrado o potencial de rizobactérias no controle *in vitro* de fungos como *Pyricularia grisea* (PINHO *et al.*, 2019), *Fusarium subglutinans*, *Curvularia lunata* e

Bipolaris spp. (BRAGA JUNIOR *et al.*, 2017), *Fusarium solani* e *Sclerotinia sclerotiorum* (DURÉ *et al.*, 2018). Os resultados obtidos no teste de pareamento de culturas corroboram com os obtidos por Duré *et al.* (2018), que encontraram três isolados rizobacterianos eficazes na inibição do crescimento micelial de *S. sclerotiorum*. Shiomi *et al.* (2017), também verificaram que ao confrontar bactérias benéficas com *S. sclerotiorum*, em condições *in vitro*, três isolados inibiram o crescimento micelial do patógeno entre 31,0 e 46,0%. Isso possivelmente ocorre porque a ação de bactérias benéficas sobre patógenos ocorre por diferentes mecanismos de controle biológico, como a síntese de compostos voláteis, metabólitos secundários, ácido cianídrico e antibióticos, que podem atuar sobre o patógeno de forma isolada ou em conjunto, e tais mecanismos têm demonstrado eficiência em inibir o crescimento de fungos fitopatogênicos em condições *in vitro* (LIMA *et al.*, 2014; PINHO *et al.*, 2019).

Para realizar a avaliação da produção de compostos voláteis e de metabólitos hidrossolúveis, foram escolhidos os 10 isolados que obtiveram os resultados mais promissores no teste de redução do crescimento micelial de *S.sclerotiorum* pelo método de pareamento de culturas (Tabela1). Ao avaliar o efeito das 10 rizobactérias selecionadas, verificou-se que todos os isolados reduziram de alguma forma o crescimento micelial de *S. sclerotiorum* através da produção de compostos voláteis pelo método de placas sobrepostas e produziram metabólitos hidrossolúveis em meio de cultura, pelo método de diluição da suspensão bacteriana em meio de cultura (Tabela 2).

Com relação à produção de compostos voláteis, pelo método de placas sobrepostas, os isolados M8, M10, M9, I1, M6 e U4 foram os mais eficazes, reduzindo o crescimento micelial de *S. sclerotiorum* em 100,0, 100,0, 100,0, 99,2, 99,1 e 98,5%, quando comparados com a testemunha que foi capaz de crescer e se desenvolver por todo o meio de cultura. Ainda, ao analisar a Tabela 2, é possível verificar que os isolados M8, M10 e M9 inibiram em 100,0% o IVCM do patógeno através da produção de compostos voláteis. É importante ressaltar que para esse ensaio, não houve contato entre os microrganismos benéficos e fitopatogênicos, comprovando então que o efeito inibitório foi decorrente da produção de compostos voláteis pelas rizobactérias. Já quando se avaliou a capacidade dos isolados de produzir metabólitos hidrossolúveis em meio de cultura BDA, pelo método da diluição da suspensão bacteriana no meio de cultura BDA, foi possível verificar que os isolados I1, M3, M6 e U13 foram os mais eficazes, reduzindo o IVCM em 93,8, 93,2, 89,8 e 88,7%, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2. Efeito da produção de compostos voláteis pelo método de placas sobrepostas sobre o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e efeito da produção de metabólitos hidrossolúveis em meio de cultura sobre o IVCM de *Sclerotinia sclerotiorum*.

Tratamentos	Compostos voláteis sobre o IVCM	Redução do IVCM por compostos voláteis (%)	Metabólitos hidrossolúveis sobre o IVCM	Redução do IVCM por metabólitos hidrossolúveis (%)
M8	0,00 a*	100,0	0,72 c*	59,3
M10	0,00 a	100,0	0,25 b	85,9
M9	0,00 a	100,0	0,38 b	78,5
I1	0,02 a	99,2	0,11 a	93,8
M6	0,03 a	99,1	0,18 a	89,8
U4	0,05 a	98,5	0,30 b	83,1
U13	0,08 b	97,5	0,20 a	88,7
I16	0,10 b	96,9	0,96 d	45,8
M3	0,12 b	96,3	0,12 a	93,2
I14	0,23 c	92,9	0,89 d	49,7
Testemunha	3,25 d	---	1,77 e	---
CV (%)	**21,2**		**26,4**	

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna, pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott (*P≤0,05*).

Já é conhecido que espécies bacterianas apresentam extraordinária capacidade de produzir compostos orgânicos voláteis, que podem ter atividades fungicida e/ou fungistática, bactericida e nematicida (SILVA *et al.*, 2019). Giorgio *et al.* (2015), através de ensaios *in vitro*, mostraram que voláteis bacterianos são capazes de inibir o crescimento de fungos. No estudo conduzido por esses autores, os compostos voláteis produzidos por um isolado de *Pseudomonas* spp. impediu a germinação de escleródios, e os compostos voláteis produzidos por um isolado de *Bacillus* spp. reduziu em cerca de 40,0% o desenvolvimento micelial do patógeno. Ainda, conforme esses autores, o ácido acético e a 2-nonanona foram os compostos voláteis mais ativos na redução do crescimento micelial do fungo, mas também foram produzidos 1-undeceno, 2-undecanona, m-cimeno e dl-limoneno.

Conforme Popova *et al.* (2014), o efeito causado pela produção de compostos voláteis bacterianos pode desempenhar papel central na interação entre organismos que vivem no mesmo nicho ecológico. Isso contribuiria de forma direta para o controle de um microrganismo fitopatogênico. Além disso, os compostos orgânicos voláteis podem afetar diretamente o patógeno, através de alterações na membrana plasmática por atividades hemolíticas e alterações de membranas, alterações ultraestruturais nas organelas e hifas devido à perda da integridade das membranas celulares e à consequente alteração da permeabilidade celular, podendo também ocorrer hipertrofia das mitocôndrias indicando o aumento das necessidades respiratórias como resultado da ação tóxica dos voláteis bacterianos (GIORGIO *et al.*, 2015).

Ao analisar o efeito dos 10 isolados rizobacterianos na germinação e desenvolvimento vegetativo de plântulas de soja, foi possível verificar que para o índice de velocidade de germinação (IVG), os isolados I14 e I16 proporcionaram os menores incrementos para essa variável. Os demais isolados não diferiram da testemunha (Tabela 3).

Para as variáveis altura de plantas (cm), número de folhas (NF) e matéria seca da raiz (g) (MSR), não houve diferença entre os tratamentos com rizobactérias e a testemunha (Tabela 3). Já para o comprimento de raiz (CR) (cm), o isolado M8 promoveu incremento de 67,0% do comprimento da raiz, quando comparado à testemunha. Além disso, os isolados M10, M6, M9 e I14, também promoveram incrementos de 37,2, 24,7, 24,4 e 24,7%, respectivamente, no aumento do comprimento da raiz. Com relação à matéria seca da parte aérea (g) (MSPA), os isolados M6, M9, I4, M8 promoveram a redução da MFPA, enquanto os demais tratamentos não diferiram da testemunha (Tabela 3).

Tabela 3. Efeito de rizobactérias no Índice de velocidade de germinação (IVG) e porcentagem de germinação (% de germinação) e no desenvolvimento vegetativo de plântulas de soja em casa de vegetação. Parâmetros avaliados: Altura (cm), Comprimento da raiz (CR) (cm), Número de folhas (NF), matéria seca da parte aérea e raiz (MSPA, MSR) (g).

Tratamento	IVG	% germinação	Altura (cm)	CR (cm)	NF	MSPA (g)	MSR (g)
I16	2,06 b*	54,17 b*	48,11 ns**	0,155 d*	7,13 ns**	2,26 b*	0,51 ns**
U13	3,45 a	91,67 a	48,11	1,450 c	8,25	2,60 a	0,71
U4	3,55 a	83,33 a	51,39	1,325 c	8,00	2,74 a	0,85
M3	4,02 a	100,00 a	51,18	1,270 c	7,75	2,67 a	0,75
M10	3,14 a	66,67 b	56,50	1,942 b	8,50	2,64 a	0,68
M6	3,63 a	100,00 a	51,93	1,765 b	7,25	2,49 b	0,68
I1	3,21 a	83,33 a	51,00	1,325 c	7,25	2,69 a	0,70
M9	3,28 a	83,33 a	49,96	1,760 b	8,75	2,51 b	0,60
I14	1,70 b	41,67 b	46,25	1,765 b	7,75	2,37 b	0,63
M8	2,98 a	75,00 a	46,61	2,365 a	9,50	2,47 b	0,65
Testemunha	3,35 a	75,00 a	51,25	1,415 c	7,75	2,59 a	0,74
CV (%)	27,33	22,77	7,52	17,89	18,84	6,31	13,83

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna, pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott (*P≤0,05*); **ns: não significativo pelo teste de Scott-Knott (*P≤0,05*).

Microrganismos capazes de promover o desenvolvimento vegetativo de plântulas e plantas conferem vantagem adicional ao hospedeiro, pois auxiliam na defesa contra estresses físico-químicos (como salinidade), osmótico e metais pesados. Espécies do gênero *Bacillus* sp., tem sido relatadas como microrganismos capazes de aumentar substancialmente o crescimento e a produtividade de diversas culturas, devido à suas propriedades como biofertilizadores e biocontroladores naturais (KANG *et al*., 2015; CHOUDHARY *et al.*, 2016; SHAHZAD *et al.*, 2017). Entretanto, nesse estudo, com exceção para o comprimento de raízes, em que os isolados M8, I14, M9, I1, M6 e M10 proporcionaram os maiores incrementos no tamanho da raiz, as demais variáveis analisadas não apresentaram incrementos significativos no desenvolvimento vegetativo de plântulas de soja. Isso possivelmente ocorreu porque na fase inicial de interação entre a plântula e a rizobactéria, nem sempre ocorre o incremento na biomassa vegetal, pois a plântula pode estar gastando parte da sua energia para produzir substâncias que induzam o desenvolvimento das bactérias na rizosfera. Alguns autores relatam que além do fornecimento de substâncias nutritivas, as plantas podem ainda, fazer uma sinalização receptora aos microrganismos, por meio de secreções, que facilitam a colonização de grupos específicos de bactérias (COMPANT *et al.*, 2011; GIRI; DUDEJA, 2013; GARCIA *et al*., 2015). Esses fatores acarretam um gasto energético maior por parte da planta, devido à alteração da composição da rizosfera para um melhor desenvolvimento dos microrganismos, o que pode retardar o desenvolvimento vegetativo da plântula nessa fase inicial. Contudo, em fases posteriores, esse custo pode ser reduzido, principalmente se esses isolados forem eficazes também, no controle do patógeno, quando as plantas forem desafiadas com o fungo. Estudos baseados nessas perspectivas deverão ser conduzidos, viando verificar a eficácia das rizobactérias no controle do patógeno e incrementos no desenvolvimento da planta em condições de campo.

Conclusão

De maneira geral, os isolados rizobacterianos M8, M10, M9, I1, M6 e U4 são eficazes na inibição do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum*, produzem compostos orgânicos voláteis, que ajudam no controle do patógeno, entretanto, não apresentam incrementos significativos no desenvolvimento vegetativo de plântulas de soja.

Agradecimentos

Os autores agradem à Universidade Federal do Pampa pela estrutura e financiamento do estudo, aos integrantes do Laboratório de Fitopatologia e Microbiologia do Solo e ao Grupo de Estudos em Fitopatologia, pelo auxílio na condução dos experimentos.

Referências

BEZERRA, G. A.; MACEDO, D. A.; NASCIMENTO, I. O.; SOUSA, T. P.; COSTA, N. B.; SOUSA, L. F. R. A. Uso de *Bacillus* spp. no controle de fitopatógenos em sementes de soja variedade BRS Valiosa RR. **Agrossistemas**, v.5, n.1, p.68-73, 2013. http://dx.doi.org/10.18542/ragros.v5i1.1414.

BRAGA JUNIOR, G. M.; CHAGAS JUNIOR, A. F.; CHAGAS, L. F. B.; CARVALHO FILHO, M. R.; MILLER, L. O.; SANTOS, G. R. Controle biológico de fitopatógenos por *Bacillus subtilis in vitro*. **Biota Amazônia**, v.7, n.3, p.45-51, 2017. http://dx.doi.org/10.18561/2179-5746/biotaamazonia.v7n3p45-51

CARDOSO, S. S.; LOPES, M. C.; SILVA JÚNIOR, J. F.; BORGES, B. M. M. N. Eficiência de fungicidas no controle do mofo branco na cultura da soja. **Scientia Agraria Paranaensis**, v.14, n.1, p.49-52, 2015. http://dx.doi.org/10.1818/sap.v14i1.8869.

CHOUDHARY, D. K.; KASOTIA, A.; JAIN, S.; VAISHNAV, A.; KUMARI, S.; SHARMA, K. P.; VARMA, A. Bacterial-mediated tolerance and resistance to plants under abiotic and biotic stresses. **Journal of Plant Growth Regulation,** v.35, n.1, p.276–300, 2016. https://doi.org/10.1007/s00344-015-9521-x

COMPANT, S.; MITTER, B.; COLLI-MULL, J. G.; GANGL, H.; SESSITSCH, A. Endophytes of grapevine flowers, berries, and seeds: identification of cultivable bacteria, comparison with other plant parts, and visualization of niches of colonization. **Microbial Ecology**, v.62, p.188-197, 2011. https://doi.org/10.1007/s00248-011-9883-y

DICK, C. M.; HUTCHINSON, S. A. Biological control activity of volatile fungal metabolites. **Nature**, v.211, n.51, p. 868, 1966. https://doi.org/10.1038/211868a0

DURÉ, L. M. M.; ROCHA, L. R.; CAPURRO, E. J. D.; CORRÊA, B. O. Seleção e prospecção de rizobactérias para o controle biológico do mofo branco em espécies de *Crotalaria* spp. **Ensaios e Ciência**, v.22, n.2, p.90-96, 2018. http://dx.doi.org/10.17921/1415-6938.2018v22n2p90-96

FERRAZ, H.G.M.; RESENDE, R.S.; MOREIRA, P.C.; SILVEIRA, P.R.; MILAGRES, E.A.; OLIVEIRA, J.R.; RODRIGUES, F.Á. Antagonistic rhizobacteria and jasmonic acid induce resistance against tomato bacterial spot. **Bragantia**, v.74, p.417-427, 2015. http://dx.doi.org/10.1590/1678-4499.0074

FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia** v.35, p.1039-1042, 2011. http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542011000600001.

FILIPPI, M. C. C.; SILVA, G. B.; SILVA-LOBO, V. L.; CÔRTES, M. V C. B.; MORAES, A. J. G.; PRABHU, A. S. Leaf blast (*Magnaporthe oryzae*) suppression and growth promotion by rhizobacteria on aerobic rice in Brazil. **Biological Control**, v.58, p.160–166, 2011. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.04.016

FOUSIA, S.; PAPLOMATAS, E.J.; TJAMOS, S.E. *Bacillus subtilis* QST 713 confers protection to tomato plants against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and induces plant defence-related genes. **Journal of Phytopathology**, v.164, p.264–270, 2015. https://doi.org/10.1111/jph.12455

FURLAN, S. H. Mofo branco. *In*: LEMES, E.; CASTRO, L.; ASSIS, R. (eds.). **Doenças da soja**: melhoramento genético e técnicas de manejo. Campinas: Millennium, 2015. p. 53-78.

GARCIA, T. V.; KNAAK, N.; FIUZA, L. M. Bactérias endofíticas como agentes de controle biológico na orizicultura. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.82, p.1-9, 2015. https://doi.org/10.1590/1808-1657001262013

GIRI, R.; DUDEJA, S. S. Root colonization of root and nodule endophytic bacteria in legume and non legume plants grown in liquid medium. **Journal of Microbiology Research and reviews**, v.1, n.6, p.75-82, 2013.

GIORGIO, A.; STRADIS, A.; CANTORE,P. L.; IACOBELLIS, N. S. Biocide effects of volatile organic compounds produced by potential biocontrol rhizobacteria on *Sclerotinia sclerotiorum*. **Frontiers in Microbiology**, v.6, p.1-13, 2015. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01056

GODOY, C. V.; ALMEIDA, A. M. R.; COSTAMILAN, L. M.; MEYER, M. C.; DIAS, W. P.; SEIXAS, C. D. S.; SOARES, R. M.; HENNING, A.A.; YORINORI, J. T.; FERREIRA, L. P.; SILVA, J. F. V. Doenças da soja. *In*: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de Fitopatologia** – Doenças das Plantas Cultivadas. 5. ed.. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2016. v.2, p.657-678.

GÖRGEN, C. A.; SILVEIRA NETO, A. N.; CARNEIRO, L. C.; RAGAGNIN, V.; LOBO JUNIOR, M. Controle do mofo branco com palhada e *Trichoderma harzianum* 1306 em soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, n.12, p.1583-1590, 2009. https://doi.org/10.1590/S0100-204X2009001200004

HENNENBERG, L.; GRABICOSKI, E.M.G.; JACCOUD-FILHO, D.S.; PANOBIANCO, M. Incidência de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de soja e sensibilidade dos testes de detecção. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.47, n.6, p.763-768, 2012. http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2012000600005.

HENNING, A. A. Manejo de doenças da soja (*Glycine max* L. Merrill). **Informativo ABRATES**, v.19, p.9-12, 2009.

KADO, C.I.; HESKETT, M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium, Corynebacterium, Erwinia, Pseudomonas*, and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v.60, p.969. 1970. https://doi.org/10.1094/Phyto-60-969

KANG, S. M.; RADHAKRISHNAN, R.; LEE, I-J. *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* GR53, a potent biocontrol agent resists *Rhizoctonia* disease on Chinese cabbage through hormonal and antioxidants regulation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology,** v.31,

n.10, p.1517–1527, 2015. https://doi.org/10.1007/s11274-015-1896-0

LIMA, O. D. R.; OLIVEIRA, L. J. M. G.; SILVA, M. S. B. S; RODRIGUES, A. A. C. Ação antifúngica *in vitro* de isolados de *Bacillus* ssp. sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Revista Caatinga**, v.27, n.4, p.57-64, 2014.

MAIA, F.G.M.; ARMESTO, C.; ZANCAN, W. L. A.; MAIA, J. B.; ABREU, M. S. de. Efeito da temperatura no crescimento micelial, produção e germinação de conídios de *Colletotrichum* spp. isolados de mangueira com sintomas de antracnose. **Bioscience Journal**, v.27, n.2, p.205-210, 2011.

MARCUZZO, L. L.; SCHULLER, A. Sobrevivência e viabilidade de escleródios de *Sclerotium rolfsii* no solo. **Summa Phytopathologica**, v.40, n.3, p.281-283, 2014. http://dx.doi.org/10.1590/0100-5405/167306.

MEYER, M. C.; CAMPOS, H. D.; GODOY, C. V.; UTIAMADA, C. M. (eds.). **Ensaios cooperativos de controle de mofo branco na cultura da soja: safras 2009 a 2012.** Londrina: Embrapa Soja, 2014. (Documento; 345)

MEYER, M. C.; CAMPOS, H. D.; GODOY, C. V.; UTIAMADA, C. M.; PIMENTA, C. B.; JACCOUD FILHO, D. S.; BORGES, E. P.; JULIATTI, F. C.; NUNES JUNIOR, J.; CARNEIRO, L. C.; SILVA, L. H. C. P. da; SATO, L. N.; GOUSSAIN, M.; MARTINS, M. C.; TORMEN, N. R.; BALARDIN, R. S.; VENANCIO, W. S. **Eficiência de fungicidas para controle de mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) em soja, na safra 2016/17:** resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. Londrina: Embrapa Soja, 2017. (Circular Técnica, 133)

OOSTENDORP, M.; SIKORA, R. A. Seed treatment with antagonistic rhizobacteria for the suppression of *Heterodera schachtii* early root infection of sugar beet. **Revue de Nématologie**, v.1, n.12, p.77-83, 1989.

PINHO, R. S. C.; POZZEBON, B. C.; CALVANO, C. C. A.; VEY, R. T.; HAJAR, A. S.; RODRIGUES, B. M.; RODRIGUES, K. R. R. Bioprospecção de rizobactérias para o controle *in vitro* de *Pyricularia grisea*, tratamento de sementes e promoção de crescimento de plântulas de arroz. **Biotemas**, v.32, n.3, p.23-34, 2019. https://doi.org/10.5007/2175-7925.2019v32n3p23.

POPOVA, A. A.; KOKSHAROVA, O. A.; LIPASOVA, V. A.; ZAITSEVA, J. V.; KATKOVAZHUKOTSKAYA, O. A.; EREMINA, S. I.; MIRONOV, A. S.; CHERNIN, L. S.; KHMEL, I. A. Inhibitory and toxic effects of volatiles emitted by strains of *Pseudomonas* and *Serratia* on growth and survival of selected microorganisms, *Caenorhabditis elegans*, and *Drosophila melanogaster*. **BioMed Research International**, v.2014, p.1–11, 2014. http://dx.doi.org/10.1155/2014/125704.

RAMAMOORTHY, V.; VISWANATHAN, R.; RAGUCHANDER, T.; PRACKASAM, V.; SAMIYAPPAN, R. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. **Crop Protection,** v.20, n.1, p.1-20, 2001. https://doi.org/10.1016/S0261-2194(00)00056-9.

REBIÈRE, C. Identificação molecular e fenotípica de bactérias de solo rizosférico com tolerância ao fungicida Mancozeb, em Manaus, Estado do Amazonas, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v.6, n.2, p.37-43, 2015. https://doi.org/10.5123/S2176-62232015000200005

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

RYU, E. On the Gram-differentiation of bacteria by the simplest method. **Journal of the Japanese Society for Veterinary Science**, v.7, p.31, 1938. https://doi.org/10.1292/jvms1922.17.3_205

SHAHZAD, R.; KHAN, A. L.; BILAL, S.; ASAF, S.; LEE, I-J. Plant growth-promoting endophytic bacteria versus pathogenic infections: an example of *Bacillus amyloliquefaciens* RWL-1 and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in tomato. **PeerJ**, v.5, n.e3107, p.1-21, 2017. https://doi.org/10.7717/peerj.3107

SHIOMI, H. F.; FERREIRA, M. V. R.; MELO, I. S. Bioprospecção de isolados bacterianos para o controle biológico do mofo branco na soja. **Scientific Electronic Archives,** v.10, n.2, p.56-63, 2017.

SILVA, F. F.; CASTRO, E. M.; MOREIRA, S. I.; FERREIRA, T. C.; LIMA, A. E.; ALVES, E. Emergência

e análise ultraestrutural de plântulas de soja inoculadas com *Sclerotinia sclerotiorum* sob efeito da aplicação de *Trichoderma harzianum*. **Summa Phytopathologica**, v.43, n.1, p 41-45, 2017. http://dx.doi.org/10.1590/0100-5405/2212.

SILVA, J. C. P.; TERRA, W. C.; BARROS, A. F.; CAMPOS, V. P. **Compostos orgânicos voláteis no controle de fitonematóides.** Lavras: Ed. UFLA, 2019.

SUMIDA, C. H.; CANTERI, M. G.; PEITL, D. C.; TIBOLLA, F.; ORSINI, I. P.; ARAÚJO, F. A.; CHAGAS, D. F.; CALVOS, N. S. Chemical and biological control of *Sclerotinia* stem rot in the soybean crop. **Ciência Rural**, v.45, n.5, p.760-766, 2015. http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20140198.

TUPICH, F. L. B.; FANTIN, L. H.; SILVA, A. L.; CANTERI, M. G. Impacto do controle do mofo branco com fluazinam na produtividade da soja no Sul do Paraná: metanálise. **Summa Phytopathologica,** v.43, n.2, p.145-150, 2017. https://doi.org/10.1590/0100-5405/168479

ZARPELON, T. G. **Caracterização de rizobactérias e eficiência de Rizolyptus® no enraizamento e crescimento de eucalipto**. 2007. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.