

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA CAMPUS
ITAQUI
CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA**

**METABÓLITOS RIZOBACTERIANOS NO CONTROLE
DE *Sclerotinia sclerotiorum* IN VITRO**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**Acadêmica: Ketlen Raisal Rey Rodrigues
Orientadora: Prof^a.Dr^a. Renata Silva Canuto de Pinho**

**Itaqui, RS, Brasil
2016**

KETLEN RAISA REY RODRIGUES

**METABÓLITOS RIZOBACTERIANOS NO CONTROLE
DE *Sclerotinia sclerotiorum* IN VITRO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Bacharelado Interdisciplinar em Ciência e Tecnologia da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), como requisito parcial para obtenção do grau de **Bacharel em Ciência e Tecnologia**.

Orientadora: Dr^a Renata Silva Canuto de Pinho.

**Itaqui, RS, Brasil
2016**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .

R456m Rey Rodrigues, Ketlen Raisa
METABÓLITOS RIZOBACTERIANOS NO CONTROLE DE Sclerotinia
sclerotiorum IN VITRO / Ketlen Raisa Rey Rodrigues.
31 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -- Universidade
Federal do Pampa, INTERDISCIPLINAR EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA,
2016.

"Orientação: Renata Silva Canuto de Pinho. Silva Canuto de
Pinho."

1. Mofo Branco. 2. controle biológico. 3. metabólitos. 4.
voláteis. I. Título.

KETLEN RAISA REY RODRIGUES

**METABÓLICOS RIZOBACTERIANOS NO CONTROLE DE
Sclerotinia sclerotiorum IN VITRO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso Bacharelado Interdisciplinar em Ciência e Tecnologia Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), como requisito parcial para obtenção do grau de **Bacharel em Ciência e Tecnologia**.

Trabalho de conclusão de curso defendido em 02 de dezembro de 2016.
Banca examinadora:

Renata Silva Canuto de Pinho

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

Orientadora

UNIPAMPA

Franciane Cabral Pinheiro

Franciane Cabral Pinheiro

UNIPAMPA

Luciana Zago Ethur

Prof^ª. Dr^ª. Luciana Zago Ethur

UNIPAMPA

Dedico... a minha mãe, Neuza Maria Rey pela fonte inesgotável de dedicação, carinho, paz, confiança e amor incondicional. A minha família, ao meu companheiro por serem a base na minha vida, e representarem tudo que há de mais precioso que alguém possa ter.

AGRADECIMENTOS

Gostaria primeiramente de agradecer a Deus, pelo dom da vida, pela saúde, fé, bênçãos e todas as conquistas alcançadas ao longo da minha caminhada.

À Universidade Federal do Pampa, aos meus mestres pelos ensinamentos, aos colegas pelo convívio, pelas histórias, amizade, “mate” e por fazerem parte deste sonho.

As técnicas do Laboratório Giovana e Franciane pela ajuda na execução do experimento, pela disposição, atenção, disponibilidade de tempo.

À minha banca examinadora Prof^a Luciana Zago Ethur e Franciane Cabral Pinheiro por aceitar me orientar e fazer desta jornada.

Aos colegas de grupo GEFIT, em especial as colegas, Morgana Stella e Renata Arns pela amizade, coleguismo, companhia, amizade, risos e ajuda e auxílio na execução deste trabalho e sonho.

Aos amigos de longa data só tenho a agradecer pela convivência, amizade e alegria.

.À minha amiga, parceira e colega Thaís Trindade Viçosa pela ajuda na escrita, pelo carinho e disponibilidade de tempo.

A minha amiga que torce por mim Suelen Pahim muito obrigado pela amizade, e ajuda na avaliação do experimento, pelas idas e vindas na UNIPAMPA em dias de sol e chuva, pela compreensão nos dias de desespero e por alegrar meus dias.

À minha família, por ser estar sempre presente e ser a fonte de inspiração e força nos momentos de fraqueza.

As minhas tias Norma Mariza Rey (in memoriam) e Joana Teresinha Rey (in memoriam) pelo privilégio do convívio em vida, pela criação, ensinamentos e boas recordações.

As minhas irmãs Carine Rey e Litza Caroline Rey pela convivência, amizade e companheiras da vida.

À meu cunhado por fazer parte de nossa família.

A meu sobrinho João Lohan Rey pelo amor descoberto, pelos ensinamentos, carisma e companheiro da vida.

Aos meu sogros Alcides Olindo Muraro e Gladis Gonçalves Muraro, pelo ensinamento da vida e sinônimo de vitalidade.

Um agradecimento mais que especial a minha Orientadora Professora Renata Silva Canuto de Pinho, por não desistir de mim e do meu sonho junto comigo, pelo convívio, orientação, paciência, amizade, carinho, força e dedicação. Sendo fonte fundamental para que essa etapa seja realizada e vencida.

Ao meu companheiro de todas as horas Thiago Muraro pela convivência, persistência, amor, amizade, carinho, cumplicidade, alegria, incentivo e confiança. Por ser perseverante, e estar ao meu lado nos momentos de fraqueza.

Em especial a minha amada, guerreira e companheira da vida toda, minha mãe Neuza Maria Rey, por ser minha força, minha inspiração, dedicação, por ser a responsável por tudo que tenho e sou hoje, dedico somente a ela, por ser a melhor mãe do mundo, pelo puxões de orelha, pelas brigas, pelos colos e ser minha fonte inesgotável de amor verdadeiro, sabedoria, inspiração. A todos que direta e indiretamente contribuíram para que fosse possível a conclusão dessa etapa.

“Devemos agradecer às pessoas que nos fazem felizes... são elas os jardineiros encantadores que fazem nossa alma florescerem!!!”

(Marcel Proust)

Que eu jamais me esqueça que Deus me ama infinitamente, que um pequeno grão de alegria e esperança dentro de cada um é capaz de mudar e transformar qualquer coisa, pois...

A vida é construída nos sonhos e concretizada no amor!!!

Chico Xavier

RESUMO

METABÓLICOS RIZOBACTERIANOS NO CONTROLE DE *Sclerotinia sclerotiorum* IN VITRO

A *Sclerotinia sclerotiorum*, que causa a doença conhecida como mofo branco, é considerado um dos patógenos fúngicos mais importantes no mundo e está distribuído em todas as regiões produtoras. O controle biológico é considerado atualmente uma alternativa atraente ao uso de agrotóxicos. Neste contexto, as rizobactérias podem atuar como agentes de controle biológico de doenças, uma vez que induzem resistência sistêmica em plantas, produzem antibióticos, substâncias voláteis, metabólitos, entre outros. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de substâncias voláteis e metabólitos produzidos por rizobactérias no crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum*. O experimento foi realizado no laboratório de Fitopatologia e Microbiologia do Solo da Universidade Federal do Pampa – Campus Itaqui. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com 11 tratamentos (dez rizobactérias mais a testemunha) e quatro repetições. O teste de metabólitos voláteis foi realizado com placas invertidas e sobrepostas. Inicialmente os isolados rizobacterianos foram repicados para o meio de cultura MB1 líquido e mantidos sob agitação por 24 horas à 120 rpm e temperatura de 25°C. Após 24 h, foi adicionado 0,1 mL de cultura do antagonista na superfície de uma placa de Petri contendo o meio de cultura MB1, sólido, espalhando com alça de Drigalsky. Em outra placa de Petri foi transferido um disco de 5 mm de diâmetro de micélio de *S. sclerotiorum* no centro contendo o meio de cultura BDA. Em seguida foi descartada a tampa de ambas as placas e foi utilizado o fundo de uma delas como tampa para outra. As placas foram vedadas e incubadas em câmara BOD à 25°C. A testemunha foi apenas a placa de *S. sclerotiorum* com a placa do meio MB1 sem a presença de bactérias. A avaliação do crescimento micelial do fungo foi realizada em intervalos de 24 horas, medindo-se o diâmetro da colônia. As medições foram realizadas até que o micélio da testemunha atingisse a borda da placa de Petri. O cálculo do Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM), foi determinado pelo diâmetro atual da colônia subtraído o diâmetro da colônia do dia anterior dividido pelo dia de números após a repicagem. Para o teste de metabólitos foram repicadas as rizobactérias em 100 mL de meio de cultura líquido MB1. Estes foram colocados numa mesa agitadora a 120 rpm durante 48 horas. Depois deste período, os frascos foram autoclavados por 40 minutos à 120°C. Após esse processo foram adicionadas 10% desse meio líquido no meio BDA. Em seguida, o meio foi vertido em placas de Petri e no centro foi colocado um disco de micélio de 5 mm de diâmetro de *S. Sclerotiorum*. As avaliações foram realizadas da mesma forma do teste anterior. 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. Todos os isolados de rizobactérias testados produzem voláteis e metabólitos hidrossolúveis que inibem o crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum*. Os isolados rizobacterianos I1 e M6 demonstram-se como mais promissores para trabalhos futuros utilizando rizobactérias.

Palavras-Chaves: Mofo Branco, voláteis, metabólitos, controle biológico.

ABSTRACT

Sclerotinia sclerotiorum, which causes the disease known as white mold, is considered one of the most important fungal pathogens in the world and is distributed in all producing regions. Biological control is currently considered an attractive alternative to the use of agrochemicals. In this context, rhizobacteria can act as agents of biological control of diseases, since they induce systemic resistance in plants, produce antibiotics, volatile substances, metabolites, among others. The objective of this work was to evaluate the effect of volatile substances and metabolites produced by rhizobacteria on the mycelial growth of *Sclerotinia sclerotiorum*. The experiment was carried at the Laboratory of Phytopathology and Soil Microbiology of the Federal University of Pampa - Itaqui Campus. The experimental design was the completely randomized with 11 treatments (ten rhizobacteria plus the control) and four replicates. The volatiles test was performed with inverted and overlapping plates. Initially the rhizobacterial isolates were picked up into the liquid MB1 culture medium and kept under stirring for 24 hours at 120 rpm and 25 ° C. After 24 h, 0.1 mL of antagonist culture was added to the surface of a Petri dish containing the MB1 medium, solid, spreading with Drigalsky's loop. In another Petri dish a 5 mm diameter disc of *S. sclerotiorum* mycelium was transferred to the center containing the BDA culture medium. Then the cover of both plates was discarded and the bottom of one of them was used as cover for another one. Plates were sealed and incubated in a BOD chamber at 25 ° C. The control was only the *S. sclerotiorum* plate with the MB1 medium plate without the presence of bacteria. The evaluation of the mycelial growth of the fungus was carried out in intervals of 24 hours, measuring the colony diameter. Measurements were made until the mycelium of the control reached the border of the Petri dish. The calculation of the Mycelial Growth Rate Index (IVCM) was determined by the current diameter of the colony subtracted the diameter of the colony from the previous day divided by the day of numbers after the replication. For the metabolite test the rhizobacteria were picked in 100 mL of MB1 liquid culture medium. These were placed on a shaker table at 120 rpm for 48 hours. After this time, the vials were autoclaved for 40 minutes at 120 ° C. After this process 10% of this liquid medium was added in the BDA medium. The medium was then poured into Petri dishes and a 5 mm diameter mycelium disk of *S. sclerotiorum* was placed in the center. The evaluations were performed in the same way as the previous test. The data were submitted to analysis of variance and the means of each treatment were grouped by the Scott-Knott test at 5% probability. All the rhizobacterial isolates tested produce volatiles and water-soluble metabolites that inhibit the mycelial growth of *Sclerotinia sclerotiorum*. Isolates rhizobacterial I1 and M6 are shown to be more promising for future work using rhizobacteria.

Keywords: White mold, volatiles, metabolites, biological control.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*.....16
- Figura 2:** Monociclo do mofo-branco causado por *Sclerotinia sclerotiorum* em soja...17
- Figura 3:** Efeito de voláteis produzidos por rizobactérias no crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum*.....23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Isolados bacteriano obtidos da rizosfera dos municípios de Itaqui, Maçambará e Uruguaiana.....	20
Tabela 2 – Efeito de substâncias voláteis produzidas por rizobactérias no índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	22
Tabela 3 – Efeito de metabólitos rizobacteriano no índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	24

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	15
2.2 Controle Biológico com Rizobactérias.....	17
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1 Isolado de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	19
3.2 Produção de compostos voláteis.....	19
3.3 Produção de metabólitos rizobacterianos.....	20
3.4 Análise estatística.....	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
4.1 Produção de compostos voláteis.....	21
4.2 Produção de metabólitos rizobacterianos.....	23
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	24
REFERÊNCIAS	25

1. INTRODUÇÃO

O Mofo Branco em soja também conhecido como Podridão Branca é uma doença causada pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum*. Esta doença pode causar grandes reduções no rendimento de culturas tais como a soja e o feijão, atacando outras espécies comerciais (DELLEVALE FILHO & RODRIGUES JUNIOR, 2014).

Este fungo é considerado um dos patógenos fúngicos mais importantes no mundo e está distribuído em todas as regiões produtoras (LEITE, 2005). Estimasse que 6 milhões de hectares no Brasil apresentam a doença, número que preocupa já que a área com agricultura em nosso país é de 70 milhões de hectares cultivados, ou seja 8,6% das áreas estão com o patógeno (DELLEVALE FILHO & RODRIGUES JUNIOR, 2014).

Nas últimas décadas a agricultura brasileira tem passado por transformações, devido a uma conscientização sobre a preservação do meio ambiente. Neste contexto o interesse pela utilização do controle biológico tem se tornado uma alternativa mais sustentável tanto em relação na minimização dos danos agroecológico, quanto na redução de custos na produção agrícola (SOUZA, 2001).

Segundo Michereff (2001) o controle biológico de doenças de plantas pode ser definido como “a redução da densidade de inóculo ou das atividades determinantes da doença, através de um ou mais organismos”. A seleção de micro-organismos antagonista constitui a base essencial de todo o programa de controle biológico de doenças de plantas, sendo que todos os métodos de seleção são baseados em evidências em que o organismo interfere de algum modo, no desenvolvimento do patógeno ou na redução da doença, acarretando em algumas formas de destruição ou inibição do organismo pretendente. (MELLO, 2008 apud SOARES et al, 2011).

Os isolados bacterianos que promovem algum favorecimento à planta, após a colonização radicular, são denominados rizobactérias. Estes são capazes de promover a indução de resistência sistêmica nos vegetais, aumentar a tolerância a estresses abióticos devido à produção de etileno endógeno, produzir antibióticos, ser antagonico a fitopatógenos, entre outros. Quando benéficas às plantas e de vida livre no solo, são chamadas de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP) ou ainda de bactérias capazes de incrementar a produção (YIB) (GRAÇAS et al., 2015).

Muitos fitopatógenos como *Aphanomyces* spp., *Fusarium*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Thielaviopsis basicola* e *Verticillium* spp. São negativamente afetados por Rizobactérias promotora de crescimento, por meio da produção de metabólitos bacterianos, tais como antibióticos, cianeto de hidrogênio (HCN), quelantes de ferro e degradação da parede celular por enzimas (PLEZER, 2010; MELO 2016).

Devido ao potencial dessas rizobactérias no controle de fitopatógenos, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de metabólitos rizobacterianos no controle de *Sclerotinia sclerotiorum in vitro*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Sclerotinia sclerotiorum*

O patógeno *Sclerotinia sclerotiorum* pertence ao filo Ascomycetes, classe Leotiomycetes, ordem Helotiales, família Sclerotiniaceae, pertence ao grupo dos fungos mitospóricos. É conhecido mundialmente como “podridão branca” ou “mofo-branco” afetando diversas culturas (BOTELHO, 2011). Estima-se que cerca de 300 espécies vegetais são suscetíveis a *S. sclerotiorum*, a exemplo do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) e da soja (*Glycine max*), ambas de grande importância econômica (DELGADO et al, 2007).

O sintoma mais comum é aglomerados de micélios de coloração branca e aspecto cotonoso, sobre a área afetada, com ou sem presença de escleródios (CUNHA, 2010). Os escleródios (Figura 1) são estruturas primárias de resistência que medem de 0,5mm a 2,0mm com formas irregulares, de coloração clara no início e preta com o passar do tempo, podendo permanecer viáveis no solo por até 10 anos, sendo de fácil disseminação pelo vento (KIMATI, et al., 2005).

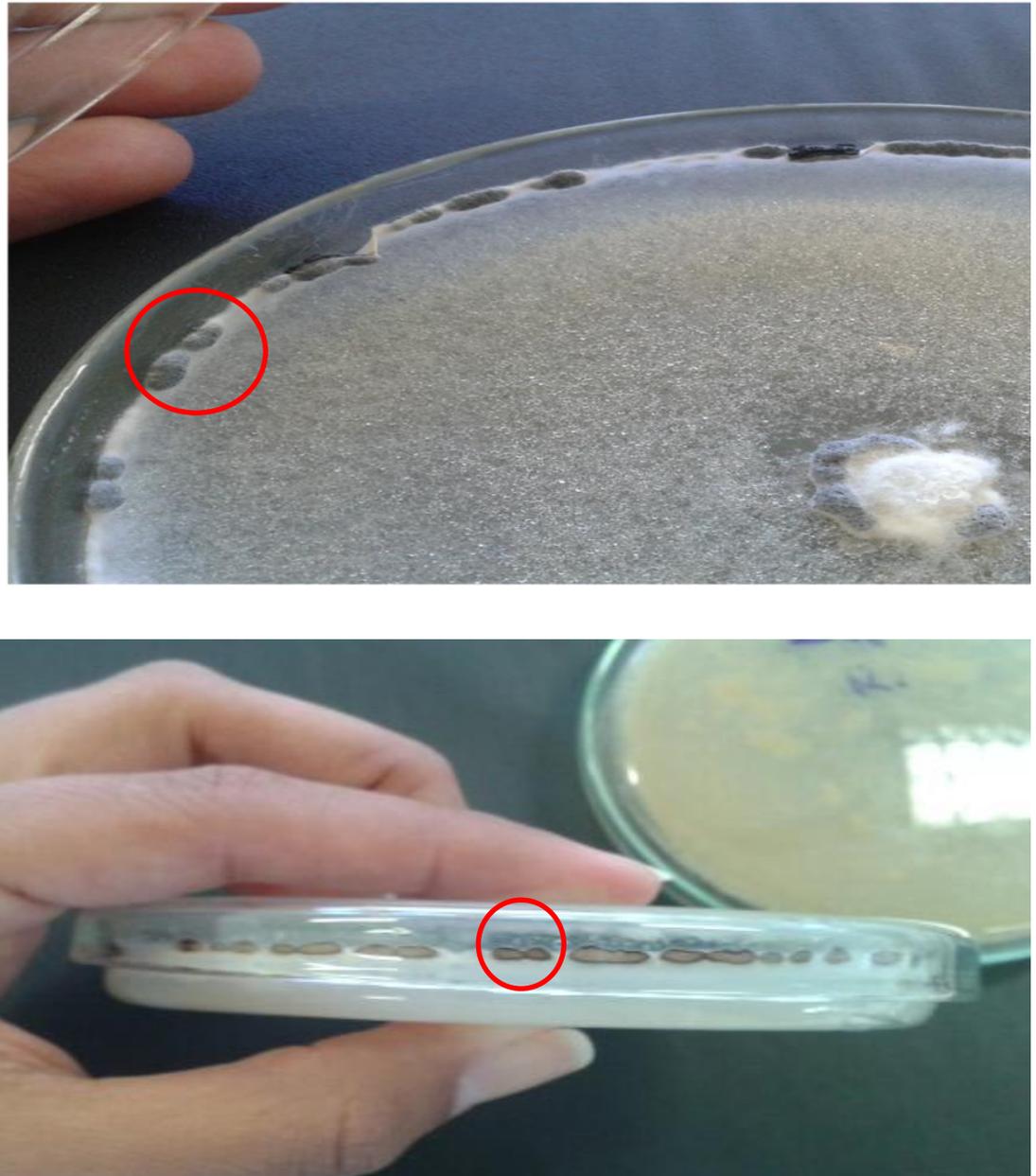


Figura 1: Escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*.

Fonte: REY, 2016.

Em condições climáticas favoráveis com temperaturas entre 10°C e 12°C, e em solos úmidos são condições necessárias para a germinação dos escleródios. Durante a colheita em áreas infestadas pelo patógeno, os escleródios podem ser misturados às sementes e se o beneficiamento não for o adequado, estas estruturas podem infectar o plantio da próxima safra(KIMATI, et al., 2005; LEITE, 2005; CUNHA, 2010).

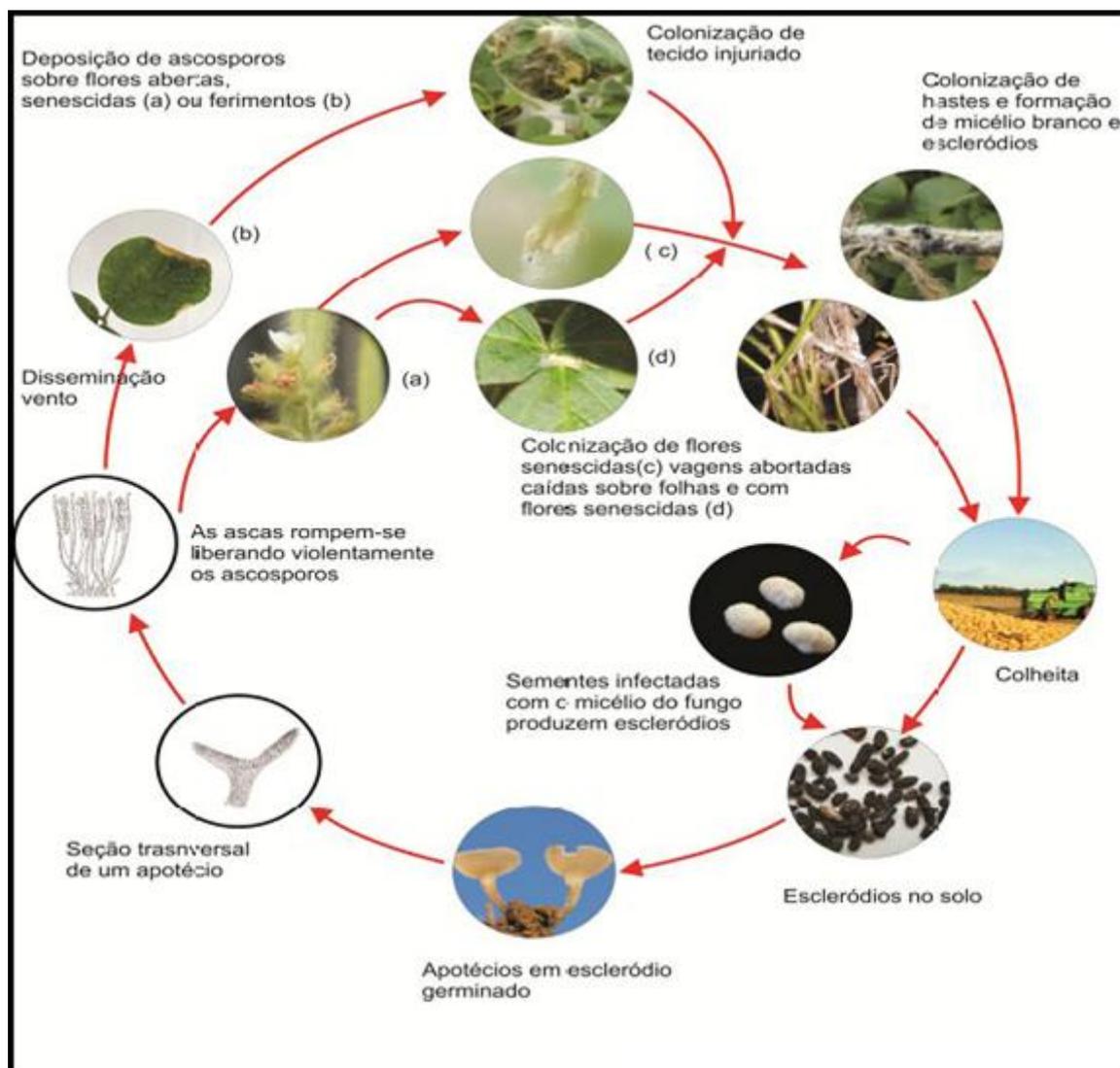


Figura 2: Monociclo do mofo-branco causado por *Sclerotinia sclerotiorum* em soja.

Fonte: REIS, et al. (2012) apud BATISTTI et al. (2016).

2.2 Controle Biológico com Rizobactérias

O controle biológico é uma alternativa de diminuir o potencial de inóculo ou das atividades determinantes do patógeno ou aumentar a resistência do hospedeiro, através de um ou mais organismos sem alterar o meio ambiente. Desta forma o controle baseia-se entre as relações de hospedeiro e antagonistas interagindo num sistema a fim de limitar a atividade do patógeno (MICHEREFF 2001; HECKLER et al., 2012).

Segundo Barbosa (2009) uma das alternativas de controle biológico que vem sendo usada no controle de doenças causados por patógenos de solos é a utilização

de rizobactérias, principalmente a fim de reduzir ou evitar utilização de defensivos agrícolas (GRIGOLETTI., et al, 2000).

Na década de 60 na China e na década de 70 nos Estados Unidos iniciaram-se à pesquisa no biocontrole de patógenos com rizobactérias. Porém, no Brasil, os o estudo do biocontrole com bactérias é mais recente (ROMEIRO, 2013).

Nos últimos anos com a busca de alternativas mais sustentáveis no controle de doenças sem agredir o homem e ao meio ambiente, as rizobactérias têm apresentado excelente alternativa, por agir em vários mecanismos como antibiose (por produção de enzimas líticas, toxinas ou ácido cianídrico), indução a resistência em plantas, competição (seja por nichos ecológicos ou nutrientes), fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato, e também por serem capazes de inibir o crescimento de outros organismos no solo (CIPRIANO, 2009 apud VIEIRA et al., 2013).

As rizobactéria ou bactérias rizosféricas existem em grande proporção na superfície próximas a parte radicular dos vegetais, onde se nutrem de exsudatos e lisados liberados por plantas, bem como fazem da rizosfera nicho ecológicos, na qual se abrigam e se protegem do antagonista da microbiota circulante (ROMEIRO,2013).

Dentre as principais rizobactérias promotoras de crescimento plantas (RPCPs) temos *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rizobium*, *Streptomyces*, *Bradyrhizobium*; *Acetobacter*, *Herbaspirillum*, *Agrobacterium radiobacter*, *Enterobacter cloacae* e *Burkholdeira cepacia*, das quais promovem ação direta e indireta (MARIANO et al., 2004).

Existem produtos comerciais à base de RPCPs, sendo as mais estudadas pertencentes ao grupo do gênero *Pseudomonas* e *Bacillus*.No entanto, as do gênero *Bacillus* apresentam desvantagem devido a sua viabilidade comercial ser inferior, quando comparado a *Pseudomonas*, por desenvolverem uma estrutura de resistência, denominada endósporo, produzida em condições adversas (CIPRIANO, 2009).

O ponto positivo do biocontrole é que apenas um antagonista ou um conjunto de micro-organismos desempenha mais de um mecanismo de atuação sobre o patógeno, apresentando resultados satisfatórios num determinado estágio de desenvolvimento da planta (CIPRIANO, 2009).

As rizobactérias podem produzir compostos antibióticos que atuam na supressão de patógenos da rizosfera. Os antibióticos são compostos orgânicos de baixo peso molecular que, em baixas concentrações, são deletérios ao crescimento ou a outras atividades metabólicas de outros organismos.Sabe-se que pirrolnitrina produzida por *Pseudomonas fluorescens* inibe o crescimento de *Rhizoctonia solani*,

Thielaviopsis basicola, *Alternaria* sp.e *Verticillium dahliae*. Os antibióticos, em geral, são inativados no solo e, portanto, sua ação só pode ser efetiva no tratamento de sementes (MELO,2016).

O antagonismo de rizobactérias contra fitopatógenos ocorre, principalmente, pela produção de diferentes polipeptídeos com ação antimicrobiana, como a mersacidina, micosubilitina, iturina, bacilomicina, fengicina, bacilicina e surfactina, bem como por estimuladores de crescimento do hospedeiro (CARRER, et al., 2015).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no período de agosto à novembro de 2016, no Laboratório de Fitopatologia e Microbiologia do Solo da Universidade Federal do Pampa – Campus Itaqui.

3.1 Isolado de *Sclerotiniasclerotiorum*

O isolado de *Sclerotiniasclerotiorum* utilizado no trabalho pertence à Micoteca do Laboratório de Fitopatologia. O isolado foi repicado para o meio de cultura BDA comercial (Batata-dextrose-ágar) na concentração de 39,9 g.L⁻¹ e incubados em BOD por 7 dias à 25°C.

3.2 Produção de metabólicos voláteis

Foram utilizadas no experimento dez rizobactérias selecionadas em trabalhos anteriores por Arns (2016).

Os isolados foram diferenciados e separados a partir da aparência visual das colônias bacterianas (ARNS, 2016).

Tabela 1: Isolados bacteriano obtidos da rizosfera dos municípios de Itaqui, Maçambará e Uruguaiana.

Municípios	Isolados
Itaqui/RS	I1
	I16
	I14
	M3
Maçambará/RS	M6
	M8
	M9
	M10
Uruguaiana/RS	U4
	U13

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado com 11 tratamentos (dez rizobactérias mais a testemunha) e quatro repetições.

O teste foi realizado com placas invertidas e sobrepostas (ROMEIRO, 2007). Inicialmente os isolados rizobacterianos foram repicados para o meio de cultura MB1 líquido (Kado e Heskett, 1970) e mantidos sob agitação por 24 horas à 120 rpm e temperatura de 25°C. O meio MB1 é composto por Sacarose (10,0 g), Caseína ácida hidrolisada (8,0 g), Extrato de Levedura (4,0 g), K₂HPO₄ (anidro) (2,0 g), MgSO₄.7H₂O (0,3 g) e Água destilada (1000 mL).

Após 24 h, foi adicionado 0,1mL de cultura do antagonista na fase logarítima de crescimento à superfície de uma placa de Petri contendo o meio de cultura MB1, porém sólido, espalhando com alça de Drigalsky.

Em outra placa de Petri foi transferido um disco de 0,5 cm de diâmetro de micélio de *S. sclerotiorum* no centro contendo o meio de cultura BDA. Em seguida foi descartada a tampa de ambas as placas e utilizado o fundo de uma delas como tampa para outra. As placas foram vedadas com filme de PVC e incubadas em câmara BOD à 25°C. A testemunha apenas a placa de *S. sclerotiorum* com a placa do meio MB1 sem a presença de bactérias.

As medições foram feitas no sentido vertical e horizontal, diariamente até a testemunha atingir o tamanho total da placa.

Com os dados foi realizado o cálculo do índice de velocidade de crescimento micelial, conforme a fórmula descrita por Oliveira (1991).

$$IVCM = \frac{\sum (D - D_a)}{N}$$

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

3.3 Produção de metabólitos rizobacterianos não voláteis

As rizobactérias foram repicadas em placas de Petri contendo o meio MB1, visando colônias bacterianas novas, e incubadas em BOD a 28°C por 24h.

As suspensões bacterianas foram preparadas repicando as rizobactérias em 100 mL de meio de cultura líquido MB1. Estes foram colocados numa mesa agitadora a 120 rpm durante 48 horas. Depois deste período, os frascos foram autoclavados por 40 minutos à 120°C.

Após esse processo foram adicionados 10% da suspensão bacteriana autoclavada e diluído em 90 mL de meio de cultura BDA. Em seguida o meio BDA foi vertido em placas de Petri e no centro foi colocado um disco de micélio de 0,5 cm de diâmetro de *S. Sclerotiorum*.

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado com 11 tratamentos (dez rizobactérias mais a testemunha) e quatro repetições.

As medições foram feitas no sentido vertical e horizontal, diariamente até a testemunha atingir o tamanho total da placa. Foi calculado o IVCM como no experimento anterior.

3.4 Análise estatística

Os dados de IVCM foram submetidos às análises de variância e teste de média Scott & Knott, ao nível de 5% de probabilidade. O programa estatístico SISVAR foi utilizado para realizar as análises (Ferreira, 2008).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Produção de compostos voláteis

Todos os isolados de rizobactérias testados inibiram o crescimento micelial de *S. sclerotiorum in vitro* quando comparados com a testemunha. A porcentagem de redução em relação à testemunha foi acima de 92,9% para todos os isolados testados (Tabela 2 e Figura 2).

Tabela 2 – Efeito de substâncias voláteis produzidas por rizobactérias no índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) de *Sclerotiniasclerotiorum*.

Tratamento	IVCM	Controle (%)
M8	0,00 a	100
M10	0,00 a	100
M9	0,00 a	100
I1	0,02 a	99,2
M6	0,03 a	99,1
U4	0,05 a	98,5
U13	0,08 b	97,5
I16	0,10 b	96,9
M3	0,12 b	96,3
I14	0,23 c	92,9
Testemunha	3,25 d	-
CV (%)	21,2	

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

Segundo Silva (2012) e seus colaboradores testaram produtos a base de *Trichoderma* e *Bacillus*, e verificaram os produtos a base de *Trichoderma* são mais eficientes que *Bacillus*, com isso reforçam a hipótese de Harman (2004) em que a eficiência de antagonistas quando aplicados em plântulas na proteção de agentes fitopatogênicos está diretamente relacionadas as habilidades de tais organismos antagonistas de colonizarem e sobreviverem no meio onde forem introduzidos.

De acordo com os resultados (Tabela 2 e Figura3) pode se verificar que os isolados M8, M10, M9 e I1 reduziram em 100% o crescimento micelial em relação a testemunha.

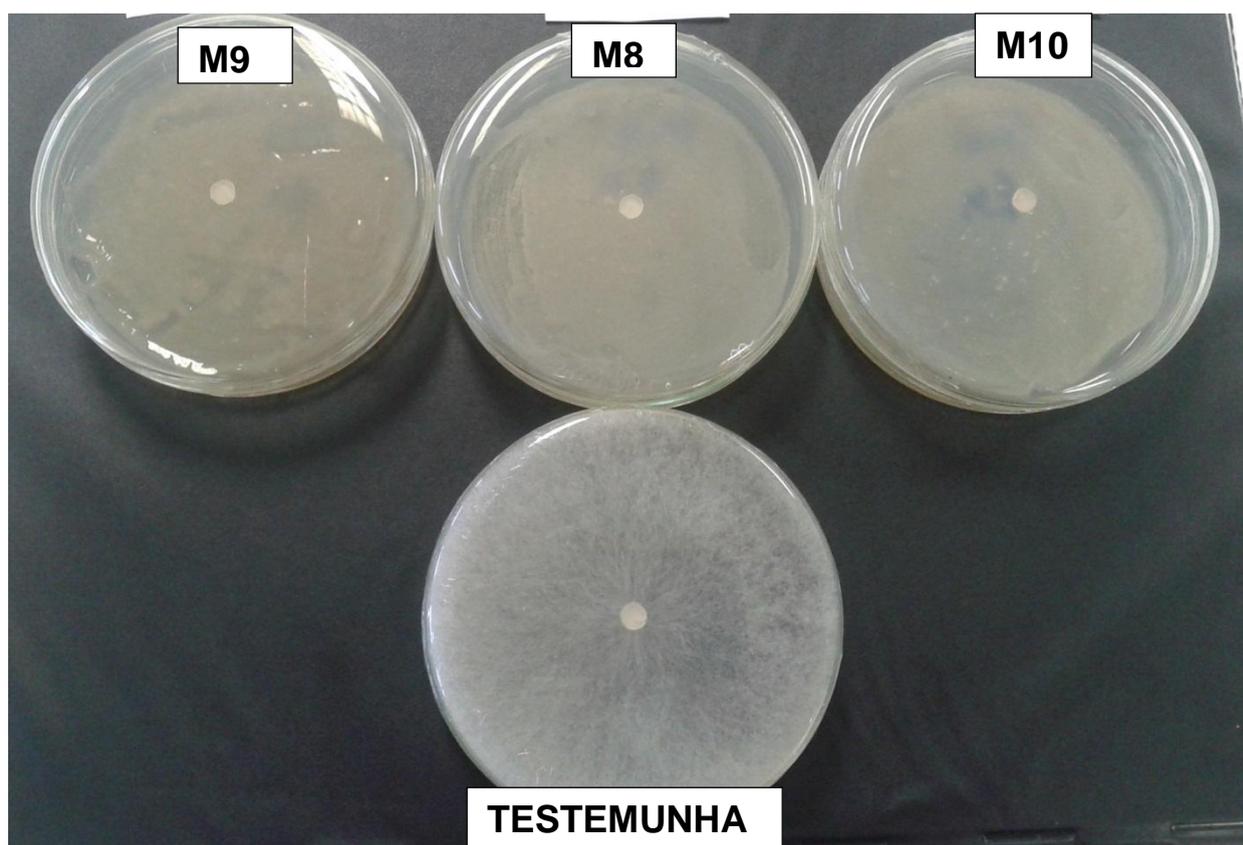


Figura 3: Efeito de metabólicos voláteis produzidos por rizobactérias no crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum*.

Bactérias antagonistas podem produzir substâncias voláteis capazes de inibir o crescimento e, ou, a multiplicação de outros micro-organismos (MADIGAN et al., 2003). Entre essas substâncias citam-se álcoois, aldeídos, cetonas, sulfetos (DUFFY et al., 2003). Outra substância que pode ser sintetizada por bactérias antagonistas é o ácido cianídrico (HCN), que é um potente inibidor de enzimas envolvidas na respiração de micro-organismos (ROMEIRO, 2007).

4.2 Produção de metabólitos rizobacterianos não voláteis

Em relação a produção de metabólitos rizobacterianos hidrossolúveis todos os isolados diferiram da testemunha. No entanto, os isolados I1, M3, M6 e U13 não se diferem estatisticamente, se destacando, com reduções entre 88,7% a 93,8% (tabela 3).

Tabela 3 – Efeito de metabólitos rizobacteriano no índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) de *Sclerotinia sclerotiorum*.

Tratamento	IVCM	Controle (%)
I1	0,11 a	93,8
M3	0,12 a	93,23
M6	0,18 a	89,83
U13	0,20 a	88,70
M10	0,25 b	84,74
U4	0,30 b	82,49
M9	0,38 b	78,53
M8	0,72 c	59,33
I14	0,89 d	49,71
I16	0,96 d	45,76
Testemunha	1,77 e	-
CV (%)	26,45	-

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

Outros trabalhos demonstraram também o efeito de metabólitos bacterianos no crescimento micelial de *S. sclerotiorum*. Monteiro et al. (2013), testaram diferentes concentrações de *Bacillus subtilis* no controle de crescimento micelial de *S. sclerotiorum* 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 no controle *in vitro* de *S. sclerotiorum* por Zhang e Xue (2009). Eles observaram que houve controle no crescimento micelial em 75%.

De acordo com CARDOSO, et al. (2014) apud LANA FILHO, et al. (2010), a inibição do crescimento de patógenos em teste de antibiose podem ser ocasionada não somente pela produção de compostos inibitórios mas pela competição de elementos essenciais ao metabolismo microbiano.

Comparando o teste de produção de voláteis com o teste de produção de metabólitos não voláteis podemos observar que os isolados I1 e M6 apresentaram as maiores reduções do crescimento micelial de *S. sclerotiorum*.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Todos os isolados de rizobactérias testados produzem metabólitos voláteis e metabólitos hidrossolúveis que inibem o crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum*.

Os isolados I1 e M6 demonstram-se como mais promissores para trabalhos futuros utilizando rizobactérias.

REFERÊNCIAS

ARNS, R. B. Efeito de rizobactérias no crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* e na germinação e sanidade de sementes de soja. **Trabalho de conclusão de curso**. UNIPAMPA. Itaquí –RS. 2016.

BARBOSA, R. N. T. Seleção de rizobactérias visando o controle biológico da murcha-de esclerócio em tomateiro (*Solanumlycopersicum L.*) **Revista Agroambiente on-line**. Universidade Federal de Roraima- Boa vista. 2009.

BATISTTI, A., ZATTI, J. J., CIEPLAK, A. J., DALLASTRA, T., FERRARI, G. A., TREVIZAM, K., MEIRELES, R., SANTOS, D. M., PIOREZAN, M., VARELLA, A. C. A., MACHADO, V. P.R., ALMEIDA, M. A. Estratégia de controle do mofo branco em soja. **Mostra de iniciação Científica**. Instituto de desenvolvimento educacional do alto Uruguai. Getúlio Vargas/RS.

BARRA, V.R., SILVA, R., FERRAZ, H. G. M., MACAGNAN, D., SILVA, H. S. A., MOURA, A. B., VIEIRA, B. A. H. MENDONÇA, H. L. VIEIRA, J. R. J. Potencialidade antagonística detectada em alguns procariontes agentes de biocontrole de enfermidades de plantas. **Summa Phytopathol.** V.34, n.2, 2008.

BRANDÃO, R. S., ULHOA, C. J., LOBO, M. J. Seleção de *Trichoderma* spp. visando o controle de *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium solani* *in vitro*. **Embrapa Arroz e Feijão**. Goiânia-GO.

BOTELHO, L.S. Detecção, Transmissão e Efeitos de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de soja. **Dissertação de Doutorado**. Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2011.

CARDOSO, S. V. D., ISHIDA, A. K. N., FREIRE, A. N. R., SILVA, C. T. B., VIEIRA, B. A. H. Efeito de bactérias do filoplano no biocontrole de *Rhizoctonia solani*. **Embrapa Meio Ambiente** – Amazônia, 2014.

CARRER, R. F., DIANESE, E. C., CUNHA, M. G. Supressão da murcha de fusário em tomateiro por rizobactérias do gênero *Bacillus*. **Pesq. Agropec. Trop.**, Goiânia, v. 45, n. 3, p. 356-363, 2015.

CIPRIANO, M. A. P. Potencial de *Pseudomonas spp.* Na promoção de crescimento e no controle de *Pythium* em alface cultivada em sistema hidropônico. Dissertação de Mestrado. Instituto Agronômico pós-graduação. Campinas – SP, 2009.

CUNHA, W. G. Resistência a *Sclerotinia Sclerotiorum* em plantas de soja geneticamente modificadas para expressar o gene de oxalato descarboxilase de *Flammulina velutipes*. **Tese pós graduação em Biologia molecular**. Universidade de Brasília-2010.

DELGADO, G.V., Martins, I., Menêzes, J. E., Macedo, M.A., Mello, S. C. M. Inibição do crescimento de *Sclerotinia sclerotiorum* por *Trichoderma spp. in vitro*- Brasília, DF: **Embrapa Recursos Genéticos eBiotecnologia**, 2007.

DELLEVALE, C. R. F., RODRIGUES, R. R. J. **Mofa Branco Soja**. Agrolink Disponível:<http://www.agrolink.com.br/culturas/soja/artigo/mofobranco_194395.html> Acesso:11set, 2016.

DIGLEY, O. D. F., BARBIAN, J. M., GONÇALVES, E. D.V., BROETTO, L., ETHUR, L. Z., KUHN, O. J., BONETT, L. P. Inibição do crescimento in vitro de *Sclerotinia sclerotiorum*, causador de mofo branco, por isolados de *Trichoderma spp.* **Revista Brasileira de Biociências**, v. 12, n. 3, p. 132-136, Porto Alegre/RS 2014.

DUFFY, B.; SCHOUTEN, A.; RAAIJMAKERS, J. M. Pathogen self-defense: mechanisms to counteract microbial antagonism. **Annual Review Phytopathology**, v. 41, p. 501-538, 2003.

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

GRAÇAS, J. P., RIBEIRO, C., COELHO, F. A. A., CARVALHO, M. E. A., CASTRO, P. R. C. Microrganismos estimulantes na agricultura. **Série Produtor Rural** - nº 59. Piracicaba – SP, 2015.

GRIGOLETTI, A. J., SANTOS, Á. F., AUER, C.G. Perspectivas do uso do controle biológico contra doenças florestais. **Revista Floresta** V.30, n.12, pag 155-165. Embrapa floresta, Colombo –PR. 2000.

HARMAN, G. E. et al. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Review Microbiology**. V.2, p. 43-56, 2004.

HECKLER, L. I., SILVA, G. B. P., SANTOS, R. F., SCHEEREN, L. E., FINGER, G. BLUM, E. Produtos biológicos no controle de mofo branco em diversas culturas. **Trabalho de Pesquisa** Universidade Federal de Santa Maria UFSM – 2012.

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

LANA FILHO, R., ROMEIRO, R. S., ALVES, E. Bacterial spot and early blight biocontrol byepipytyc bactéria in tomato plants. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. V.45, n.12, p1381-1987,2010.

LEITE, R. M.V.B.C. Ocorrência de doenças causadas por *Sclerotinia sclerotiorum* em girassol e soja. **EMBRAPA** Londrina-PR, 2005.

MARIANO, R. L. R., SILVEIRA, E. B., ASSIS, S. M. P., GOMES,A. R. P., DONATO, V. M. T. S. Importância de Bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, Recife, vol. 1, p.89-111, 2004.

MARRONI, I. V., GERMANI, J. C. Eficiência de rizobactérias *Bacillus spp.* no controle in vitro de *Macrophomina phaseolina* agente etiológico da podridão de tronco da mamona (*Ricinus communis L.*). **Pós-Graduação de Microbiologia Agrícola e do Ambiente/ UFRGS**, Revista Brasileira de Agroecologia Rev. Bras. de Agroecologia. p.159-167, Porto Alegre/RS,2011.

MELO, I. S. Biorremediação. Agência Embrapa de Informação Tecnológica (AGEITEC) Brasília – DF. Disponível em:<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agricultura_e_meio_ambiente/arvore/CONTAG01_68_410200710544.html> acesso em: 08/10/2016.

MEYER, M. C., CAMPOS, H. D, GODOY, C. V., UTIAMADA, C. M. Ensaios cooperativos de controle químico de mofo branco na cultura da soja: safras 2009 a 2012. **Embrapa Soja**. Londrina-PR, 2014.

MICHEREF, S. J. **Fundamentos de fitopatologia. Controle biológico de doenças de plantas**. Universidade Federal Rural de Pernambuco, p-123, Recife, 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 semente no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativa L.*) e pimentão (*Capsicum nanum L.*) 1991. 111f. Dissertação **Mestrado em Fitossanidade** – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, 1991.

OLIVEIRA, K. S., Atividade antimicrobiana de metabólicos proveniente de fungos isolados do solo. **Trabalho de conclusão de curso**, Centro Universitário de Brasília- UniCEUB– FACESBrasília,2013.

PEREIRA, F. S., BORGES, L. P., GUIMARÃES, G. R., SILVA, A. L., GONÇALVES, R. N., CARVALHO, L. R., TEIXEIRA, I. R. Estratégia de controle de mofo branco do feijoeiro. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.9, n.17; p. 2013.

PELZER, G.Q. Mecanismos de controle da murcha-de-esclerócio e promoção de crescimento em tomateiro mediados por rizobactérias. **Dissertação de pós-graduação**. Universidade Federal de Roraima, Roraima- Boa vista, 2010.

PRANDO, M.B. Efeito do tratamento químico na qualidade sanitária e fisiológica de semente de soja infectada por *Sclerotinia Sclerotiorum*. **Dissertação de Mestrado**.

Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” Faculdade de Ciências Agronômicas. Botucatu – São Paulo 2014.

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.

SILVA, C. E.O., MORANDI, M. A. B. Controle biológico de *Sclerotinia sclerotiorum* POR *Coniothyrium minutans*: ensaios preliminares. **Graduação em Ciências Biológicas**, UNIPINHAL – Centro Regional Universitário de Espírito Santo do Pinhal Espírito Santo do Pinhal – São Paulo 2009.

SILVA, G. B. P., HECKLER, L. I., SANTOS, R. F., SCHEEREN, L. E., FINGER, G., MÜLLER, J. DURIGON, M. R., BLUME, E. Biocontrole *In vivo Sclerotinia sclerotiorum*, utilizando produtos comerciais à base de *Trichoderma spp.* E *Bacillus subtilis*. **Trabalho de pesquisa**. Universidade Federal de Santa Maria UFSM- RS. 2012.

SOARES, E. P. S., AZEVEDO, D. M. Q., RODRIGUES, G. R., FROIS, M. R. SILVA, G. C. G. SALES, NILZA, L. P. Atividade antagonista de oito isolados de *Trichoderma ssp.* A dois de *Fusarium SP.*, *in vitro*. Resumo de congresso Brasileiro de fitopatologia- Fortaleza/CE, 2011.

SOUZA, M. L. Utilização de Microorganismo na Agricultura. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. Pesquisa Embrapa Recursos genéticos e biotecnologia. Nº 21. 2001.

VIEIRA, J.R J., FERNANDES, C. F., ANTUNES, H. J., SILVA, M. S., SILVA, D. S. G., SILVA, U. O. Rizobactérias como agentes de controle biológico e promotores de crescimento de plantas **Embrapa**. Porto Velho-RO, 2013.

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