

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
CAMPUS ITAQUI
CURSO DE GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**EFEITO DE RIZOBACTÉRIAS NO CRESCIMENTO
MICELIAL DE *Sclerotinia sclerotiorum* E NA
GERMINAÇÃO E SANIDADE DE SEMENTES DE
SOJA**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Renata Bolacel Arns

**Itaqui, RS, Brasil
2016**

RENATA BOLACEL ARNS

**EFEITO DE RIZOBACTÉRIAS NO CRESCIMENTO MICELIAL DE
Sclerotinia sclerotiorum E NA GERMINAÇÃO E SANIDADE DE
SEMENTES DE SOJA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Agronomia da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), como requisito parcial para obtenção do grau de **Engenheiro Agrônomo**.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Renata Silva Canuto de Pinho

Itaqui, RS, Brasil
2016

RENATA BOLACEL ARNS

**EFEITO DE RIZOBACTÉRIAS NO CRESCIMENTO MICELIAL DE
Sclerotinia sclerotiorum E NA GERMINAÇÃO E SANIDADE DE
SEMENTES DE SOJA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Agronomia da Universidade Federal do
Pampa (UNIPAMPA), como requisito
parcial para obtenção do grau de
Engenheiro Agrônomo.

Trabalho de conclusão de curso defendido e aprovado em: 30 de junho de 2016.
Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Renata Silva Canuto de Pinho
Orientadora
Curso de Agronomia – UNIPAMPA

Prof^a. Dr^a. Luciana Zago Ethur
Curso de Agronomia – UNIPAMPA

Prof^a. Dr^a. Adriana Pires Soares Bresolin
Curso de Agronomia - UNIPAMPA

Dedico este trabalho aos meus pais, Gilberto Arns e Tania Janice Bolacel Arns, minha base, porto seguro, exemplo de força, amor e dedicação incondicionais, comigo em todos os momentos, e às minhas irmãs, Bruna Arns Jacques e Rafaela Bolacel Arns pela amizade e cumplicidade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me guiar e não me deixar desistir nos momentos mais difíceis, e por permitir a realização de mais um sonho. Ao meu anjo da guarda por me proteger e me mostrar o caminho.

À Universidade Federal do Pampa – Campus Itaqui pela oportunidade de estudo.

À minha família, especialmente meus pais, Gilberto Arns e Tania Janice Bolacel Arns por terem me dado a oportunidade de conquistar meu sonho mesmo que tenham precisado abrir mão dos seus próprios e me deram suporte nos caminhos que eu decidi seguir, acreditando sempre no meu sucesso e me apoiando em todos os momentos. E às minhas irmãs, Bruna Arns Jacques e Rafaela Bolacel Arns, que sempre estiveram presentes em minha caminhada, sempre torcendo por mim como minhas melhores amigas.

À Prof^a. Dr^a. Renata Silva Canuto de Pinho, que além de orientadora, foi uma grande amiga, dando-me o exemplo de comprometimento e dedicação com bom-humor. Obrigada Renata, pela orientação, apoio, amizade, estímulo, dedicação, paciência, preocupação e disposição dispensadas a mim.

Aos professores, minha gratidão pelos ensinamentos, desde minhas primeiras palavras lidas, primeiras razões matemáticas, ensino fundamental, ensino médio e ensino superior, a todos os que, ao participar de minha vida, me conduziram à esse dia.

Aos meus colegas, pela convivência e amizade criada durante o correr dos semestres letivos.

Aos meus amigos, que estiveram comigo e que torceram por mim nesta caminhada, em especial à Carolina Altermann, Maria Victória Luzardo, Fabíola Saldanha, Ricardo Gonçalves, Kaiane Rodrigues, Taiane Brunetti, Ana Paula Rodrigues.

Aos meus antigos colegas, pra sempre amigos, Rudmar Seiter, Jéssica Garcia, Humberto Farias, Monica Tejada e Mariana Serroni.

Ao Grupo de Estudo em Fitopatologia - GEFIT, Joaquim Machado, Morgana Stella, Mireli Bergmann, Ketlen Rey pelo auxílio na execução deste projeto e por tornarem os dias de trabalho menos cansativos e mais divertidos.

À todas as pessoas que, direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta pesquisa e conclusão deste sonho.

Que importa o mal que te atormenta, se o sonho te contenta e pode se realizar.

Walt Disney

RESUMO

EFEITO DE RIZOBACTÉRIAS NO CRESCIMENTO MICELIAL DE *Sclerotinia sclerotiorum* E NA GERMINAÇÃO E SANIDADE DE SEMENTES DE SOJA

Autor: Renata Bolacel Arns

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Renata Silva Canuto de Pinho

Local e data: Itaqui, 30 de junho de 2016.

O mofo branco, causado por *Sclerotinia sclerotiorum* é uma doença importante para a cultura da soja por apresentar facilidade de disseminação, causando perdas de até 100% na produção. O uso de rizobactérias tem demonstrado grande potencial no controle de fitopatógenos, sendo uma alternativa ecológica para a redução do uso de agrotóxicos na produção de soja. Com este trabalho, objetivou-se isolar e selecionar rizobactérias provenientes de plantas de soja quanto sua capacidade antagônica a *S. sclerotiorum in vitro* e avaliar o efeito desses isolados na germinação e sanidade de sementes de soja. Os testes foram realizados no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal do Pampa – Campus Itaqui. O isolamento das rizobactérias foi feito a partir de raízes de plantas de soja, retiradas aleatoriamente de três pontos distintos, provenientes de três lavouras de soja dos municípios de Uruguaiana, Itaqui e Maçambará do estado do Rio Grande do Sul. A partir dos isolados obtidos foi realizado um teste *in vitro* para avaliar o efeito das rizobactérias no índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) de *S. sclerotiorum*. Para isso, cada isolado rizobacteriano foi repicado nos quatro extremos da placa de Petri, exceto no tratamento testemunha, e um disco de 0,5 cm de micélio do fungo foi colocado no centro de todas as placas. As placas foram colocadas em BOD à 25°C com fotoperíodo de 12h. A avaliação consistiu em medições diárias do patógeno, até a testemunha atingir a borda da placa. Os melhores isolados do teste *in vitro* foram avaliados quanto ao seu efeito na germinação e sanidade de sementes de soja. Sementes de soja foram microbiolizadas em suspensão bacteriana na concentração OD₅₄₀=0,5 por cinco minutos. Em seguida foi montado o teste de rolo de papel e mantidos em BOD à 25°C. Após oito dias foram avaliadas a germinação e a incidência de fungos nas sementes. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com quatro repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias de cada tratamento, agrupadas pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade. Foram obtidos 47 isolados rizobacterianos, onde 21,27% apresentaram algum grau de controle quanto ao IVCM, quando comparados com a testemunha. A rizobactéria I1 foi a mais eficiente, apresentando 70,3% de inibição do IVCM de *S. sclerotiorum*. Quanto à germinação e sanidade de sementes de soja somente o isolado M8 apresentou bons resultados na germinação e controle de fitopatógenos.

Palavras-chave: Controle biológico; *Glycine max*; Mofo Branco.

ABSTRACT

EFFECT ON RHIZOBACTERIA *Sclerotinia sclerotiorum* MYCELIAL GROWTH AND GERMINATION AND SANITY OF SOYBEAN SEEDS

Author: Renata Bolacel Arns

Advisor: Prof. Dr. Renata Silva Canuto de Pinho

Place and date: Itaqui, June 30, 2016.

White mold caused by *Sclerotinia sclerotiorum* is an important disease for the soybean crop to present dissemination facility, causing losses of up to 100 % in production. The use of rhizobacteria has shown great potential in the control of plant pathogens, being an environmentally friendly alternative to reduce the use of pesticides in soybean production. The objective of this work was to isolate and to select rhizobacteria from soybean plants as antagonistic capacity to *S. sclerotiorum* *in vitro* and to evaluate the effect of these isolated on germination and sanity of soybean seeds. The tests were performed at the Laboratory of Plant Pathology, Federal University of Pampa - Campus Itaqui. Isolation of rhizobacteria was made from soybean roots, randomly drawn from three distinct points from three soybean crops in the cities of Uruguai, Itaqui and Maçambará of the Rio Grande do Sul State. From the isolates obtained was performed an *in vitro* test to assess the effect of rhizobacteria on mycelial growth rate index (MIGS) *S. sclerotiorum*. For this, each rhizobacterian isolated was peaked in the four extremes of the Petri dish, except in the control group and a 0.5 cm fungal mycelium disk was placed in the center of all plates. The plates were placed in BOD at 25 ° C with a photoperiod of 12 hours. The evaluation consisted of daily measurements of the pathogen until the witness reaches the edge of the plate. The best isolates *in vitro* test were assessed for their effect on health and germination of soybean seeds. Seeds of soybean were microbiolized bacterial suspension in the concentration $OD_{540}=0,5 = 0.5$ for five minutes. Next was mounted paper roll test and kept in BOD at 25 ° C. Eight days after germination were evaluated and the incidence of fungi on seeds . The experimental design was completely randomized with four replications. The data were submitted to analysis of variance and the means of each treatment, grouped by the Scott- Knott test at 5 % probability. 47 rhizobacterian isolates were obtained where 21.27 % had some degree of control on the MIGS when compared to the control. The rhizobacterium I1 was the most efficient, with 70.3 % inhibition of MIGS *S. sclerotiorum*. The germination and health soybeans only isolated M8 showed good results on germination and control of phytopathogens.

Keywords: Biological control; *Glycine max*; *Sclerotinia* stem rot.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Diluição serial (A); Colônias bacterianas (B); Rizobactéria isolada (C).....	19
FIGURA 2: Quadrado de rizobactéria em torno do disco de micélio.....	20
FIGURA 3: Dispersão de bactérias em solução salina (A); Concentração balanceada da solução (B); Sementes pós microbiolização dispostas para secagem (C).....	22
FIGURA 4: Antagonismo <i>in vitro</i> do isolado rizobacteriano M6 ao desenvolvimento micelial de <i>S. sclerotiorum</i> , comparado à testemunha.....	26
FIGURA 5: Incidência de fungos em sementes de soja nos tratamentos Testemunha (A) e isolado M8 (B).....	29

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Isolados rizobacterianos obtidos da rizosfera de plantas de soja de três pontos dos municípios de Uruguaiana/RS, Itaqui/RS e Maçambará/RS.....	23
TABELA 2: Efeito de rizobactérias no índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e porcentagem de redução do IVCM em relação à testemunha, de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	24
TABELA 3: Efeito de rizobactérias no índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e porcentagem de redução do IVCM em relação à testemunha, de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	25
TABELA 4: Efeito de rizobactérias na germinação de sementes de soja.....	27
TABELA 5- Incidência de fungos em sementes de soja microbiolizadas com rizobactérias.....	28

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Mofo branco (<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (Lib.) de Bary).....	15
2.2 Controle biológico com Rizobactérias.....	16
3 MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 Isolamento de rizobactérias.....	18
3.2 Teste <i>in vitro</i> de inibição do crescimento micelial de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	19
3.3 Efeito de rizobactérias na germinação e sanidade de sementes de soja.....	21
3.4 Análises estatísticas.....	22
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
4.1 Teste <i>in vitro</i> de inibição do crescimento micelial de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	23
4.2 Efeito de rizobactérias na germinação de sementes de soja.....	27
4.3 Efeito de rizobactérias na sanidade de sementes de soja.....	28
5 CONCLUSÃO	30
6 REFERÊNCIAS.....	31

1 INTRODUÇÃO

A soja é a cultura mais produzida no país fato que permite a exportação de um grande volume de grãos para o exterior. A produção esperada para 2016 é de 100,933 milhões de toneladas e as exportações de soja são estimadas em 56,75 milhões de toneladas, maiores do que as 54,32 milhões de toneladas de 2015 (CONAB, 2016).

A rápida expansão da cultura da soja, nas últimas três décadas, quase sempre feita sem o mínimo cuidado fitossanitário, permitiu que a maioria dos patógenos fosse disseminada a todas as regiões produtoras, através da semente, seu principal veículo de disseminação e introdução em novas áreas de cultivo (HENNING, 2005).

O mofo branco é uma doença antiga na soja, mas devido ao aumento de sua incidência no Brasil, a doença passou a afetar economicamente a produção de soja a partir de 2008 (EMBRAPA, 2014). No VII Congresso Brasileiro de Defensivos Agrícolas – Cobradan, um dos enfoques das palestras e mesas redondas foi a importância do controle de Mofo Branco no Brasil. A doença foi listada como uma questão de segurança nacional e citada como uma das oito pragas com prioridade no estudo de formas alternativas e naturais de controle (EMBRAPA, 2015).

Não existem cultivares de soja resistentes a *S. sclerotiorum*, e o controle químico do mofo branco pode ser inviável em razão dos custos e das dificuldades de se obter uma cobertura total da planta durante a pulverização (GÖRGEN et al., 2009). O incremento dos custos com o controle químico, a perda de eficiência de alguns agrotóxicos, devido à resistência dos organismos alvos, e os problemas advindos destas práticas, indicam a necessidade da busca de produtos biocompatíveis para o controle de fitopatógenos. Além disso, a preocupação da sociedade com o impacto da agricultura no ambiente e a contaminação da cadeia alimentar com os agrotóxicos está alterando o cenário agrícola (ZAMBOLIM et al., 2014). Portanto é necessário aumentar estudos e recursos dedicados a métodos de controle alternativos no país visando meios de sustentabilidade ambiental e social para a agricultura.

As rizobactérias benéficas às plantas por promoverem seu crescimento e/ou atuarem no controle biológico de fitopatógenos são chamadas de bactérias promotoras de crescimento de plantas ou PGPR, abreviatura de seu nome em inglês

Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (KLOEPPER E SCHROTH, 1981). As rizobactérias podem atuar como agentes de controle biológico de doenças, uma vez que induzem resistência sistêmica em plantas, produzem antibióticos e sideróforos que inibem o crescimento de vários patógenos (RAMAMOORTHY et al., 2001).

Um dos primeiros passos para utilização de qualquer organismo no controle biológico é a obtenção de um grande número de isolados e a seleção *in vitro*. Com este trabalho objetivou-se isolar e selecionar rizobactérias provenientes de plantas de soja quanto a sua capacidade antagônica a *Sclerotinia sclerotiorum in vitro* e avaliar o efeito desses isolados na germinação e sanidade de sementes de soja.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary)

O mofo branco é uma doença causada pelo fungo pertencente ao filo Ascomycota, ordem Helotiales, família Sclerotiniaceae e gênero *Sclerotinia* (MICHEREFF, 2001). A doença pode também ser chamada popularmente de podridão branca da haste ou podridão de esclerotina (KIMATI et al., 2005).

A podridão branca da haste está disseminada por todas as regiões de condições climáticas amenas, o que inclui a Região Sul do país e chapadas dos cerrados, acima de 800 m de altitude. Além da soja, o fungo infecta uma vasta gama de plantas cultivadas e daninhas, com exceção das gramíneas (KIMATI et al., 2005). O fungo tem como hospedeiros mais de 400 espécies de plantas pertencentes a aproximadamente 200 gêneros botânicos. Entre as culturas de maior destaque estão a soja, o feijão, o girassol, o tomate industrial, a batata e outras hortaliças (FURLAN, 2010).

A doença se manifesta na haste, folhas e vagens, começando, geralmente, pelas partes mais próximas do solo, na forma de manchas aquosas que evoluem para podridão mole. Tecidos assim afetados são, então, cobertos pelo crescimento micelial branco cotonoso do patógeno (GALLI et al., 1980). Em poucos dias, o micélio transforma-se em massa negra rígida, o escleródio, que é a forma de resistência do fungo (KIMATI et al., 2005).

Os fungos da ordem Helotiales produzem escleródios bem desenvolvidos, estruturas que garantem a sua sobrevivência em períodos desfavoráveis (AMORIM et al., 2011). Essas estruturas são muito resistentes às intempéries e permanecem no solo por um longo período de tempo, podendo persistir por muitos anos, e muitas vezes pode ser a fonte inicial de inóculo (GALLI et al., 1980; FURLAN, 2010). Escleródios caídos ao solo, sob condições de alta umidade e temperaturas variando de 10-21°C, germinam e desenvolvem, na superfície do solo, os apotécios (KIMATI et al., 2005), onde são formados milhares de esporos, facilmente disseminados pelo vento devido a um mecanismo de ejeção violenta dos ascósporos pelo fungo (GALLI et al., 1980). Ao germinarem, esses escleródios formam apotécios pedicelados, típicos da ordem, que produzem ascos inoperculados, geralmente com anéis amiloides. Os ascósporos projetados e disseminados pelo vento constituem-se no inóculo primário da doença (AMORIM et al., 2011).

Além da disseminação pelo ar e pelo vento, a principal forma de transmissão é através de sementes, que pode ocorrer tanto através de micélio dormente (interno) quanto através de escleródios misturados às sementes (KIMATI et al., 2005).

Furlan (2010) cita que até a cultura chegar ao florescimento dificilmente a doença torna-se importante. Sendo que a partir deste período a doença é disseminada rapidamente, visto que a flor é fonte primária de energia, servindo de alimento para o fungo iniciar novas infecções. A fase mais vulnerável vai do estágio da floração plena ao início da formação das vagens. O fungo é capaz de infectar qualquer parte da planta, porém, as infecções iniciam-se com mais frequência a partir das inflorescências e das axilas das folhas e dos ramos laterais (KIMATI et al., 2005).

Com o avanço da doença, a planta ou parte dela murcha, podendo resultar na sua morte. Quando os tecidos secam, os mesmos tornam-se esbranquiçados sendo visíveis os escleródios, de várias formas e tamanhos (FURLAN, 2010).

As altas incidências só são explicáveis pela alta concentração de escleródios ou pela disseminação de ascósporos, além de condições ambientais favoráveis, principalmente baixa temperatura e alta umidade (GALLI et al., 1980).

Segundo Galli et al. (1980), em condições ótimas para o mofo branco, a intensidade da doença, em certas áreas, é tão grande que chega a afetar 100% da cultura, e as perdas ocasionadas no campo se prolongam durante a fase de transporte e armazenamento.

Segundo o Agrolink, estima-se que 6 milhões de hectares de soja no Brasil apresentam a doença. Visão preocupante já que a área com agricultura no país é de 70 milhões de hectares cultivados, ou seja, 8,6% das áreas estão contaminadas com o patógeno. As perdas pela doença podem atingir 30% da produção agrícola, se não houver controle adequado (SOCIEDADE NACIONAL DE AGRICULTURA, 2014).

2.2 Controle biológico com Rizobactérias

O controle pouco confiável com os métodos tradicionais e com as preocupações em relação ao uso de agrotóxicos, fez com que o controle biológico se tornasse uma estratégia alternativa para o manejo de *Sclerotinia sclerotiorum* (FERNANDO et al., 2007).

Entre os organismos mais estudados, as bactérias têm sido relatadas como agentes de biocontrole mais comuns e, dentre elas, as rizobactérias sempre tiveram

papel de destaque. O aumento de produtividade em culturas se deve, em grande parte, à supressão de patógenos por rizobactérias que existem naturalmente em solos supressivos. Além disso, a presença e, ou adição da rizobactéria à rizosfera torna toda a planta, inclusive a parte aérea, mais resistente a patógenos (ROMEIRO, 2013).

As rizobactérias além de suprimir doenças de plantas causadas por fungos ou outros fitopatógenos, também podem ser promotoras de crescimento de plantas, quando passam a ser denominadas Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (PGPR), e a sua aplicação em solos agricultáveis traz benefícios diretos e indiretos para a produção agrícola e ao uso criterioso de insumos (FILIPPI et al., 2011).

Vários trabalhos têm demonstrado o potencial de rizobactérias para o controle de mofo branco. A partir de um produto na forma de pó-molhável a base de *Bacillus subtilis* Lazzaretti e Bettiol (1997) observaram o controle de *S. sclerotiorum* em sementes de feijão. Isolados de *Bacillus subtilis* foram eficazes no controle de *S. sclerotiorum* em repolho roxo, com aumento na zona de inibição, eficácia na prevenção da doença e diminuição na formação de lesões (TOZLU et al., 2015).

As rizobactérias mostram-se também eficazes para diversos patógenos. Desempenhos favoráveis ao controle de *Rhizoctonia solani*, agente causador de queima-das-bainhas no arroz, foram demonstrados por isolados de *Pseudomonas* spp. no que se refere a diminuição da severidade da doença e à incrementação de massa seca na parte aérea e raízes (LUDWIG e MOURA, 2007). No controle de mancha-parda (*Bipolaris oryzae*) e escaldadura (*Gerlachia oryzae*) em arroz irrigado, Ludwig et al. (2009) encontraram redução no progresso da doença em plantas microbiolizadas com o isolados de *Bacillus* spp. e *Pseudomonas* spp..

Isolados de *Bacillus subtilis* foram avaliados no controle de *Pyricularia oryzae* sob diferentes concentrações de caldo onde a rizobactéria foi multiplicada. A percentagem de inibição micelial foi de até 96% apresentando estabilidade por 30 dias *in vitro* (BETTIOL E KIMATI, 1990).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos realizados neste trabalho foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal do Pampa - UNIPAMPA, campus Itaqui.

3.1 Isolamento de rizobactérias

As rizobactérias foram isoladas de amostras de solo de plantas de soja. Foram escolhidas plantas saudáveis de três áreas e municípios diferentes, visando maior diversidade microbológica. As áreas foram Granja Águas Claras do município de Uruguaiana – RS, Granja Busatto do município de Itaqui – RS e Granja 3 Bocas do município de Maçambará – RS. De cada área foram retiradas três subamostras de plantas de soja, removidas aleatoriamente com uma pá de corte visando a retirada do solo mais próximo das raízes.

O isolamento de rizobactérias foi baseado na metodologia de Romeiro (2007). O procedimento foi feito com 10 g de solo da rizosfera de cada ponto, colocado em erlenmeyer e diluído em 100 mL de solução salina (0,85% NaCl) estéril. A suspensão foi mantida sob contínua agitação, em agitador rotatório de plataforma a 140 rpm, por 30 min, à temperatura ambiente para facilitar a liberação das bactérias presentes na rizosfera das plantas coletadas. Decorrido este intervalo de tempo, foi feita uma diluição em série de cada amostra em solução salina de NaCl 0,85%, com fator de diluição 1:10 até 10^{-4} , dos quais foram usados os três mais diluídos.

Em seguida, foram depositados 100µL de cada diluição e espalhados com alça de Drigalski em placas de Petri contendo meio de cultura 523 de Kado e Heskett composto por: Sacarose (10,0 g), Caseína ácida hidrolisada (8,0 g), Extrato de Levedura (4,0 g), K_2HPO_4 (anidro) (2,0 g), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,3 g), Ágar (15,0 g) e Água destilada (1000 mL).

As placas foram submetidas às condições controladas em câmara BOD sob 28°C por 24 h para favorecer o crescimento das colônias bacterianas.

Após esse período, as colônias bacterianas com formas e/ou coloração diferentes foram repicadas individualmente em tubos de ensaio contendo o mesmo meio, com o intuito de obter isolados bacterianos puros. Os tubos foram mantidos em câmara BOD sob as mesmas características anteriores e, transcorridas 24h foram armazenados sob refrigeração até a montagem dos testes (Figura 1).

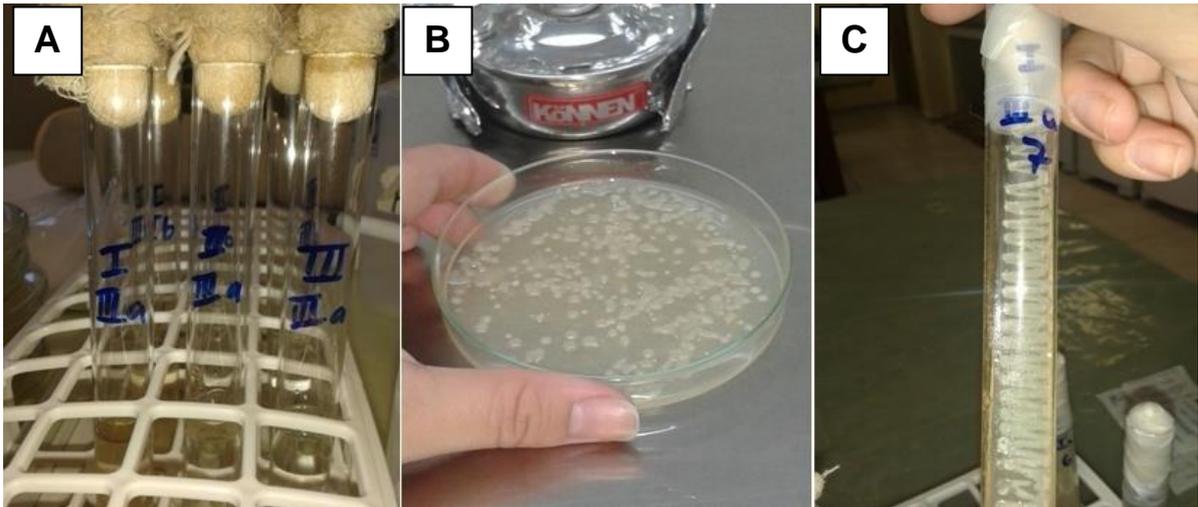


FIGURA 1- Diluição serial (A); Colônias bacterianas (B); Rizobactéria isolada (C).

3.2 Teste *in vitro* de inibição do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum*

Foram testados 47 isolados rizobacterianos, divididos em dois grupos, o primeiro com 30 isolados e o segundo com 17 isolados. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado com três repetições.

Primeiramente, foi feita a repicagem de *S. sclerotiorum* em meio de cultura BDA (Batata-Dextrose-Ágar). Foram repicados micélio e escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* provenientes do Laboratório de Fitopatologia do Campus Itaquí em placas de Petri para a obtenção de micélio novo para a montagem do teste. Em seguida, as placas foram colocadas em BOD a 22°C.

A seleção de rizobactérias para o controle de *Sclerotinia sclerotiorum* foi feita através do pareamento de culturas não-quantitativo segundo FILLIPI et al. (2011). Para isso, os isolados bacterianos foram repicados novamente em placas de Petri contendo meio de cultura 523, para obtenção de colônias novas. Essas placas foram incubadas por 24h em câmara BOD a 28°C para o crescimento das colônias bacterianas.

Para a formação do teste, foi transferido um disco de 0,5 cm de diâmetro de micélio de *Sclerotinia sclerotiorum* para o centro de todas as placas de Petri contendo meio de cultura BDA. Três placas foram identificadas formando as repetições do tratamento testemunha, onde somente eram compostas pelo disco de micélio sem qualquer presença de rizobactérias.

Em seguida, cada isolado rizobacteriano foi repicado nos quatro extremos das placas de Petri, formando um quadrado em torno do disco de micélio (Figura 2). Após o plaqueamento, as placas foram incubadas em BOD a temperatura de 25 °C com fotoperíodo de 12 h (FILIPPI, et al., 2011).

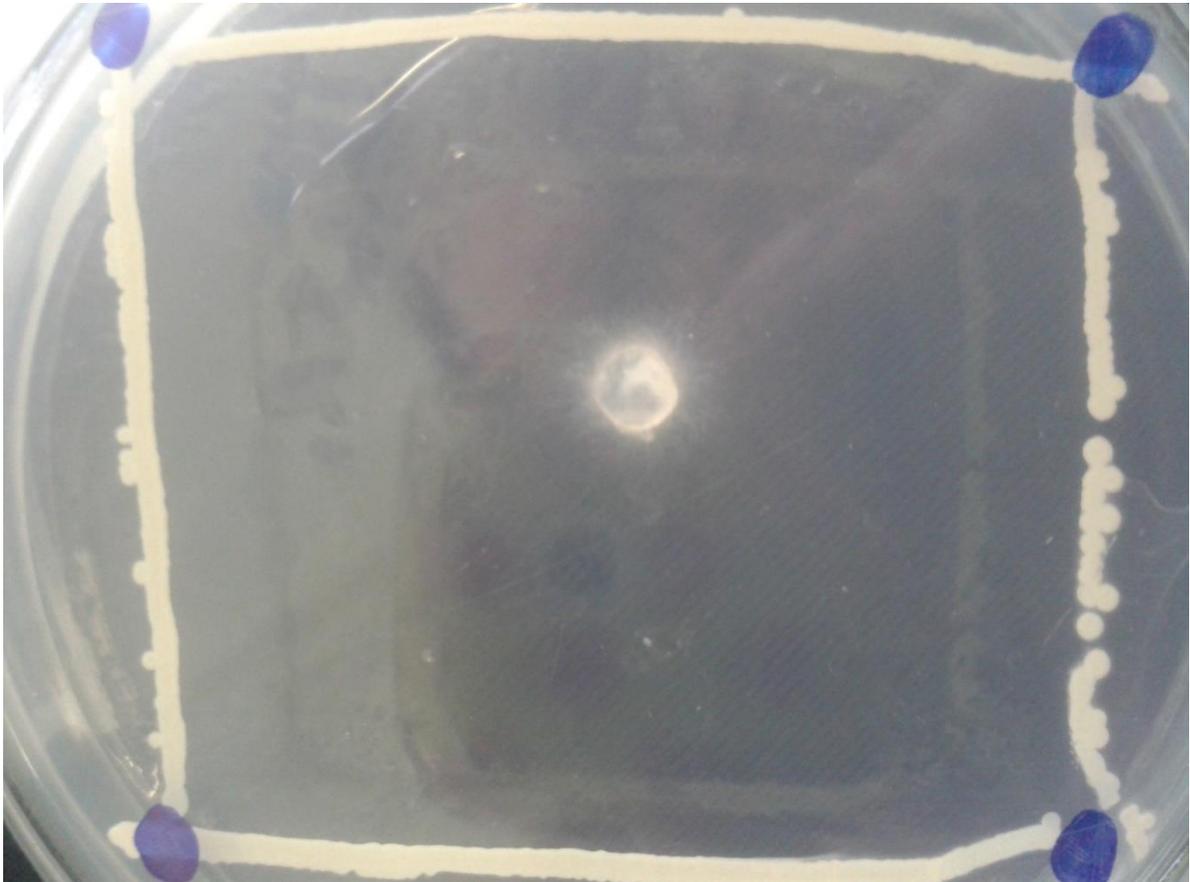


FIGURA 2- Quadrado de rizobactéria em torno do disco de micélio.

Para a avaliação do índice de velocidade de crescimento micelial de *S. sclerotiorum* diariamente foram feitas medições do crescimento micelial a partir da posição vertical e horizontal, sendo a última medição efetuada no dia que a testemunha atingiu o máximo de crescimento, ou seja, alcançando a borda da placa de Petri (FILIPPI, et al., 2011).

Esses dados foram utilizados no cálculo do índice de velocidade de crescimento micelial (OLIVEIRA, 1991) e no cálculo da % de redução do índice de velocidade de crescimento micelial.

A fórmula para o cálculo do Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) é dada por:

$$IVCM = \sum (D-Da)/N$$

Sendo:

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

A fórmula para o cálculo do % de Redução do Índice de Velocidade de Crescimento Micelial.

é dada por:

$$\% \text{ redução} = 100 - (\text{CM} \times 100/\text{T})$$

Sendo:

% redução = % de redução do índice de velocidade de crescimento micelial

CM = diâmetro da colônia

T = diâmetro da colônia da testemunha

3.3 Efeito de rizobactérias na germinação e sanidade de sementes de soja

Para o teste de germinação, sementes de soja foram microbiolizadas com os isolados rizobacterianos selecionados anteriormente a partir do teste *in vitro* e que apresentaram os melhores resultados no controle biológico sobre *Sclerotinia sclerotiorum*. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 10 tratamentos e quatro repetições.

A semente utilizada para o teste de germinação foi da empresa Syngenta, cultivar SYG 1163 safra 2014/2015.

As 10 cepas de rizobactérias previamente selecionadas foram repicadas em placas de Petri contendo o meio 523, visando colônias bacterianas novas, e incubadas em BOD a 28°C por 24h (ROMEIRO, 2007).

Para os tratamentos, 400 g de sementes foram sujeitas à assepsia sob imersão em solução de hipoclorito de sódio a 1% por 1 minuto, seguida de tríplice lavagem com água esterilizada. Após a limpeza, as sementes foram dispostas sobre papel toalha, almejando a secagem rápida e uniforme das mesmas.

Para a microbiolização das sementes, foi preparada uma suspensão bacteriana em solução salina (NaCl 0,85%) a partir das rizobactérias repicadas previamente, na concentração de $OD_{540}=0,5$ ajustada no espectrofotômetro. Em seguida, foram contadas 200 sementes para cada tratamento e imersas na suspensão bacteriana. Foram levadas à mesa de agitação de 140 rpm por 5 minutos (modificado de BEZERRA et al., 2013). As sementes foram dispostas em papel toalha para uma secagem uniforme antes da montagem do tratamento (Figura 3).

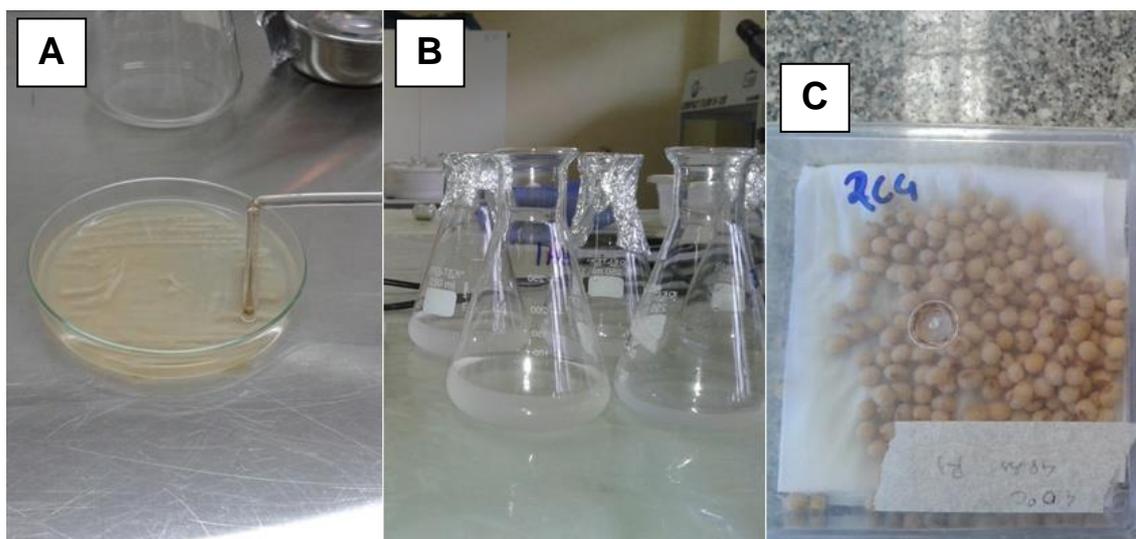


FIGURA 3- Dispersão de bactérias em solução salina (A); Concentração balanceada da solução (B); Sementes pós microbiolização dispostas para secagem (C).

Para a verificação do índice de germinação das sementes, foi montado um teste em rolo de papel, com quatro repetições, contendo 50 sementes. Folhas de papel filtro foram pesadas e embebidas em 2,5 vezes o seu peso em água destilada. As sementes foram dispostas em colunas sobre duas folhas úmidas e cobertas com uma folha, em sequência foram enroladas como rolo de papel. Quatro rolos foram agrupados de forma aleatória e levados em BOD a 25° sem fotoperíodo. As avaliações ocorreram após oito dias (MAPA, 2009).

Foram avaliados a percentagem de germinação normais, anormais e sementes mortas, o comprimento da radícula e a incidência de fungos.

3.4 Análises estatísticas

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias de cada tratamento foram agrupadas pelo Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade com o auxílio do programa Sisvar (FERREIRA, 2008).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos três pontos coletados, foram isoladas 47 cepas de rizobactérias (Tabela 1).

Tabela 1 – Isolados rizobacterianos obtidos da rizosfera de plantas de soja de três pontos dos municípios de Uruguaiana/RS, Itaqui/RS e Maçambará/RS.

Município	Ponto de coleta	Isolado
Uruguaiana/RS	P1	U1; U2; U3; U4; U5; U6; U7; U8; U9; U10; U11; U12; U13; U14; U15; U16;
Itaqui/RS	P2	I1; I2; I3; I4; I5; I6; I7; I8; I9; I10; I11; I12; I13; I14; I15; I16; I17; I18;
Maçambará/RS	P3	M1; M2; M3; M4; M5; M6; M7; M8; M9; M10; M11; M12; M13;

Os isolados foram denominados com relação à cidade de onde foram retirados seguidos de numeração crescente para identificação. O ponto 1 foi em Uruguaiana (U) onde foram isoladas 16 rizobactérias, o ponto 2 foi em Itaqui (I) foram isoladas 18 rizobactérias e o ponto 3 foi em Maçambará (M) com 13 isolados.

Os isolados foram diferenciados e selecionados a partir da aparência visual das colônias bacterianas.

4.1 Teste *in vitro* de inibição do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum*

Os testes foram divididos em duas etapas. Na primeira etapa, dos 30 isolados testados apenas cinco diferiram da testemunha com redução média de 50,34% (Tabela 2).

Tabela 2 – Efeito de rizobactérias no índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e porcentagem de redução do IVCM em relação à testemunha, de *Sclerotinia sclerotiorum*.

Tratamento	IVCM	% de redução do IVCM
Testemunha	2,28 b	-
U4	0,95 a	58,3
M6	0,96 a	57,9
M8	1,03 a	54,8
I16	1,33 a	41,7
M3	1,39 a	39,0
I13	1,67 b	26,7
M13	1,69 b	25,9
I11	1,84 b	19,3
U11	1,84 b	19,3
I8	1,86 b	18,4
I4	1,92 b	15,8
M7	1,92 b	15,8
I6	1,92 b	15,8
U7	1,96 b	14,0
U5	1,97 b	13,6
U2	1,98 b	13,2
I7	2,04 b	10,5
M11	2,05 b	10,1
I9	2,06 b	9,6
M4	2,07 b	9,2
U3	2,07 b	9,2
I5	2,11 b	7,5
U8	2,13 b	6,6
M12	2,20 b	3,5
M5	2,22 b	2,6
M2	2,23 b	2,2
U12	2,24 b	1,7
U1	2,24 b	1,7
I15	2,25 b	1,3
I2	2,33 b	-
CV (%) =	13,76	

Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

No segundo teste foram testados 17 isolados. Cinco rizobactérias diferiram significativamente da testemunha, representando 29,41% das rizobactérias antagonistas à *S. sclerotiorum* no segundo grupo. Dentre elas, a rizobactéria I1 se destacou em relação às demais com redução de 70,3% (Tabela 3).

Tabela 3 – Efeito de rizobactérias no índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e porcentagem de redução do IVCM em relação à testemunha, de *Sclerotinia sclerotiorum*.

Tratamento	IVCM	% de redução do IVCM
Testemunha	2,69 c	-
I1	0,80 a	70,3
U13	1,40 b	47,9
I14	1,65 b	38,6
M9	1,88 b	30,1
M10	1,94 b	27,8
I3	2,10 c	21,9
U16	2,44 c	9,2
U6	2,51 c	6,7
I18	2,56 c	4,8
U14	2,57 c	4,4
U15	2,60 c	3,3
I10	2,66 c	1,1
I12	2,67 c	0,7
I17	2,67 c	0,7
U10	2,69 c	-
M1	2,70 c	-
U9	2,71 c	-
CV (%) =	14,33	

Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Apresentando um percentual de 21,3% de 47 isolados, dez isolados apresentaram índice de velocidade de crescimento micelial diferente da testemunha, com reduções variando de 27,8 a 70,3%.

Entre as 10 rizobactérias que apresentaram algum controle da *S. sclerotiorum*, duas foram coletadas do ponto 1 (U4 e U13), três foram coletadas do ponto 2 (I1, I14 e I16) e cinco foram coletadas do ponto 3 (M3, M6, M8, M9 e M10) (Figura 4). Pode-se observar que apesar do ponto 3 ter-se isolado um número menor de rizobactérias em relação aos demais pontos, apresentou um número maior de isolados que inibiram o crescimento micelial de *S. sclerotiorum in vitro*. No entanto, o

município de Itaqui/RS apresentando apenas três isolados que reduziram o IVCM, neste ponto encontrou-se o isolado I1 que apresentou maior redução (70,3%).

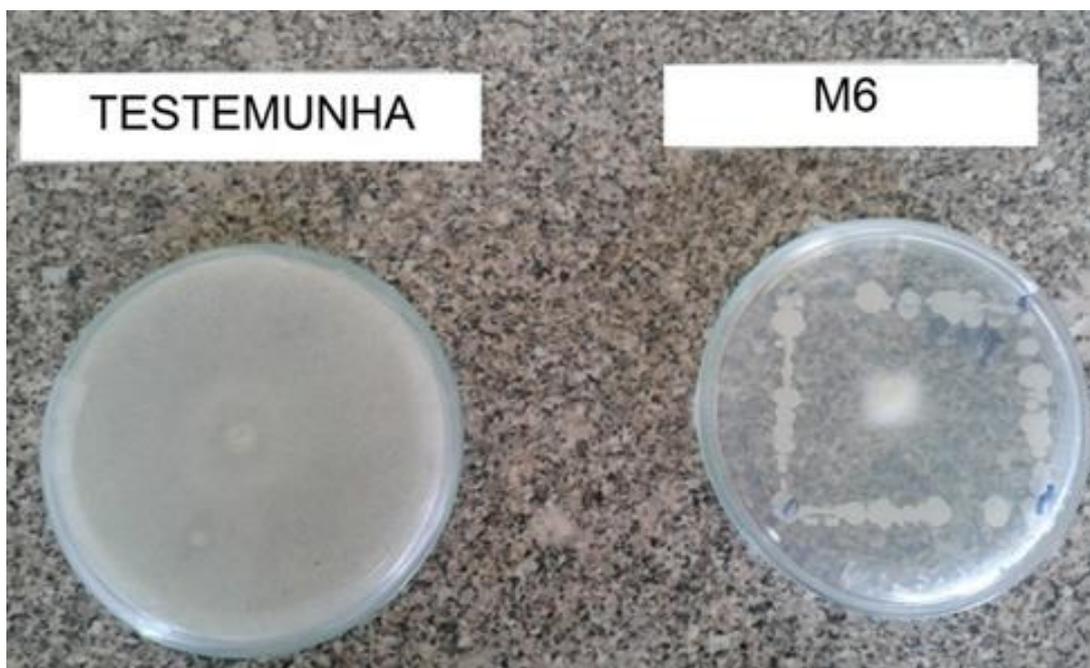


FIGURA 4- Antagonismo *in vitro* do isolado rizobacteriano M6 ao desenvolvimento micelial de *S. sclerotiorum*, comparado à testemunha.

Vários trabalhos têm demonstrado o potencial de rizobactérias no controle de *S. sclerotiorum*. Remuska e Pria (2007) observaram que a bactéria *Bacillus thuringiensis* além de apresentar inibição no crescimento de *S. sclerotiorum* em 37,44%, não permitiu que o fungo formasse escleródios. Fernando et al. (2007) verificaram que isolados de *Pseudomonas chlororaphis* e *Bacillus amyloliquefaciens* reduziram significativamente a podridão causada por *S. Sclerotiorum* em canola, a germinação de ascósporos foi inibida e enzimas de defesa da planta foram desencadeadas por *P. Chlororaphis*.

Monteiro et al. (2013), testaram diferentes concentrações de *Bacillus subtilis* no controle de crescimento micelial de *S. sclerotiorum* em alface e verificaram que o controle foi mais efetivo em concentrações maiores e por maior período, porém todas as concentrações testadas controlaram o fungo. Isolados de *Bacillus subtilis* também foram testados em soja no controle *in vitro* de *S. sclerotiorum* por Zhang e Xue (2009). Eles observaram que houve controle no crescimento micelial em 75% e na produção de escleródios.

4.2 Efeito de rizobactérias na germinação de sementes de soja

Quanto ao efeito de rizobactérias sobre a germinação de sementes de soja, verificou-se que os isolados I16, U13, U4, M3, M10 e M6 interferiram negativamente na germinação normal das sementes de soja. No entanto, a rizobactéria M8 apresentou um maior número de plântulas normais, seguida da bactéria I14. Os isolados I1e M9 não diferiram da testemunha (Tabela 4).

Tabela 4- Efeito de rizobactérias na germinação de sementes de soja.

Tratamento	Normais (%)	Anormais (%)	Mortas (%)	Comprimento de Radícula (cm)
I16	0,00 a	17,00 a	83,00 c	0,155 a
U13	0,00 a	35,50 b	64,50 b	1,450 b
U4	0,00 a	34,00 b	66,00 b	1,325 b
M3	0,50 a	47,50 b	52,00 a	1,270 b
M10	0,50 a	32,00 b	67,50 b	1,942 c
M6	1,00 a	37,00 b	62,00 b	1,765 c
I1	2,00 b	47,00 b	51,00 a	1,325 b
M9	2,00 b	36,50 b	61,50 b	1,760 c
I14	4,00 c	41,50 b	54,50 a	1,765 c
M8	6,00 d	39,50 b	54,50 a	2,365 d
Testemunha	2,00 b	41,50 b	56,50 a	1,415 b
CV (%) =	73,55	20,38	12,27	17,89

Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

O isolado I14 que apresentou redução do IVCM de 38,6%, estimulou a germinação de plântulas normais e apresentou uma das menores médias de sementes mortas. No entanto, a rizobactéria U4 e M6 apresentaram uma redução do IVCM média de 58,1%, porém foram prejudiciais na germinação de sementes de soja.

Há relatos na literatura de rizobactérias que auxiliam na germinação de sementes como também que inibem a sua germinação. Bernardino et al. (2015) observaram menores índices de germinação em sementes de alface microbiolizadas com *Bacillus subtilis*. Entretanto, Corrêa et al. (2008), verificaram que a combinação entre *Bacillus* spp. e *Pseudomonas fluorescens* promoveram incremento na

germinação das sementes de feijão (73%) além de reduzir a incidência de *Colletotrichum lindemuthianum* em 100%.

O crescimento radicular foi maior no tratamento com o isolado M8, seguido dos isolados M10, M6, I14 e M9. A testemunha não diferiu significativamente dos tratamentos U13, U4 e I1 (Tabela 4). A rizobactéria I16 apresentou redução do IVCM de 41,7%, porém foi prejudicial na germinação das sementes de soja e no crescimento radicular, resultando na menor média dentre os isolados (Tabela 3 e 4). Pacheco et al. (2014), observaram que isolados de *Paenabacillus lentimorbus* estimularam um maior desenvolvimento do sistema radicular de tomateiro, bem como isolados de *Bacillus pumilus*. Fato este, possivelmente associado com a produção ou alteração da concentração de fitormônios, a qual favorece um maior e melhor desenvolvimento das plântulas.

4.3- Efeito de rizobactérias na sanidade de sementes de soja

A incidência de fungos foi menor nos tratamentos M10, M8 e M3 quando comparados à testemunha, o que confirma o potencial de controle desses isolados à patógenos associados a sementes. Porém, nos tratamentos com os isolados I14, M9 e U13 foi verificado um aumento da incidência de fungos nas sementes (Tabela 5).

TABELA 5- Incidência de fungos em sementes de soja microbiolizadas com rizobactérias.

Tratamento	Incidência (%)
M10	9,00 a
M8	12,50 a
M3	19,50 a
M6	24,00 b
U4	25,50 b
I1	29,50 b
Testemunha	38,00 b
I16	61,00 c
I14	78,00 d
M9	79,00 d
U13	81,00 d
CV (%) =	21,64

Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

O isolado I14 com redução do IVCM de 38,6%, estimulou a germinação das sementes e obteve maior crescimento radicular nas plântulas normais, no entanto

apresentou aumento na incidência de patógenos nas sementes de soja quando comparado à testemunha. A bactéria M10 com redução do IVCM de 27,8%, o menor índice entre os tratamentos selecionados, foi prejudicial para a germinação das sementes, porém estimulou o crescimento radicular e apresentou a menor incidência de fungos nas sementes quando comparado aos demais tratamentos.

Análises de incidência e controle de fitopatógenos com a microbiolização de sementes com o uso de *Bacillus*, os isolados *B. licheniformis* e *B. pumilus* geraram efeito no controle de patógenos em sementes de soja em 99,83% e 99,22%, respectivamente (BEZERRA et al., 2013). Em sementes de milho, *Bacillus subtilis* e *Paenibacillus macerans* reduziram o nível de infecção de patógenos (LUZ, 2001).

O isolado que apresentou maior porcentagem de redução no índice de velocidade de crescimento micelial de 70,3% não diferiu da testemunha em nenhum outro parâmetro de germinação, crescimento radicular e incidência de patógenos de sementes.

Dentre os parâmetros avaliados: germinação, crescimento radicular, incidência de fungos e índice de velocidade de crescimento micelial de *S. sclerotiorum*, o isolado M8 apresentou o melhor resultado, apontando-o como promessa para pesquisas futuras no controle biológico (Figura 5).

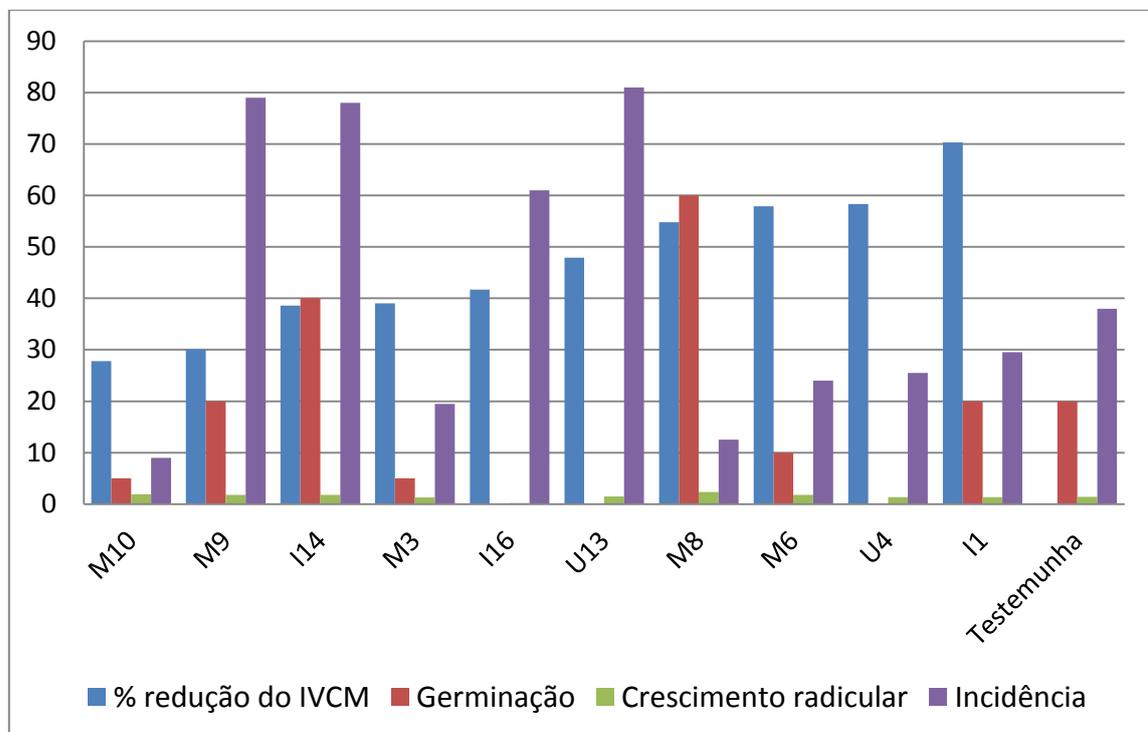


FIGURA 5- Resposta dos isolados aos parâmetros avaliados.

5 CONCLUSÃO

Foram obtidas 10 rizobactérias da rizosfera de plantas de soja que podem atuar como antagonistas ao patógeno *Sclerotinia sclerotiorum*. O isolado I1 é o mais eficiente entre os isolados rizobacterianos testados *in vitro*.

As avaliações de germinação e sanidade de sementes de soja demonstram rizobactérias que tiveram boa eficiência no controle de patógenos de sementes, sendo o isolado M8 o mais eficiente entre os tratamentos.

6 REFERÊNCIAS

AGROLINK. **Mofo branco: soja**. Deagro, 2014. Disponível em: <http://www.agrolink.com.br/culturas/soja/artigo/mofo-branco_194395.html>. Acesso em: 15 de fev. 2016.

AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia - Volume 1 – Princípios e Conceitos**. 4ª edição. São Paulo: Editora Agronômica Ceres Ltda, 2011.

BERNARDINO, D. L. M. P.; CANGUSSÚ, L. V. S.; AMARO, H. T. R.; NUNES, R. A.; FIGUEIREDO, J. C.; DAVID, A. M. S. S.; RIBEIRO, R. C. F. Uso de rizobactérias na germinação e vigor de sementes de alface. **9º FEPEG – Fórum de ensino, pesquisa, extensão e gestão**. 2015.

BETTIOL, W.; KIMATI, H. Efeito de *Bacillus subtilis* sobre *Pyricularia oryzae* agente causal da brusone do arroz. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 25, n. 8, 1990.

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.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB. Observatório agrícola. Acompanhamento da safra brasileira; grãos. Safra 2015/2016.

CORREIA, B. O.; MOURA, A. B.; DENARDIN, N. D.; SOARES, V. N.; SCHAFER, J. T.; LUDWIG, J. Influência da microbiolização de sementes de feijão sobre a transmissão de *Colletotrichum lindemuthianum* (Saac e Magn.). **Revista brasileira de sementes**, v. 30, n. 2, 2008.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Publicação fornece suporte para controle do mofo branco na soja**. Brasília: EMBRAPA, 2014. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/web/portal/busca-de-noticias/-/noticia/1749284/publicacao-fornece-suporte-para-controle-do-mofo-branco-na-soja>>. Acesso em: 15 de fev. 2016.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Importância da pesquisa em controle biológico natural é defendida como segurança nacional.**

Brasília: EMBRAPA, 2015. Disponível em: <
<https://www.embrapa.br/web/portal/busca-de-noticias/-/noticia/6576280/importancia-da-pesquisa-em-controle-biologico-natural-e-defendida-como-seguranca-nacional>>.
Acesso em: 15 de fev. 2016.

FERNANDO, W. G. D.; NAKKEERAN, S.; ZHANG, Y.; SAVCHUK, S. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary by *Pseudomonas* and *Bacillus* species on canola petals. **Science Direct**, Crop Protection, 26, 100-107, 2007.

FERREIRA, D. F. **Sisvar** - sistema de análise de variância para dados balanceados. Lavras: UFLA, p. 19, 1998.

FILIPPI, M. C. C. et al. Leaf blast (*Magnaporthe oryzae*) suppression and growth promotion by rhizobacteria on aerobic rice in Brazil. **Biological Control**, 58, 2011, 160–166.

FURLAN, S. H. Importância do tratamento de sementes no manejo de *Sclerotinia sclerotiorum*. **Informativo Abrates**, v. 20, n. 3, p. 58-61, 2010.

GALLI, F.; CARVALHO, P. C. T.; TOKESHI, H.; BALMER, E.; KIMATI, H.; CARDOSO, C. O. N.; SALGADO, C. L.; KRÜGNER, T. L.; CARDOSO, E. J. B. N.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia – Volume 2 – Doenças das Plantas Cultivadas**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres Ltda, 1980.

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.

HENNING, A. A. Patologia e tratamento de sementes: noções gerais. **Embrapa**, Documentos 264, Londrina, 2005.

KIMATI, H., AMORIM, L., REZENDE, J.A.M., BERGAMIN FILHO, A., CAMARGO, L.E.A. **Manual de Fitopatologia – Doenças das Plantas Cultivadas - Volume 2**. 4ª edição. São Paulo: Editora Agronômica Ceres Ltda, 2005.

KLOEPPER, J.W.; SCHROTH, M.N. Relationship of *in vitro* antibiosis of plant growthpromoting rhizobacteria to plant growth and the displacement of root microflora. **Phytopathology**, v. 71, p. 1020-1024, 1981.

LAZZARETTI, E.; BETTIOL, W. Tratamento de sementes de arroz, trigo, feijão e soja com um produto formulado à base de células e de metabólitos de *Bacillus subtilis*. **Scientia agricola**, v. 54, n. 1-2, 1997.

LUDWIG, J.; MOURA, A. B. Controle biológico da queima-das-bainhas em arroz pela microbiolização de sementes com bactérias antagonistas. **Fitopatologia brasileira**, v. 32, n. 5, 2007.

LUDWIG, J.; MOURA, A. B.; SANTOS, A. S.; RIBEIRO, A. S. Microbiolização de sementes para o controle da mancha-parda e da escaudadura em arroz irrigado. **Tropical plant pathology**, v. 34, n. 5, 2009.

LUZ, W. C. Efeito de bioprotetores em patógenos de sementes e na emergência e rendimento de grãos de milho. **Fitopatologia brasileira**, v. 26, n. 1, 2001.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – MAPA. Regras para análise de sementes. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília : Mapa/ACS, 2009.

MICHEREFF, S. J. **Fundamentos de Fitopatologia. Universidade Federal Rural de Pernambuco**. Recife: URP, 2001.

MONTEIRO, F. P.; FERREIRA, L. C.; PACHECO, L. P.; SOUZA, P. E. Antagonismo of *Bacillus subtilis* against *Sclerotinia sclerotiorum* on *Lactuca sativa*. **Journal of Agricultural Science**, v. 5, n. 4, 2013.

OLIVEIRA, J. A. Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativas* L.) e pimentão (*Capsicum annanum* L.). 111 f. **Dissertação** (Mestrado em Fitossanidade) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, 1991.

PACHECO, P. V. M.; RIBEIRO, R. C. F.; DAVID, A. M. S. S.; XAVIER, A. A.; SILVA, L. H. A.; FIGUEIREDO, J. C.; MADUREIRA, L. M. Microbiolização de sementes de

tomateiro com rizobactérias sobre características fisiológicas. **8º FEPEG – Fórum de ensino, pesquisa extensão e gestão**. 2014.

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.

RAMUSKA, A. C.; PRIA, M. D. Efeito de *Bacillus thuringiensis* e *Trichoderma* sp. No crescimento de fungos fitopatogênicos. **UEPG Ci. Exatas Terra, Ci. Agr. Eng.** v. 13, n. 3. 2007.

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

ROMEIRO, R. S. **Controle biológico de doenças de plantas – Fundamentos**. Viçosa: Editora UFV, 2013.

SOCIEDADE NACIONAL DE AGRICULTURA. **Perdas nas lavouras por causa do mofo branco podem chegar a 30%**. Rio de Janeiro: SNA, 2014. Disponível em: <<http://sna.agr.br/perdas-nas-lavouras-por-causa-do-mofo-branco-podem-chegar-a-30/>>, acesso em: 18 de fev. 2016.

TOZLU, E.; MOHAMMADI, P.; KOTAN, M. S.; NADAROGLU, H.; KOTAN, R. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, the causal agent of white mould disease in red cabbage, by some bacteria. **Plant protection science**, v. 9, n. 6, 2015.

ZAMBOLIM, L., JESUS JÚNIOR, W. C., RODRIGUES, F. A. **O Essencial da Fitopatologia – Controle de doenças de planta**. Viçosa: UFV, 2014.]

ZHANG, J. X.; XUE, A. G. Biocontrol of sclerotinia stem rot (*Sclerotinia sclerotiorum*) of soybean using novel *Bacillus subtilis* strain SB24 under control conditions. **Plant pathology**, v. 59, n. 2, 2009.