

ARIELE CRISTINA MOREIRA SANTOS

**SELEÇÃO DE *Bacillus* spp. PARA CONTROLE DE *Sclerotinia sclerotiorum* E
PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO EM FEIJOEIRO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, Campus Rio Paranaíba, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Liliane Evangelista Visôto

Coorientador: Everaldo Antônio Lopes

**RIO PARANAÍBA – MINAS GERAIS
2021**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da Universidade Federal
de Viçosa - Campus Rio Paranaíba**

T

S237s
2021 Santos, Ariele Cristina Moreira, 1996-
Seleção de *Bacillus* spp. para controle de
Sclerotinia sclerotiorum e promoção de crescimento do feijoeiro /
Ariele Cristina Moreira Santos. – Rio Paranaíba, MG, 2021.
29 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Liliane Evangelista Visôto.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: 25-29.

1. Controle Biológico. 2. Mofo Branco. 3. Manejo Integrado de
Doenças. I. Universidade Federal de Viçosa.
Pós-Graduação. Mestrado em Agronomia (Produção Vegetal).
II. Título.

635.652

ARIELE CRISTINA MOREIRA SANTOS

**SELEÇÃO DE *Bacillus* spp. PARA CONTROLE DE *Sclerotinia sclerotiorum* E
PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO EM FEIJOEIRO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, Campus Rio Paranaíba, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 26 de fevereiro de 2021

Assentimento:



Arielle Cristina Moreira Santos
Autora



Liliane Evangelista Visotto
Orientadora

*A Deus, meus familiares e
aos meus amigos...
companheiros de todas
as horas...*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela dádiva da vida e por me permitir realizar tantos sonhos nesta existência.

A minha avó Geralda, pelo amor, incentivo e apoio incondicional; meus pais, Newton e Carmem; meu irmão, Cauê; meus avôs José Martins (*in memoriam*) e Antônio, minha avó Luzia; meu namorado, Luan; tios e tias; primos e primas; pelo apoio, carinho e bênçãos que derramam sobre mim todos os dias. Com vocês compartilho esta conquista.

A Universidade Federal de Viçosa – Campus Rio Paranaíba, ao programa de Pós-Graduação em Agronomia (Produção Vegetal) pela oportunidade de desenvolver esta dissertação. Agradeço a Fapemig pela concessão da bolsa de estudos. E em especial minha orientadora Prof^a Liliane Evangelista Visôto, Prof. Everaldo Antônio Lopes e Prof. Pedro Ivo Vieira Good God, pelas orientações e transmissão de conhecimentos que contribuíram para concretização deste trabalho.

Ao Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM), pela concessão do espaço para a condução do experimento. Aos professores do UNIPAM, em especial ao Walter Vieira da Cunha pela amizade, ensinamentos e contribuições.

Ao Laboratório de Genética e Biotecnologia (GENEB) e Laboratório de Fitopatologia e Microbiologia (NUMIF), em especial, Júlia, Letícia, Thaigoru, Nicolle, Rejane e Heloísa, pela amizade, companheirismo e auxílio na condução do experimento.

A empresa Nooa Ciência e Tecnologia Agrícola LTDA, pela parceria e enorme contribuição para realização deste trabalho. Em especial; Cícero, Marcelo, Luis, Leonardo, Juliana, Sairo, Lucas e Aurélio, pelo auxílio na correção do trabalho, disposição em sugerir e trocar ideias.

A todos meus amigos, em especial a Mariana, pelo auxílio nas disciplinas, experimentos, trabalhos e pelo companheirismo incontestável desde o início desse sonho. As amigas Amanda, Nayara, Andréia e Viviane, pela amizade, conselhos, momentos de descontração e conversas que proporcionaram calma.

A todos que contribuíram de alguma maneira para conclusão deste trabalho, toda minha gratidão a vocês!

RESUMO

SANTOS, Ariele Cristina Moreira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa Viçosa - Campus Rio Paranaíba, fevereiro de 2021. **Seleção de *Bacillus* spp. para controle de *Sclerotinia sclerotiorum* e promoção de crescimento em feijoeiro.** Orientadora: Liliane Evangelista Visôto. Coorientador: Everaldo Antônio Lopes.

Algumas bactérias suprimem o desenvolvimento de fungos fitopatogênicos e podem contribuir para o manejo integrado de pragas. Assim, o objetivo deste estudo foi selecionar isolados de *Bacillus* spp. com potencial antagônico para o controle de *Sclerotinia sclerotiorum*. Foram avaliadas a supressão do crescimento micelial e inibição da germinação de escleródios de *S. sclerotiorum* por substâncias difusíveis e voláteis produzidas por 12 isolados de *Bacillus* spp. O efeito desses isolados na redução da incidência de doença e promoção do crescimento em plantas de feijão também foi avaliado. Dentre os isolados, GB01, GB05, GB13, GB14 e GB16 produziram substâncias difusíveis capazes de inibir o crescimento micelial em 39,0; 23,7; 19,6; 26,5 e 15,3 %, respectivamente. Os isolados GB10, GB01, GB14 e GB16 inibiram em 47,1; 60,0; 69,0 e 100% a germinação dos escleródios em temperatura de incubação de 20 °C e em 47,1; 60,0; 69,0 e 100,0 % a 28°C, respectivamente. Observou-se também que o tempo de 30 min. de exposição à solução dos *Bacillus* spp. foi mais eficiente na inibição da germinação dos escleródios, comparado ao tempo de 0 min. Compostos orgânicos voláteis produzidos pelos isolados bacterianos não reduziram o desenvolvimento de *S. sclerotiorum* e a germinação dos escleródios. Os isolados GB01, GB14 e GB16, selecionados nos testes *in vitro*, foram avaliados quanto à capacidade de promover crescimento de feijoeiros e reduzir a incidência de mofo branco. O percentual de plantas doentes variou entre 0 % (isolado GB14) e 12,5 % (Controle negativo). Nenhum isolado de bacteriano promoveu crescimento de feijoeiros. Os isolados GB01, GB14 e GB16 de *Bacillus* spp. apresentam potencial para uso no biocontrole de *S. sclerotiorum*, no entanto, é necessário o estabelecimento de padrões que adequem as particularidades quanto a adaptação desses microrganismos ao ambiente.

Palavras-chave: Controle Biológico. Mofo Branco. Manejo Integrado de Doenças. Fitossanidade.

ABSTRACT

SANTOS, Ariele Cristina Moreira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa - Viçosa - Campus Rio Paranaíba, February, 2021. **Selection of *Bacillus* spp. for the control of *Sclerotinia sclerotiorum* and growth promotion in common bean.** Adviser: Liliâne Evangelista Visôto. Co-adviser: Everaldo Antônio Lopes.

Some bacteria suppress the development of phytopathogenic fungi and can contribute to integrated pest management. Thus, the aim of this study was to select isolates of *Bacillus* spp. with antagonistic potential for the control of *Sclerotinia sclerotiorum*. The suppression of mycelial growth and inhibition of the germination of sclerotia of *S. sclerotiorum*, by diffusible and volatile substances produced by 12 isolates of *Bacillus* spp., were evaluated. The effect of these isolates on reducing the incidence of disease and promoting growth in bean plants was also evaluated. Among the isolates, GB01, GB05, GB13, GB14 and GB16 produced diffusible substances capable of inhibiting mycelial growth by 39.0; 23.7; 19.6; 26.5 and 15.3 %, respectively. Isolates GB10, GB01, GB14 and GB16 inhibited by 47.1; 60.0; 69.0 and 100 % the germination of sclerotia at an incubation temperature of 20°C and 47.1; 60.0; 69.0 and 100.0 % at 28°C, respectively. The time of 30 min. of exposure to *Bacillus* spp. it was more efficient to inhibit the germination of sclerotia, compared to the time of 0 min. Volatile organic compounds produced by bacterial isolates did not reduce the development of *S. sclerotiorum* and the germination of sclerotia. The isolates GB01, GB14 and GB16, selected in the in vitro tests, were evaluated for their ability to promote the growth of beans and reduce the incidence of white mold. The percentage of diseased plants varied between 0% (isolated GB14) and 12.5% (negative control). No bacterial isolate promoted bean growth. The isolates GB01, GB14 and GB16 from *Bacillus* spp. have potential for use in the biocontrol of *S. sclerotiorum*, however, it is necessary to establish standards that suit the particularities regarding the adaptation of these microorganisms to the environment.

Keywords: Biological control. White mold. Integrated Disease Management. Plant health.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	8
2. MATERIAL E MÉTODOS	10
2.1. Microrganismos e condições de crescimento	10
2.2. Análises antagonistas	11
2.2.1. Supressão do crescimento de <i>S. sclerotiorum</i> por substâncias difusíveis produzidas por <i>Bacillus</i> spp.	12
2.2.2. Inibição da germinação de escleródios de <i>S. sclerotiorum</i> por compostos difusíveis produzidos por <i>Bacillus</i> spp.	12
2.2.3. Supressão do crescimento de <i>S. sclerotiorum</i> por compostos orgânicos voláteis produzidos por isolados de <i>Bacillus</i> spp.	13
2.2.4. Inibição da germinação dos escleródios de <i>S. sclerotiorum</i> por compostos orgânicos voláteis produzidos por isolados de <i>Bacillus</i> spp.	14
2.3. Aplicação de <i>Bacillus</i> spp. para o manejo do mofo branco e a promoção de crescimento de plantas de feijão em casa de vegetação.....	14
2.3.1. Incidência de doença	15
2.3.2. Variáveis fotossintéticas	16
2.3.3. Variáveis de crescimento.....	16
2.4. Análises Estatísticas	17
3. RESULTADOS	17
3.1. Interação antagonista <i>in vitro</i> entre <i>S. sclerotiorum</i> e isolados de <i>Bacillus</i> spp.	17
3.2. Redução do crescimento micelial de <i>S. sclerotiorum</i> por isolados de <i>Bacillus</i> spp.	18
3.3. Inibição da germinação dos escleródios de <i>S. sclerotiorum</i> por isolados de <i>Bacillus</i> spp.	19
3.4. Inibição do crescimento micelial e germinação de escleródios de <i>S. sclerotiorum</i> por compostos orgânicos voláteis produzidos por isolados de <i>Bacillus</i> spp.	21
3.5. Manejo do mofo branco e a promoção de crescimento de plantas de feijão por cepas de <i>Bacillus</i> spp.	21
4. DISCUSSÃO.....	23
5. CONCLUSÕES.....	25
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25

1. INTRODUÇÃO

Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary é um fungo necrotrófico que causa a doença denominada podridão-de-esclerotinia, murcha-de-esclerotinia, ou mofo branco, sendo este último o nome mais comum. É considerado um dos patógenos mais devastadores e cosmopolitas, pois infecta mais de 400 espécies de plantas, incluindo culturas economicamente importantes, a exemplo de algodão, soja, girassol, feijão, grão de bico, amendoim, ervilha, cebola, cenoura, batata, tomate e morango (Bolton et al., 2006).

O fungo produz escleródios e pode permanecer viável no solo em condições adversas por até 10 anos. O escleródio possui forma arredondada ou alongada e é constituído por um agregado de hifas com alto teor de melanina, composto importante na proteção a condições adversas e degradação microbiana (Bell e Wheeler, 1986). A medula do escleródio é composta por carboidratos, principalmente β -glucanos e proteínas envolvidas por uma matriz fibrilar (Bolton et al., 2006). A maioria dos escleródios de *S. sclerotiorum* germina carpogenicamente, produzindo apotécios e subsequentemente ascósporos, que infectam partes das plantas hospedeiras acima do solo. Fatores ambientais condicionam a germinação carpogênica, incluindo a temperatura do solo (10-20°C), alta umidade (potenciais hídricos de 100 kPa por 1-2 semanas) e também a temperatura na qual os escleródios foram produzidos (Derbyshire et al., 2017). A doença geralmente se inicia em reboleiras na lavoura, principalmente nos locais de alta densidade e acamamento de plantas, o qual ajuda a manter a alta umidade do solo (Choi et al., 2017). Tecidos senescentes ou necróticos também contribuem como fonte de nutrientes, para iniciar o processo de germinação do ascósporo, dando origem à infecção micelial da planta hospedeira (Bolton et al., 2006).

Os sintomas do mofo branco ocorrem comumente em vagens, hastes, caules e folhas. Na parte aérea, o fungo pode causar lesões inicialmente pequenas e aquosas. Estas lesões rapidamente aumentam de tamanho, afetando todo o órgão e podem expandir para o pecíolo e caule. Com o desenvolvimento da doença, as partes afetadas perdem a cor, tornam-se amareladas e marrons, produzindo podridão mole nos tecidos (Barro et al., 2019). As lesões geralmente se desenvolvem em tecidos necróticos onde, subsequentemente aparecem manchas de micélio branco macio, que é o sinal mais óbvio de plantas infectadas por *S. sclerotiorum* (Fagundes-Nacarath

et al., 2018). Uma vez iniciada no hospedeiro, a infecção pode se espalhar para outras plantas através do contato planta a planta (Bolton et al., 2006).

Marcadores fortemente associados a genes de resistência e loci de características quantitativas (QTL) para resistência a *S. sclerotiorum*, já foram relatados em importantes culturas incluindo soja, girassol, feijão comum, colza e canola (McCaghey et al., 2017; Gyawali et al., 2016). No entanto, a resistência à *S. sclerotiorum* é uma característica genômica complexa, e há poucos cultivares comerciais resistentes ou parcialmente resistentes a essa doença, o que torna o manejo bastante difícil (Delton-Giles et al., 2018). Devido à falta de níveis adequados de resistência do hospedeiro, os fungicidas tem sido um dos principais métodos de controle para doenças causadas por *S. sclerotiorum* (Bardin e Huang, 2001). Os fungicidas são rotineiramente usados para impedir o estabelecimento de *S. sclerotiorum* no tecido vegetal, na tentativa de interromper o ciclo da doença. No entanto, o controle pode ser inconsistente devido as dificuldades em obter boa cobertura de pulverização e aplicação correlacionada com a liberação de ascósporos. Além disso, devido ao impacto do uso de pesticidas no meio ambiente e na cadeia alimentar, a agricultura convencional está sofrendo transição para uma agricultura mais sustentável (Pannullo et al., 2018). Em decorrência disso, bioprodutos estão sendo desenvolvidos com o objetivo de reduzir o uso de agroquímicos.

Vários microrganismos já foram relatados como agentes eficazes no biocontrole de doenças causadas por *S. sclerotiorum*, por exemplo, os fungos *Coniothyrium minitans* (Jajor et al., 2017) e *Trichoderma harzianum* (Zhang et al., 2016); e bactérias, como *Bacillus amyloliquefaciens* (Alvarez et al., 2011; Fernando et al., 2007), *Bacillus subtilis* (Sum et al., 2017) e *Pseudomonas chlororaphis* (Fernando et al., 2007). Espécies de *Bacillus* ssp. podem ser encontradas em vários ambientes, são fáceis de serem cultivadas, pois crescem rapidamente em grande número de substratos, e não são patogênicas para plantas superiores. São os principais antagonistas usados no controle biológico em escala global e algumas espécies podem promover o crescimento de plantas. Ansary et al. (2018) isolaram 16 diferentes morfotipos de *Bacillus*, três inibiram significativamente o crescimento de *S. sclerotiorum* através de alterações nas hifas e redução do peso seco micelial. Quando as sementes de pepino e arroz foram tratadas com as mesmas bactérias, observou-se aumento da germinação das sementes, do vigor e do crescimento de plântulas e do número de raízes por planta.

Alguns isolados de *Bacillus* spp produzem metabólitos antimicrobianos. Esses compostos incluem lipopeptídeos (iturina A, fengicina, bacilomicina D cíclica) (Gond et al., 2015; Sabaté et al., 2018), sideróforos (éster trimérico 2,3-diidroxibenzoato-glicina-treonina, bacilibactina) (Yu et al., 2011), policetídeos não ribossomais (bacilaeno, macrolactina e difucidina) (Chen et al., 2009), entre outros. A atividade de biocontrole exibida por espécies de *Bacillus* spp. também pode ser atribuída à produção de compostos orgânicos voláteis, que podem proteger diretamente as plantas contra fitopatógenos e / ou indiretamente pela indução de resistência. Dentre esses compostos, o ácido acético e 2-nonanona (Giorgio et al., 2015), a undecanona, o benzotiazol, 1,3-butadieno e a N,N-dimetildodecilamina demonstraram forte atividade inibitória sobre o micélio de *S. sclerotiorum* (Massawe et al., 2018).

Nesse sentido, a seleção de *Bacillus* spp. para o biocontrole de *S. sclerotiorum* pode ser considerada importante ferramenta no manejo da doença, aliada à sustentabilidade para a agricultura. Assim, o objetivo deste estudo foi selecionar isolados de *Bacillus* spp. com potencial antagônico para o controle de *S. sclerotiorum* e promoção de crescimento em feijoeiro.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Microrganismos e condições de crescimento

As cepas de doze *Bacillus* spp. foram fornecidas pelo acervo do Laboratório de Genética e Biotecnologia - GENE B do Centro Universitário de Patos de Minas - UNIPAM, localizado em Patos de Minas/MG. As bactérias desse acervo foram isoladas do solo em diferentes locais de mata nativa na região do Alto Paranaíba-MG, utilizando a metodologia descrita por Melo e Azevedo (2000). A pureza dos isolados recebidos foi avaliada pelo método de estriamento na placa de Petri, previamente preenchidas com 25 mL de meio de cultura ágar nutriente (AN), mantidas em estufa por 72 h a 30°C. Após esse período, foi avaliado se havia crescimento de apenas uma variedade de bactéria, observando morfologia, textura e formato. Certificada essa questão, realizou-se choque térmico nas amostras para preservação em solução de glicerol 50 % (v:v) e armazenamento em freezer (-20°C) na forma de esporos.

Para a multiplicação dos isolados, foi transferida uma colônia da cepa matriz para 45 mL de meio de cultura Luria Bertani (LB) e incubado a 30°C, e agitado a 200

rpm. Para visualização da esporulação foi realizada a microscopia das suspensões. Com 24 h de crescimento foi observado somente células vegetativas (de cor bem acinzentada). Com o passar do tempo houve consumo dos nutrientes, alteração de pH e com aproximadamente 48 h a célula entrou em estresse e então foi possível observar algumas células com endósporos (célula brilhante – esporo, dentro da célula vegetativa) iniciando a formação do córtex (camada mais externa do esporo) em sua volta. As 72 h de crescimento, o córtex do esporo estava completamente formado, houve lise celular e foi possível observar poucas ou nenhuma célula vegetativa. Nesse ponto, a bactéria estacionou seu ciclo, ficando inativa momentaneamente, no entanto, quando encontrar condições favoráveis, conseguirá retornar ao seu desenvolvimento normal. No experimento *in vivo*, por exemplo, foi necessário que o isolado atingisse a fase de esporulação, pois, a fase vegetativa é considerada frágil. O esporo por sua vez, mesmo com mudança de temperatura e pH, é capaz de se adaptar e se desenvolver.

O fitopatógeno *S. sclerotiorum* foi fornecido pelo Laboratório de Fitopatologia e Microbiologia - NUMIF do Centro Universitário de Patos de Minas - UNIPAM, localizado em Patos de Minas/MG. Nos testes *in vitro* foram utilizados discos de micélio e escleródios, e no teste *in vivo* foi usado discos de micélio para colonização do substrato arroz, como patógeno na planta. Para obtenção dos discos de micélio, placas de Petri contendo 30 mL de meio de cultura ágar dextrose - batata (BDA) foram preparadas a partir de um disco de micélio com cerca de 0,8 cm de diâmetro do acervo original e mantidas a 25°C em sala de crescimento até completa colonização do patógeno por toda superfície da placa.

Para aquisição dos escleródios com tamanho e viabilidade padronizados, o meio de cultura preparado foi caseiro a base de batata, açúcar e ágar (Dhingra e Sinclair, 1995). A partir da placa do acervo original, um disco de micélio com cerca de 0,8 cm de diâmetro foi transferido para placa contendo o meio de cultura caseiro e mantida a 25°C, em sala de crescimento até completa colonização do patógeno por toda superfície da placa. A partir dessa fase, a escassez de nutriente e espaço induz a produção dos escleródios (estrutura de resistência), que até encontrar ambiente propício para sua germinação, estaciona seu ciclo.

2.2. Análises antagonistas

2.2.1. Supressão do crescimento de *S. sclerotiorum* por substâncias difusíveis produzidas por *Bacillus* spp.

Para a determinação da atividade antagonista foram avaliados doze isolados de *Bacillus* spp. (GB01, GB05, GB08, GB09, GB10, GB11, GB12, GB13, GB14, GB16, GB24, GB26), um produto biológico comercial composto por *Bacillus subtilis* linhagem QST 713 Serenade® e um tratamento controle (sem a presença de bactéria).

O teste de antagonismo realizado foi o de confronto direto, utilizando o método de cultura pareada, descrito por Dennis e Webster (1971). Para isso, um disco de micélio de 0,8 cm de diâmetro do fitopatógeno foi depositado a 1,0 cm da borda em placa de Petri contendo BDA. Posteriormente, o isolado bacteriano foi transferido para o meio de cultura do lado oposto da placa a 1,0 cm da borda. O controle consistiu de um disco de micélio de 0,6 cm de diâmetro de *S. sclerotiorum*. As placas foram mantidas a 25°C por 14 dias ou até que o fungo do tratamento controle tenha crescido por toda superfície da placa. A área da colônia de *S. sclerotiorum* foi determinada através do programa Image Tool 3.0 (Uthscsa, 2019). A formação de halos de inibição entre as colônias foi registrada.

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado (DIC) com cinco repetições, considerando-se cada placa uma unidade experimental. O experimento foi conduzido duas vezes.

2.2.2. Inibição da germinação de escleródios de *S. sclerotiorum* por compostos difusíveis produzidos por *Bacillus* spp.

Vinte escleródios, foram imersos em suspensão bacteriana por 0 min. (transferência para o meio BDA logo após imersão) e 30 min. (transferência para o meio BDA após 30 min. de imersão). Dez desses escleródios foram retirados das placas e esterilizados superficialmente, por imersão em etanol 70 % (v / v) por 1 min., em solução de hipoclorito de sódio por 5 min. e enxague com água destilada estéril. Uma vez secos em papel de filtro, os escleródios foram transferidos para o meio BDA e incubados a 20°C por sete dias. Os outros dez escleródios restantes foram submetidos aos mesmos procedimentos descritos anteriormente; no entanto, foram mantidos a 28°C por sete dias. Essa etapa teve como objetivo avaliar se a temperatura

de incubação dos escleródios em temperatura mais favorável ao crescimento bacteriano afeta a germinação, já que 28°C pode favorecer o crescimento de eventuais isolados que tenham desenvolvimento mais lento a 20°C (Zancan et al., 2012).

Após o período de sete dias foram avaliados o número de escleródios germinados e, ou colonizados por bactérias, com auxílio de microscópio estereoscópico. O experimento foi realizado em DIC com esquema fatorial completo triplo 14x2x2 (isolados bacterianos x tempos de imersão na suspensão bacteriana x temperaturas de incubação), com cinco repetições, considerando-se cada placa uma unidade experimental. Os dados obtidos foram analisados em conjunto, em razão da ausência de interação entre os tempos e temperaturas dos experimentos e os isolados. Os números de escleródios germinados e, ou colonizados por bactérias foram convertidos para valores percentuais. O experimento foi conduzido duas vezes.

2.2.3. Supressão do crescimento de *S. sclerotiorum* por compostos orgânicos voláteis produzidos por isolados de *Bacillus* spp.

Os isolados de *Bacillus* spp. foram testadas quanto à sua capacidade de produzir substâncias voláteis que inibem o crescimento de *S. sclerotiorum* usando a técnica de placa dupla. Cem microlitros das suspensões bacterianas, preparados como descrito acima (item 2.1), foram transferidos para placas de Petri contendo ágar Luria Bertani (ágar LB). Três discos de micélio de 0,8 cm foram colocados na superfície do BDA em cada placa. Posteriormente, as placas de Petri contendo os discos miceliais foram colocadas invertidas sobre as placas ágar LB semeadas com a bactéria. Cada par de placas foi selado com filme plástico para evitar o extravasamento dos compostos voláteis bacterianos. As placas foram mantidas a 25°C por 5 dias. O tratamento controle foi preparado de maneira semelhante, mas sem bactéria. O diâmetro da colônia de *S. sclerotiorum* foi determinado após o controle ter crescido em toda superfície.

Para verificar se os voláteis bacterianos tinham ação fungicida ou fungistática, os micélios de *S. sclerotiorum* expostos a substâncias voláteis por 5 dias foram colocados em BDA fresco e mantidos a 25 °C por 5 dias, com posterior avaliação da capacidade de crescimento.

O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado (DIC), ensaio realizado duas vezes com três repetições.

2.2.4. Inibição da germinação dos escleródios de *S. sclerotiorum* por compostos orgânicos voláteis produzidos por isolados de *Bacillus* spp.

Com o objetivo de avaliar o efeito dos voláteis bacterianos sobre os escleródios de *S. sclerotiorum*, placas de Petri contendo BDA foram divididas em três setores. Em dois setores foram colocados escleródios (um escleródio por setor) e no terceiro setor foram aplicados 50 µL de suspensão bacteriana. O crescimento radial do micélio que cresceu nos escleródios foi determinado após 5 dias de incubação a 25°C. Para verificar viabilidade dos escleródios após exposição aos voláteis bacterianos por 5 dias, eles foram recolocados em BDA fresco e incubados a 25°C durante 5 dias, com posterior avaliação da capacidade de crescimento.

O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado (DIC). Os experimentos foram realizados duas vezes com três repetições por tratamento.

2.3. Aplicação de *Bacillus* spp. para o manejo do mofo branco e a promoção de crescimento de plantas de feijão em casa de vegetação

O cultivo de *S. sclerotiorum* foi feito em grãos de arroz. Para isso, 2 Kg de arroz foram mergulhados em água por mais ou menos 15 min. Após esse tempo, a água foi retirada e aproximadamente 400 g de arroz foram transferidos para sacos plásticos e autoclavados por 20 min. Após o resfriamento do substrato, 10 discos de micélio de *S. sclerotiorum* foram inoculados e mantidos a temperatura de $\pm 25^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa entre 70 e 80 % em sala de crescimento. A cada dois dias, os sacos contendo o substrato e o fungo foram revolvidos para entrada de oxigênio e para a obtenção de uma colonização uniforme e viável em todo o substrato.

Concentrações dos isolados bacterianos GB01, GB14 e GB16, selecionados nos testes *in vitro* contra *S. sclerotiorum*, foram determinadas através da técnica de diluição seriada para padronização (30 a 300 UFC mL⁻¹) (Brandi et al., 2019). Foram aplicadas concentrações de $1,61 \times 10^8$ UFC mL⁻¹ de GB01; $8,33 \times 10^7$ UFC mL⁻¹ de GB14 e $3,9 \times 10^7$ UFC mL⁻¹ de GB16.

Vasos plásticos de 3 L de capacidade foram preenchidos com solo autoclavado, artificialmente infestado com 15 g do arroz colonizado com o patógeno e adubado com 2 g de MAP [10 % a 12 % de Nitrogênio (N) amoniacal e 50 % a 54 % de P₂O₅ (fósforo)]. Em seguida, foi aplicada 100 mL de solução micronutriente (1,807 g de H₃BO₃, 2,405 g de CuSO₄.5H₂O, 2,926 g de FeCl₃.6H₂O, 5,141 g de MnCl₂.4H₂O, 0,134 g de NaMoO₄.2H₂O e 6,862 g de ZnSO₄.7H₂O diluídos em 13 L de água) e por fim, o solo foi irrigado com 400 mL de água.

Para semeadura foi feito um sulco de plantio na parte central do vaso, com aproximadamente 2 cm de profundidade, e colocadas quatro sementes de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*, L.) cv. Pérola por vaso.

As cepas de *Bacillus* spp. e o fungicida biológico comercial (*Bacillus subtilis* linhagem QST 713 Serenade®) foram aplicados 2 L ha⁻¹ no sulco de plantio, com auxílio de pulverizador de compressão (Guarany® 1,25 L, vazão de 3,4 mL por segundo). O tratamento sem aplicação de solução microbiana foi considerado controle negativo.

As plantas foram mantidas em casa de vegetação climatizada a temperatura de ± 30°C e umidade relativa ± 60 % e irrigadas diariamente. No vigésimo dia foi feita cobertura com formulação 30 00 20 do adubo mineral NPK, aplicando 2 g dessa formulação em cada vaso. O desbaste foi feito no décimo quinto dia do experimento, deixando uma planta por vaso. O experimento foi conduzido por 50 dias, sendo também nesse dia realizada as avaliações.

O delineamento experimental adotado foi em blocos casualizados com oito repetições, considerando-se cada vaso uma unidade experimental.

As variáveis avaliadas foram incidência de doença, variáveis fotossintéticas e variáveis de crescimento.

2.3.1. Incidência de doença

Para avaliação da incidência da doença foi utilizado o método qualitativo, onde contabilizou-se o número de plantas mortas e dividido pelo número total de plantas e o resultado obtido foi transformado em porcentagem equivalente de incidência da doença por tratamento.

2.3.2. Variáveis fotossintéticas

Os atributos de fluorescência e trocas gasosas foram avaliados com um analisador portátil infravermelho (LICOR 6400XT, Li-COR, Lincoln, Nebraska) em folhas totalmente expandidas após 50 dias de plantio. Taxa de assimilação de carbono (A), condutância estomática (g_s) e taxa de concentração interna e externa de CO_2 (C_i/C_a) foram determinadas em sistema aberto sobre luz artificial saturada ($1.000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de fótons) e, simultaneamente, foi determinada a eficiência da captura da energia excitada pelos centros de reação do fotossistema II (F_v'/F_m').

2.3.3. Variáveis de crescimento

Os parâmetros de crescimento analisados foram massa seca de parte aérea, raiz, folha, e área foliar. Para o cálculo da área foliar, 10 discos de $1,5 \text{ cm}^2$ foram coletados de folhas, com o auxílio de um perfurador circular, acondicionados em sacos de papel e secos em estufa de circulação forçada de ar a $65 \text{ }^\circ\text{C}$ por 72 h. A área foliar foi estimada através do peso seco dos discos e das folhas, utilizando a seguinte fórmula:

$$AF = \frac{(PSF + PSD) \times 15}{PSD}$$

Sendo que:

AF: área foliar

PSF: peso seco de folha

PSD: peso seco de discos

Parte aérea, raiz e folhas das plantas de cada tratamento foram separadas para determinação da massa seca das partes citadas. A raiz e o caule foram separados na região do colo da planta e foram também retiradas todas as folhas da parte aérea. Cada uma dessas partes foi acondicionada separadamente em sacos de papel e submetidas à secagem em estufa com circulação forçada de ar a $\pm 70^\circ\text{C}$ por um período médio de 72 h até a obtenção de peso constante. Posteriormente foi determinado o peso seco utilizando balança de precisão.

2.4. Análises Estatísticas

Os dados de crescimento micelial, incidência da doença, parâmetros fotossintéticos e ganho de biomassa foram submetidos a análise de variância e para comparação entre os tratamentos foi utilizado o teste de Scott Knott a 5 % de probabilidade.

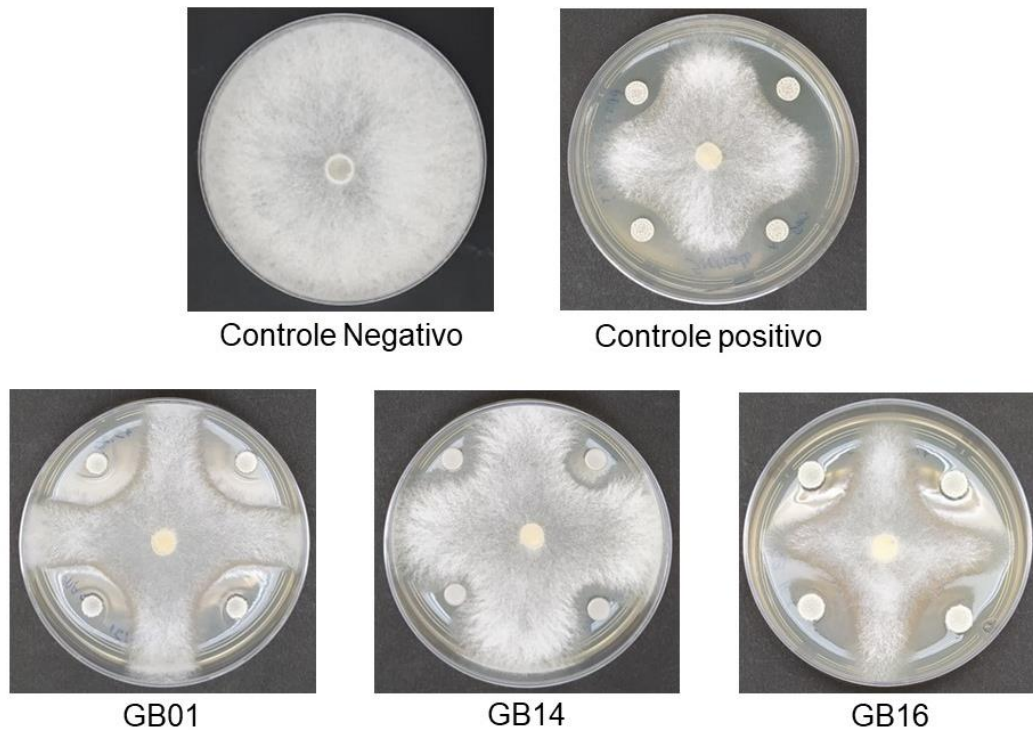
A porcentagem de inibição da germinação de escleródios submetidos a diferentes temperaturas de incubação (20 e 28°C) e o tempo de exposição dos esporos as soluções de *Bacillus* sp. (0 e 30 min.) foram submetidas ao teste não paramétrico de Kruskal Wallis.

3. RESULTADOS

3.1. Interação antagonista *in vitro* entre *S. sclerotiorum* e isolados de *Bacillus* spp.

No experimento de culturas pareadas fica evidente que, o crescimento micelial de *S. sclerotiorum* em direção as colônias de algumas cepas de *Bacillus* spp. como GB01, GB14 e GB16, foi inibido de modo semelhante ao controle positivo – *Bacillus subtilis* linhagem QST 713 Serenade® (Figura 1). Zonas claras de inibição formadas no meio são decorrentes dos metabólitos difusíveis produzidos pelas bactérias.

Figura 1 – Interações antagonistas entre diferentes isolados de *Bacillus* spp. e *Sclerotinia sclerotiorum*. Controle negativo: meio sem bactéria. Controle positivo: *Bacillus subtilis* linhagem QST 713 Serenade®.

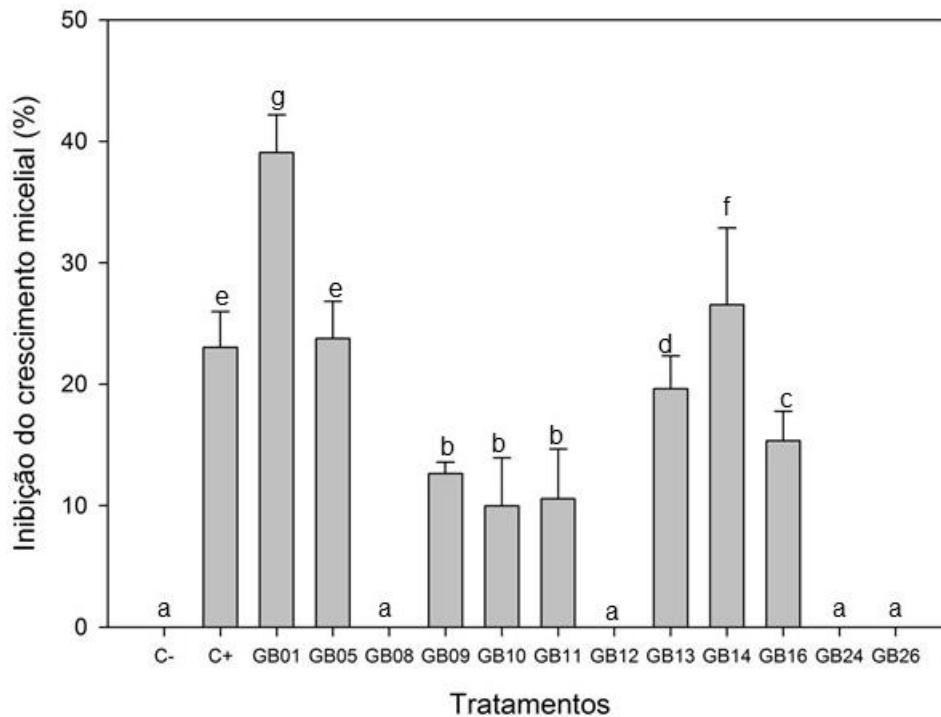


Fonte: Arquivo pessoal (2021).

3.2. Redução do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* por isolados de *Bacillus* spp.

A inibição do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* provocada por compostos difusíveis produzidas por isolados de *Bacillus* spp. variou significativamente entre os isolados (Figura 2). As cepas GB16, GB13, GB05, GB14 e GB01 apresentaram as maiores porcentagens de inibição do crescimento micelial, 15,3; 19,6; 23,7; 26,5 e 39,0%, respectivamente. O isolado GB01 exibiu maior capacidade inibitória sobre o fitopatógeno em 16 % quando comparado ao controle positivo. Por outro lado, os isolados GB08, GB12, GB24 e GB26 não afetaram o crescimento de *S. sclerotiorum*.

Gráfico 1 – Inibição do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum in vitro* por cepas *Bacillus* spp. As barras representam valores médios \pm Desvio Padrão de cinco repetições. Valores médios acompanhados por letras diferentes são significativamente diferentes pelo teste Scott Knott a 5 % de probabilidade. C-: controle negativo (meio sem bactéria). C+: controle positivo (*Bacillus subtilis* linhagem QST 713 Serenade®).



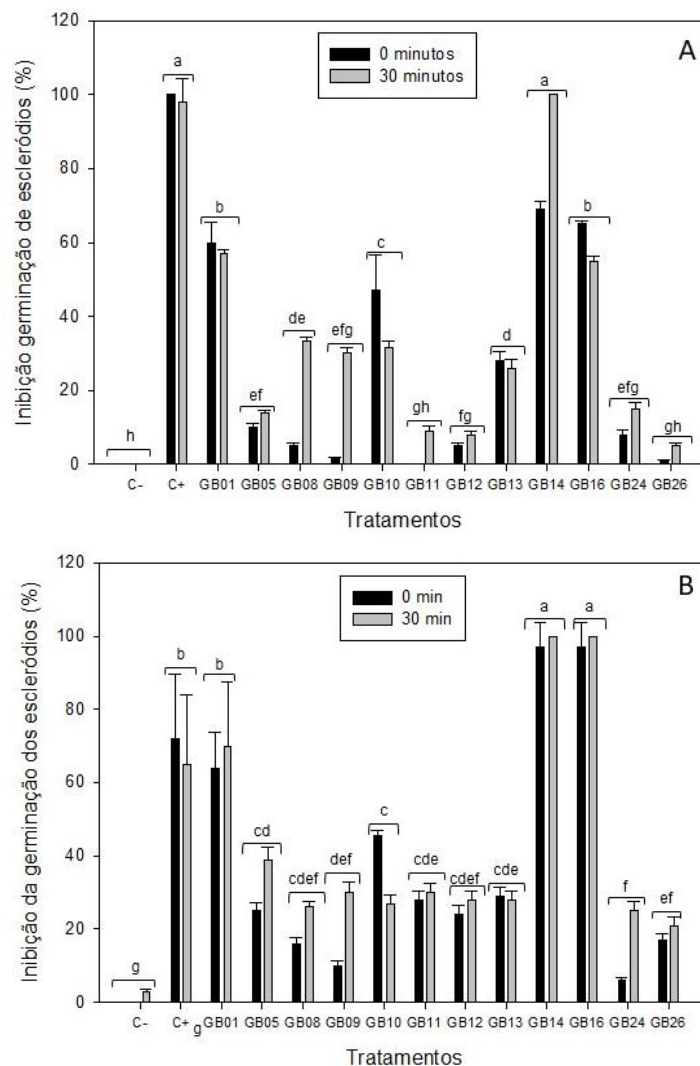
Fonte: Arquivo pessoal (2021).

3.3. Inibição da germinação dos escleródios de *S. sclerotiorum* por isolados de *Bacillus* spp.

A inibição da germinação dos escleródios mantidos a 20°C e 28°C por 7 dias e o tempo de exposição as soluções dos diferentes isolados de *Bacillus* sp. variou significativamente entre os tratamentos (Figura 3A e B). Os isolados GB10, GB01, GB16 e GB14 foram os mais eficientes na inibição da germinação dos escleródios, alcançando 47,1; 60,0; 69,0 e 100,0 % de inibição a 20°C (Figura 3A) e 45,5; 70,0; 100,0 e 100,0 % a 28°C (Figura 3B), respectivamente. O período de 30 min. de exposição foi mais eficiente na inibição da germinação do que 0 min. (Figura 3A e B). A imersão de escleródios no isolado GB14 por 30 min. provocou 100 % de inibição da germinação nas temperaturas de incubação de 20 e 28°C. Os isolados GB14 e GB16 exibiram efeito inibitório de 100 % quando comparado ao controle negativo (0 %) a

temperatura de 28°C, e quando comparado com o controle positivo (65 %), esses isolados tiveram maior efeito inibitório em 35 %. Por outro lado, a porcentagem de inibição provocada pelos isolados GB05, GB11, GB12, GB24 e GB26 a 28°C variou de 21 – 39 % e quando foram mantidos a 20°C exibiram 0 – 33 % atividade inibitória sobre os escleródios.

Gráfico 2 – Escleródios mantidos em meio de cultura câmara climatizada a 20°C (A) e a 28°C (B) por 7 dias. Barras representam valores médios ± Desvio Padrão cinco repetições. As variáveis tratamentos, tempo exposição dos escleródios soluções dos *Bacillus* spp. e temperatura de incubação foram submetidas análise não paramétrica de Kruskal Wallis. Médias tratamentos acompanhadas letras diferentes na figura foram significativamente diferentes pelo teste t (alfa = 0,05) soma de ranks tratamentos. C-: controle negativo (esporos não imersos nas soluções bacterianas). C+: controle positivo (esporos imersos a solução de *Bacillus subtilis* linhagem QST 713 Serenade®).



Fonte: Arquivo pessoal (2021).

3.4. Inibição do crescimento micelial e germinação de escleródios de *S. sclerotiorum* por compostos orgânicos voláteis produzidos por isolados de *Bacillus spp.*

O efeito de compostos orgânicos voláteis produzidos pelas bactérias também foram avaliados sobre o crescimento micelial e a germinação de esporos de *S. sclerotiorum in vitro*. Entretanto, não foi observada atividade inibitória desses parâmetros avaliados. Nenhum isolado produziu compostos orgânicos voláteis capaz de inibir o crescimento micelial e a germinação de escleródios de *S. sclerotiorum*.

3.5. Manejo do mofo branco e a promoção de crescimento de plantas de feijão por cepas de *Bacillus spp.*

A incidência de mofo branco foi reduzida em 0 e 6,25 % em parcelas tratadas com GB14 e GB01 em comparação com o controle negativo (Tabela 1).

Em relação aos parâmetros fotossintéticos, apenas na variável eficiência da captura da energia excitada pelos centros de reação do fotossistema II (F_v'/F_m') (Transpiração), houve diferença estatística significativa. Nos tratamentos com as bactérias, GB01, GB14 e GB16 observou-se maior taxa de transpiração das plantas do que nos controles negativo e positivo (Tabela 1).

Para todos os parâmetros de crescimento também não houve diferença estatística significativa. Na massa seca de parte aérea, a maior média entre os tratamentos (GB14: 3,807g), variou para a menor média (GB16: 3,263g), em 0,544 g. A massa seca de raiz, variou em 0,887 g, em relação a maior média (CT: 3,024) e menor média (GB16: 2,137). Já na massa seca de folha, a maior média (GB01: 4,807g), diferenciou em 0,873 g, da menor média (GB16: 3,934g). Assim como, para massa seca de diâmetro da folha, a maior média (GB14: 0,058g), diferenciou da menor média (GB16: 0,050g), em 0,008 g.

Tabela 1 – Efeito de isolados de *Bacillus* spp. na incidência de mofo branco, parâmetros fotossintéticos, ganho de biomassa em plantas de feijão aos 50 dias de cultivo em casa de vegetação. Inibição do desenvolvimento de *Sclerotinia sclerotiorum* aplicado por meio de arroz infestado em vasos semeados com feijão comum, inoculados em sulco de plantio por soluções de diferentes isolados de *Bacillus* spp. Os dados apresentados na tabela representam os valores médios \pm DP de oito repetições dos cinco tratamentos. Médias seguidas pela mesma letra nas linhas não diferem entre si ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste de Scott-Knott. C-: controle negativo (vasos não inoculados com isolados bacterianos no sulco de plantio). C+: controle positivo (vasos inoculados com solução de *Bacillus subtilis* linhagem QST 713 Serenade® no sulco de plantio). CV%: coeficiente de variação. A: taxa de assimilação de carbono. Gs: condutância estomática. Ci/Ca: taxa de concentração interna e externa de CO₂. MSPA: massa seca de parte aérea. MSR: massa seca de raiz. MSF: massa seca de folha. MSD: massa seca do disco foliar.

Variáveis	Tratamentos					CV%
	C-	C+	GB01	GB14	GB16	
Incidência da doença (%)	12,5a	6,25a	6,25a	0a	12,5a	28,19
A	9,1 \pm 3,1a	7,4 \pm 3,9a	11,8 \pm 6,7a	13,8 \pm 3,3a	10,4 \pm 4,1a	56,47
Gs	0,10 \pm 0,02a	0,11 \pm 0,05a	0,17 \pm 0,10a	0,15 \pm 0,05a	0,12 \pm 0,06a	64,42
Ci/Ca	281,0 \pm 38,0a	306,9 \pm 33,0a	284,8 \pm 43,6a	232,9 \pm 60,5a	256,7 \pm 26,5a	45,95
Transpiração	1,34 \pm 0,24b	1,53 \pm 0,72b	2,66 \pm 1,40a	2,63 \pm 0,94a	2,14 \pm 0,98a	62,09
Área Foliar (cm ²)	1251,1 \pm 339,2a	1237,5 \pm 513,3a	1369,8 \pm 434,6a	1210,2 \pm 664,1a	1171,9 \pm 496,3a	53,96
MSPA (g)	4,0 \pm 1,9a	4,2 \pm 2,2a	3,9 \pm 1,5a	3,8 \pm 2,0a	3,9 \pm 1,8a	62,5
MSR (g)	3,4 \pm 1,3a	2,5 \pm 1,2a	2,6 \pm 0,9a	2,5 \pm 1,1a	2,7 \pm 0,9a	56,12
MSF (g)	5,0 \pm 1,8a	4,8 \pm 2,3a	5,1 \pm 1,8a	4,6 \pm 2,4a	4,4 \pm 2,0a	57,3
MSD (g)	0,06 \pm 0,01a	0,06 \pm 0,01a	0,06 \pm 0,01a	0,06 \pm 0,01a	0,05 \pm 0,009a	36,47

Fonte: Arquivo pessoal (2021).

4. DISCUSSÃO

A utilização de cepas bacterianas no controle de fitopatógenos tem sido explorada como opção a ser adotada em Sistemas de Manejo Integrado. No presente estudo, foi avaliado o potencial de 12 isolados de *Bacillus* spp. no controle do fungo necrotrófico *S. sclerotiorum*. Deste total, os isolados GB01, GB14 e GB16 inibiram o desenvolvimento micelial e a germinação de escleródios do fitopatógeno. A inibição do crescimento micelial de vários fungos fitopatogênicos, incluindo *S. sclerotiorum* por cepas de *Bacillus* já foram previamente reportadas (Alvarez et al., 2011; Ansary et al., 2018; Fira et al., 2018; Farzand et al., 2019). Essa capacidade em geral está relacionada à competição por espaço e nutrientes, antibiose e/ou síntese de substâncias (Knaak et al., 2010). A antibiose é um processo de produção de metabólitos que pode levar à lise ou dissolução celular. Ensaios *in vitro* com extratos metanólicos e de acetato de etila de cepas de *Bacillus* spp. mostraram inibição significativa e redução do crescimento de *S. sclerotiorum* (Wang et al., 2020). Em outro estudo, foram identificadas 12 cepas de *B. thuringiensis* que diminuíram diretamente o crescimento de *S. sclerotiorum in vitro*, também devido à sua capacidade de produzir substâncias antifúngicas (Hu et al., 2019). Essas substâncias podem inibir diretamente o crescimento do fitopatógeno ou induzir a resistência sistêmica nas plantas.

Vários compostos antifúngicos produzidos por diferentes espécies de *Bacillus* sp. foram identificados e mostraram habilidade para suprimir o crescimento de *S. sclerotiorum*. Liberação de proteases e compostos termo estáveis (Principe et al., 2007); lipopeptídeos cíclicos como surfactina, fengicinas e iturinas (Alvarez et al., 2011); bacilomicina, bacilaeno, platazolicina e basilisina têm sido reportados como compostos que exibem atividade antagonista (Gu et al., 2017). Esses compostos apresentam diferentes sítios de ação. A iturina, por exemplo, aumenta a permeabilidade da membrana celular de patógenos de plantas por aumentar a mobilização de íons K⁺ (Yu et al., 2002). Alguns compostos antimicrobianos inibem a germinação de esporos, reduzem o desenvolvimento e provocam alterações ultraestruturais (Romero et al., 2007). Os resultados obtidos no presente estudo sugerem que os isolados GB01, GB14 e GB16 são capazes de produzir e secretar substâncias com atividade antimicrobiana que prejudicam o desenvolvimento de *S. sclerotiorum*. Portanto, o estudo de caracterização química dos metabólitos produzidos por essas cepas torna-se essencial.

Além dos compostos secundários difusíveis, há também a síntese de compostos orgânicos voláteis antimicrobianos. Giorgio et al. (2015) reportaram que micélios de *S. sclerotiorum* expostos a compostos voláteis de seis rizobactérias apresentaram vacuolização no citoplasma, indicando a membrana citoplasmática, como possível alvo dos compostos voláteis. Bactérias do gênero *Bacillus* sp. podem produzir amônia, um composto volátil associado ao controle de fitopatógenos. Isolados que produzem amônia podem expandir seu halo de inibição, alcançando área maior em torno das colônias que não produzem este composto (Freitas et al., 2018). No entanto, os compostos voláteis produzidos por todos os isolados avaliados no presente estudo não apresentaram efeito no desenvolvimento de *S. sclerotiorum*.

No experimento em casa de vegetação, a incidência da doença variou de 0 % (tratamento bacteriano GB14) a 12,5 % (tratamento controle negativo). Baseando-se nesses valores, não é possível afirmar que a supressão da doença foi decorrente da ação dos *Bacillus* sp., já que a variedade de feijão utilizada apresenta resistência moderada ao mofo branco. Outra espécie vegetal, o girassol, altamente susceptível a *S. sclerotiorum*, também foi avaliada, no entanto, todas as plantas de todos os tratamentos foram severamente acometidas pela doença (dados não apresentados). O conjunto desses resultados sugerem que *in vivo* os *Bacillus* spp. testados exibem pouco ou nenhum controle no desenvolvimento do mofo branco. Também não houve diferença significativa entre os tratamentos em relação as variáveis fotossintéticas e de crescimento.

Uma das possíveis explicações para esses encontros pode estar relacionada a suscetibilidade de agentes de controle biológico aos fatores ambientais. Sabe-se que, diferentemente dos agroquímicos, microrganismos usados no biocontrole são extremamente suscetíveis a mudanças de ambiente. Alguns fatores abióticos do solo impactam diretamente os agentes microbianos como textura, pH, temperatura, conteúdo de umidade, concentrações de minerais, disponibilidade de substratos, tensão de oxigênio, entre outros (Farzand et al., 2019). Dessecação, alta osmótica e moléculas oxidativas afetam a viabilidade microbiana e provável impacto no desempenho do controle biológico. Fatores bióticos do solo incluem a estrutura genética das populações alvo e não alvo, a comunidade microbiana do solo como um todo, que podem interagir negativamente entre si através de predação e competição e por fim o tipo de cultura em si, além dos próprios fatores fisiológicos intrínsecos dos organismos (Farzand et al., 2019). Yang et al. (2020), em um estudo verificaram

também que, a adaptação de um ambiente favorável aos dois indivíduos microbianos em teste, originados de diferentes ambientes, leva ao aumento dos níveis de controle da doença causada pelo patógeno. Em testes feitos *in vitro*, foi possível mostrar que, isolados de *Bacillus* ssp. e o patógeno, geneticamente distintos, diferem quanto às suas adaptações ecológicas, em relação à sensibilidade a ambientes de baixo pH e com pH ligeiramente mais alto. Um outro fator responsável por falhas ou inconsistências no controle biológico a ser considerado é o rápido declínio do tamanho da população de células ativas a níveis insuficientes para controlar o patógeno. Então, muitas vezes, a heterogeneidade desses fatores abióticos e bióticos do solo dentro e entre campos de produção e a falta de sincronização de tempo e espaço entre o microrganismo e o patógeno pode acarretar inconsistência do desempenho de agentes de biocontrole.

A alta variação entre os ambientes, biótico e abiótico, favoráveis para os agentes de biocontrole em relação aos patógenos, exige formulações de estratégias que minimizem a diversidade de adaptações ecológicas desses organismos, para aumentar a probabilidade de superar o desempenho individual de cada um.

5. CONCLUSÕES

Os isolados de *Bacillus* ssp. GB01, GB14 e GB16 são antagônicos à *S. sclerotiorum*, demonstrando serem promissores para o manejo integrado do mofo branco.

Os doze isolados bacterianos avaliados não suprimem a incidência da doença, nem promovem aumento da capacidade fotossintética e da biomassa em plantas de feijão.

Para estudos *in vivo*, o estabelecimento de padrões quanto a adaptação ao ambiente externo, dos microrganismos em estudo, é necessária para alcance de resultados satisfatórios.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVAREZ, F.; CASTRO, M.; PRÍNCIPE, A.; BORIOLI, G.; FISCHER, S.; MORI, G.; JOFRE, E. The plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* strains MEP218 and ARP23 capable of producing the cyclic lipopeptides iturin or surfactin and fengycin are effective

in biocontrol of sclerotinia stem rot disease. **Journal of Applied Microbiology**, v. 112, p. 159–174, 2011.

ANSARY, M. W. R.; PRINCE, M. F. R. K.; HAQUE, E.; SULTANA, F.; WEST, H. M.; RAHMAN, M. M.; MONDOL, M. A. M.; AKANDA, A. M.; RAHMAN, M.; CLARKE, M. L.; ISLAM, M. T. Endophytic *Bacillus* spp. from medicinal plants inhibit mycelial growth of *Sclerotinia sclerotiorum* and promote plant growth. **Naturforsch**, aop, p. 1-10, 2018.

BARDIN, S. D.; HUANG, H. C. Research on biology and control of *Sclerotinia* diseases in Canada. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 23, p. 88-98, 2001.

BARRO, J. Performance and profitability of fungicides for managing soybean white mold: a 10-year summary of cooperative trials. **Plant Disease**, v. 103, n. 9, p. 2212-2220, 2019.

BELL, A. A.; WHEELER, M. H. Biosynthesis and functions of fungal melanins. **Annual Review of Phytopathology**, v. 24, p. 411-451, 1986.

BOLTON, M. D.; THOMMA, B. P. H. J.; NELSON, B. D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. **Molecular Plant Pathology**, v. 7, n. 1, p. 1-16, 2006.

BRANDI, T. C. D. A.; MONTEIRO, A. N.; SILVA, H. L. A. D.; CRUZ, A. G. D.; MAIA, L. C.; PITHON, M. M. Análise da atividade antimicrobiana de probióticos e sua adesividade a bráquetes ortodônticos: estudo *in vitro*. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 48, 2019.

CHEN, X. H.; SHOULZ, R.; BORRISS, M.; JUNGE, H.; MÖGEL, G., KUNZ, S. Difficidin and bacilysin produced by plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* are efficient in controlling fire blight disease. **Journal of Biotechnology**, v. 140, p. 38-44, 2009.

CHOI, I. Y.; KIM, J. H.; KIM, J.; HAN, K. S.; GALEA, V. G.; SHIN, H. D. Confirmation of *Sclerotinia sclerotiorum* as the causal agent of stem rot of stock in Korea. **Australasian Plant Disease Notes**, v. 12, n. 1, p. 22, 2017.

DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* III. Hyphal interactions. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 57, p. 359-363, 1971.

DENTON-GILES, M.; DERBYSHIRE, M. C.; KHENTRY, Y.; BUCHWALDT, L.; KAMPHUIS, L. G. Partial stem resistance in *Brassica napus* to highly aggressive and genetically diverse *Sclerotinia sclerotiorum* isolates from Australia. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 40, n. 4, p. 551–561, 2018.

DERBYSHIRE, M.; DENTON, G. M.; HEGEDUS, D.; SEIFBARGHI, S.; ROLLINS, J.; KAN, J. V.; SEIDL, M. F.; FAINO, L.; MBENGUE, M.; NAVAUD, O.; RAFFAELE, S.; KOSACK-HAMMOND, K.; KOSACK, H.; HEARD, S.; OLIVER, R. The complete genome sequence of the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* reveals insights into the genome architecture of broad host range pathogens. **Genome Biology and Evolution**, v. 9, n. 3, p. 593-618, 2017.

- DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. **Basic Plant Pathology Methods**. Florida. CRC Press. Boca Raton, Florida. 335 p. 1995.
- FAGUNDES-NACARATH, I. R. F.; DEBONA, D.; RODRIGUES, F. A. Oxalic acid-mediated biochemical and physiological changes in the common bean-*Sclerotinia sclerotiorum* interaction. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 129, p. 109-121, 2018.
- FARZAND, A.; MOOSA, A.; ZUBAIR, M.; KHAN, A. R.; HANIF, A.; TAHIR, H. A. S.; GAO, X. Marker assisted detection and LC-MS analysis of antimicrobial compounds in different *Bacillus* strains and their antifungal effect on *Sclerotinia sclerotiorum*. **Biological Control**, v. n. 133, p. 91-102, 2019.
- 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. **Crop Protection**, v. 26, p. 100-107, 2007.
- FIRA, D.; DIMKIC, I.; BERIC, T.; LOZO, J.; STANKOVIC, S. Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. **Journal of Biotechnology**, v. 285, p. 44-55, 2018.
- FREITAS, M. A.; MEDEIROS, F. H.; MELO, I. S.; PEREIRA, P. F.; PENÃFLOR, M. F. G.; BENTO, J. M.; PARÉ, P. W. Stem inoculation with bacterial strains *Bacillus amyloliquefaciens* (GB03) and *Microbacterium imperiale* (MAIIF2a) mitigates *Fusarium* root rot in cassava. **Phytoparasitica**, v. 47, n. 1, p. 135-142, 2018.
- PANNULLO, A.; KAMVAR, Z. N.; MIORINI, T. J.; STEADMAN, J. R.; EVERHART, S. E. Genetic variation and structure of *Sclerotinia sclerotiorum* populations from soybean in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 44, n. 1, p. 53-64, 2018.
- GIORGIO, A.; DE STRADIS, A.; LO CANTORE, P.; IACOBELLIS, N. S. Biocide effects of volatile organic compounds produced by potential biocontrol rhizobacteria on *Sclerotinia sclerotiorum*. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. 1056, p. 1-13, 2015.
- GONDA, S. K.; BERGEN, M. S.; TORRES, M. S.; WHITE JR., J. J. Endophytic *Bacillus* spp. produce antifungal lipopeptides and induce host defence gene expression in maize. **Microbiological Research**, v. 172, p. 79-87, 2015.
- GU, Q.; YANG, Y.; YUAN, Q.; SHI, G.; WU, L.; LOU, Z.; HUO, R.; WU, H.; BORRIS, R.; GAO, X. Bacillomycin D produced by *Bacillus amyloliquefaciens* is involved in the antagonistic interaction with the plant pathogenic fungus *Fusarium graminearum*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 83, p. 01075-01017, 2017.
- GYAWALI, S.; HARRINGTON, M.; DURKIN, J.; HORNER, K.; PARKIN, I. A. P.; HEGEDUS, D. D.; BEKKAOU, D.; BUCHWALDT, L. Microsatellite markers used for genome-wide association mapping of partial resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in a world collection of *Brassica napus*. **Molecular Breeding**, v. 36, n. 72, p. 1-13, 2016.
- HU, X.; ROBERTS, D. P.; XIE, L.; QIN, L.; LI, Y.; LIAO, X.; HANA, P.; YUA, C.; LIAO, X. Seed treatment containing *Bacillus subtilis* BY-2 in combination with other *Bacillus*

isolates for control of *Sclerotinia sclerotiorum* on oilseed rape. **Biological Control**, v. 133, p. 50-57, 2019.

JAJOR, E.; KORBAS, M.; HOROSZKIEWICZ-JANKA, J.; DANIELEWICZ, J.; BARANIAK, B. The influence of selected biological products on limitation of the development of *Sclerotinia sclerotiorum* sclerotia. **Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering**, v. 63, n. 2, p. 92-96, 2017.

KNAAK, N.; de AZAMBUJA, A. O.; LUCHO, A. P. R.; BERLITZ, D. L. Interações de *Bacillus thuringiensis* e o controle de fitopatógenos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 38, p. 48-53., 2010.

MASSAWE, V. C.; HANIF, A.; FARZAND, A.; MBURU, D. K.; OCHOLA, S. O.; WU, L.; TAHIR, H. A. S.; GU, Q.; WU, H.; GAO, X. Volatile compounds of endophytic *Bacillus* spp. have biocontrol activity against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Phytopathology**, v. 108, n. 12, p. 1373-1385, 2018.

MCCAGHEY, M.; WILLBUR, J.; RANJAN, A.; GRAU, C. R.; CHAPMAN, S.; DIERS, B.; GROVES, C.; KABBAGE, M.; SMITH, D. L. Development and evaluation of *Glycine max* germplasm lines with quantitative resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. 1495, p. 1-13, 2017.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Controle biológico**. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 388. 2000.

PANNULLO, A.; KAMVAR, Z. N.; MIORINI, T. J. J.; STEADMAN, J. R.; EVERHART, S. E.

SABATÉA, D. C.; BRANDAN, C. P.; PETROSELLIC, G.; BALSELLS, R. E.; AUDISIO, M. C. Biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary on common bean by native lipopeptide-producer *Bacillus* strains. **Microbiological Research**, v. 211, p. 21-30, 2018.

PRINCIPE, A.; ALVAREZ, F.; CASTRO, M.; ZACCHI, L.; FISCHER, S.; MORI, G.; JOFRÉ, E. Biocontrol and PGPR features in native strains isolated from saline soils of Argentina. **Current Microbiology**, v. 55, p. 314-322, 2007.

ROMERO, D.; DE VICENTE, A.; RAKOTOALY, R. H.; DUFOUR, S. E.; VEENING, J. W.; ARREBOLA, E.; CAZORLA, F. M.; KUIPERS, O. P.; PAQUOT, M.; PÉREZ-GARCIA, A. The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca*. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v. 20, p. 430-440, 2007.

SINCLAIR, James B.; DHINGRA, Onkar Dev. **Basic plant pathology methods**. CRC press, 1995.

STATSOFT. **Statistica for Windows**. Versão 7.0. Tulsa: Statsoft Inc., 2004.

SUN, G.; YAO, T.; FENG, C.; CHEN, L.; LI, J.; WANG, L. Identification and biocontrol potential of antagonistic bacteria strains against *Sclerotinia sclerotiorum* and their

growth-promoting effects on *Brassica napus*. **Biological Control**, v. 104, p. 35-43, 2017.

UTHSCSA. **ImageTool**, versão **3.0**. Disponível em: <http://ddsdx.uthscsa.edu/dig/itdesc.html>. Acesso em 20 de julho, 2019.

WANG, M.; GENG, L.; SUN, X.; SHU, C.; SONG, F.; ZHANG, J. Screening of *Bacillus thuringiensis* strains to identify new potential biocontrol agents against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Plutella xylostella* in *Brassica campestris* L. **Biological Control**, v. 145, p. 104262, 2020.

YANG, X.; ZHANG, L.; XIANG, Y.; DU, L.; HUANG, X.; LIU, Y. Comparative transcriptome analysis of *Sclerotinia sclerotiorum* revealed its response mechanisms to the biological control agent, *Bacillus amyloliquefaciens*. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1-12, 2020.

YU, X.; AI, C.; XIN, L.; ZHOU, G. The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on *Fusarium* wilt and promotes the growth of pepper. **European Journal of Soil Biology**, v. 47, n. 2, p. 138-145, 2011.

ZANCAN, W. L. A.; MACHADO, J. C.; SOUSA, B. F. M.; MATOS, C. S. M. Crescimento micelial, produção e germinação de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* na presença de fungicidas químicos e *Trichoderma harzianum*. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 5, p. 782-789, 2012.

ZHANG, F.; GE, H.; ZHANG, F.; GUO, N.; WANG, Y.; CHEN, L.; JI, X.; LI, C. Biocontrol potential of *Trichoderma harzianum* isolate T-aloe against *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 100, p. 64-74, 2016.