



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ALLAN YUKIO HIGASHI

**ANTAGONISMO DA CEPA LABIM22 DE *Bacillus velezensis* FRENTE
A FUNGOS FITOPATÓGENOS E BIOCONTROLE DO MOFO
BRANCO EM SEMENTES DE SOJA**

Londrina

2020

ALLAN YUKIO HIGASHI

**ANTAGONISMO DA CEPA LABIM22 DE *Bacillus velezensis* FRENTE
A FUNGOS FITOPATÓGENOS E BIOCONTROLE DO MOFO
BRANCO EM SEMENTES DE SOJA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Maria Isabel Balbi-Peña

Coorientador: Prof. Dr. Admilton Gonçalves de Oliveira Júnior

Londrina

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

H634a Higashi, AllanYukio.
Antagonismo da cepa LABIM22 de *Bacillus velezensis* frente a fungos fitopatógenos e biocontrole do mofo branco em sementes de soja / AllanYukio Higashi. - Londrina, 2020.
82 f. : il.

Orientador: Maria Isabel Balbi-Peña.
Coorientador: Admilton Gonçalves de Oliveira Júnior.
Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2020.
Inclui bibliografia.

1. Bioativos - Tese. 2. Controle biológico - Tese. 3. Mofo branco - Tese. I. Balbi-Peña, Maria Isabel . II. Oliveira Júnior, Admilton Gonçalves de . III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. IV. Título.

CDU 63

ALLAN YUKIO HIGASHI

**ANTAGONISMO DA CEPA LABIM22 DE *Bacillus velezensis* FRENTE
A FUNGOS FITOPATÓGENOS E BIOCONTROLE DO MOFO
BRANCO EM SEMENTES DE SOJA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Agronomia.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Orientadora: Prof^a. Dr^a Maria Isabel
Balbi Peña
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a. Dr^a Kátia Regina F. Schwan-Estrada
Universidade Estadual de Maringá - UEM

Dr^a Viviane Yumi Baba
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 19 de fevereiro de 2020.

Dedico este trabalho aos meu Pais Armando e Ivete Higashi, meus irmãos Amanda e Daniel e especialmente a minha tia Sandra (*in memorian*) e minha prima Takiko Narita.

AGRADECIMENTOS

À Profª Maria Isabel Balbi Peña pela orientação, conhecimentos transmitidos e amizade desde a graduação.

Ao Prof Admilton Gonçalves de Oliveira Júnior, pela orientação, conhecimentos transmitidos, pelo bons momentos e amizades desde os meus primeiros anos da graduação.

Agradecimento especial a minha tia Sandra Narita (*In memoriam*), minha segunda mãe, quem me criou e tornou o sonho da minha formação possível, por todos os dias em que vi seu sorriso me acolher, por cada conversa e conselho, obrigado tia! Você tem feito uma falta imensa em minha vida.

Aos meus primos Luiza Takiko Narita, Cláudio Narita e Edson Narita pelos anos em que moramos juntos e por me acolherem de coração em seu lar, sou eternamente grato pelo que fizeram por mim.

Aos meus pais Armando Fumio Higashi e Ivete Hiroko Fujihara Higashi que não mediram esforços para que eu chegasse até aqui.

Aos meus irmãos Daniel e Amanda Higashi que sempre me ajudaram e me acompanharam nesta longa jornada.

Aos amigos José Victor Fritas dos Santos, Natália Momesso, Henrique Shishido, Gabriele Eler, Fernando Kubo, Kátia Kawai, Murilo Napoli e Silas Mian.

Ao Gabriel Shimizu, que me auxiliou na parte estatística de todo o trabalho.

À Isabela Naomi Maeoka, obrigado pelo amor, carinho e dedicação nestes anos.

Aos amigos do LABIM e do LEBA que estiveram sempre comigo na bancada.

Muito obrigado a todos, eu não conseguiria chegar até aqui sem a ajuda de vocês!!!

**“Tudo que posso fazer pela sorte é que ela
me encontre trabalhando”**

Pablo Picasso

HIGASHI, AllanYukio **Antagonismo da cepa LABIM22 de *Bacillus velezensis* frente a fungos fitopatógenos e biocontrole do mofo branco em sementes de soja. 2020. 91 folhas. Dissertação** (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

RESUMO

O controle de doenças de plantas no Brasil é realizado fundamentalmente com defensivos agrícolas de origem química sintética, o que pode causar danos ambientais e favorecer a seleção de populações resistentes de fitopatógenos. Neste cenário o controle biológico torna-se uma alternativa promissora. O objetivo do estudo foi identificar e avaliar o potencial da cepa de *Bacillus velezensis*. LABIM22 como agente de biocontrole de doenças de plantas *in silico*: através da análise do genoma, *in vitro*: com testes de antibiose e investigação do seu potencial como promotor de crescimento e *in vivo*: avaliando o controle de mofo branco em sementes de soja. Os metabólitos com atividade antifúngica (preditos usando o software AntiSmash) foram fengicina, bacilibactina e surfactina. Nos testes de cultura dupla direta foram utilizados os fungos fitopatogênicos *Sclerotinia sclerotiorum*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium solani* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* como desafiadores. A cepa LABIM22 inibiu o crescimento micelial de todos os patógenos confrontados. O maior controle foi contra *F. solani* 145 com 75% de inibição e o menor contra *S. sclerotiorum* com 59%. A produção de metabólitos em meio líquido revelou que o meio formulado (MF- pedido em processo de patente) foi o mais eficiente para síntese de moléculas antifúngicas. Estes metabólitos foram estáveis em temperaturas de 70 °C, 100 °C e 121 °C; faixas de luz de 254 nm, 365 nm e luz branca e pH entre 3 e 11. Para avaliar a capacidade de promoção de crescimento de plantas da cepa LABIM22 foram testadas: a habilidade de solubilização de fosfato, a qual não apresentou atividade em meio GL (glicose, extrato de levedura, ágar) sólido, a produção de ácido indol acético, obtendo baixo índice de produção; e a produção de biosurfactante em meio ágar sangue onde verificou-se halo de hemólise de 20 mm. A concentração de 500 ug/mL de metabólitos inibiu 100% o crescimento micelial de *S. sclerotiorum*, enquanto para *F. oxysporum* a maior concentração estudada (1000 ug/mL) inibiu apenas 51% do crescimento micelial. Os metabólitos da LABIM22 reduziram significativamente a formação de apotécios de *S.*

sclerotiorum, não havendo diferença estatística com o fungicida químico utilizado (boscalida + dimoxistrobina). O potencial de controle do mofo branco foi avaliado em sementes de soja inoculadas com *S. sclerotiorum*. O tratamento com pó molhável a base de LABIM22 apresentou 93,5% de germinação das sementes e 94% de sementes sadias na dose de 300 g/100 kg de sementes, resultados estatisticamente iguais aos obtidos com fungicidas químicos recomendados para o controle de mofo branco (tiofanato metílico+fluazinam e boscalida+dimoxistrobina). Conclui-se que a cepa de *B. velezensis* LABIM22 tem potencial biotecnológico pois possui genes que codificam biomoléculas antifúngicas estáveis em amplas faixas de pH, temperatura e comprimento de onda; apresenta antagonismo frente aos fungos *S. sclerotiorum*, *M. phaseolina*, *R. solani*, *B. cinerea*, *F. solani* e *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* além de inibir a formação de apotécios a partir de escleródios de *S. sclerotiorum* e controlar eficientemente a incidência de mofo branco em sementes de soja. Seu potencial como agente promotor de crescimento vegetal ainda necessita de estudos mais aprofundados.

Palavras-chave: Bioativos, Controle biológico. Mofo branco

HIGASHI, Allan Yukio. **Antagonism of the LABIM22 strain of *Bacillus velezensis* against phytopathogenic fungi and biocontrol of white mold in soybean seeds.** 2020. 91 p. Dissertation (Master in Agronomy) – State University of Londrina, Londrina, 2020.

ABSTRACT

The control of plant diseases in Brazil is carried out mainly with pesticides of synthetic chemical origin, which can cause environmental damage and favor the selection of resistant populations of plant pathogens. In this scenario, biological control becomes a promising alternative. The aim of the study was to identify and evaluate the potential of the *Bacillus velezensis* strain LABIM22 as a biocontrol agent for plant diseases in three ways: *in silico* through genome analysis, *in vitro* by antibiosis tests and investigation of its potential as plant growth promoter, and *in vivo*: evaluating the control of white mold in soybean seeds. The metabolites with antifungal activity (predicted using the AntiSmash software) were fengicin, bacillibactin and surfactin. For dual culture test against fungal pathogens were used *Sclerotinia sclerotiorum*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* as challengers. LABIM22 strain reduced micelial growth of all fungal pathogens. The highest control was against *F. solani* 145 with 75% inhibition and the lowest against *S. sclerotiorum* with 59%. The production of metabolites in liquid medium revealed that the formulated medium (MF- patent in process) was the most efficient for the synthesis of antifungal molecules. These metabolites were stable at temperatures of 70 ° C, 100 ° C and 121 ° C; light of 254 nm, 365 nm and white light and pH between 3 and 11. To evaluate the plant growth promotion ability of LABIM22 strain, phosphate solubilization in GL solid medium (glucose, yeast extract, agar), production of indole acetic acid (IAA) and production of biosurfactant in blood agar medium were performed. LABIM22 did not show phosphate solubilization activity, produced low level of IAA and produced a 20 mm hemolysis halo. LABIM 22 metabolites at the concentration of 500 ug / mL completely inhibited mycelial growth of *S. sclerotiorum*, while, for *F. oxysporum*, the highest concentration studied (1000 ug/mL) inhibited only 51%. These metabolites significantly reduced the *S. sclerotiorum* apothecia with no statistical difference with the chemical fungicide used

(boscalide+dimoxystrobina). LABIM 22 biocontrol of white mold was evaluated in soybean seeds inoculated with *S. sclerotiorum*. The treatment with wettable powder based on LABIM22 showed 93.5% of seed germination and 94% of healthy seeds at a dose of 300 g/100 kg of seeds, results statistically equal to those obtained with chemical fungicides recommended for the control of white mold (methyl thiophanate+fluazinam and boscalide+ dimoxystrobin). It is concluded that *B. velezensis* strain LABIM22 has biotechnological potential because of its genes that encode stable antifungal biomolecules in wide ranges of pH, temperature and wavelength; shows antagonism against *S. sclerotiorum*, *M. phaseolina*, *R. solani*, *B. cinerea*, *F. solani* and *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* in addition to reduce apothecia formation from *S. sclerotiorum* sclerotia and efficiently controlled the incidence of white mold in soybean seeds. Its potential as a plant growth promoting agent still needs further studies.

Key words: Bioactive, Biological control, Sclerotinia stem rot

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Principais clusters de metabólitos secundários preditos pelo programa antiSMASH no genoma do isolado LABIM22 comparado com cepas de *Bacillus* spp. As áreas destacadas indicam as diferenças encontradas entre os clusters representados.39
- Figura 2 - Ensaio de antagonismo direto da cepa LABIM22 de *Bacillus* sp. contra fungos fitopatogênicos (*Sclerotinia sclerotiorum*, *Macrophomina phaseolina*, *Botrytis cinerea* e *Rhizoctonia solani*). As barras azuis representam porcentagem de inibição do crescimento micelial do fitopatógeno. As barras de erro representam o desvio padrão com base em 4 repetições por experimento. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey.41
- Figura 3 - Porcentagem de inibição de *Sclerotinia sclerotiorum*, *Macrophomina phaseolina*, *Botrytis cinerea* e *Rhizoctonia solani* pelo sobredanadante da cepa LABIM 22 de *Bacillus* sp. cultivada em três diferentes meios (LB – Lúria Bertani; LB+M – Lúria Bertania com micronutrientes; MF – Meio formulado). Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey. As barras de erro representam o desvio padrão com base em 8 repetições por experimento. O experimento foi repetido 3 vezes.42
- Figura 4 - Testes de estabilidade térmica (25 °C; 70 °C; 100 °C; 121 °C) dos metabólitos produzidos pela cepa LABIM22 em meio formulado. As barras de erro representam o desvio padrão com base em 8 repetições para cada experimento. Não houve diferença estatística significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey44
- Figura 5 – Testes de estabilidade a diferentes comprimentos de ondas de luz (Luz branca; 254 nm; 365 nm) dos metabólitos produzidos pela cepa LABIM22 em meio formulado. As barras de erro representam o desvio padrão com base em 8 repetições para cada experimento. Não houve diferença estatística significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey.45
- Figura 6 – Testes de estabilidade a diferentes pH (3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 11) dos metabólitos produzidos pela cepa LABIM22 em meio formulado. As barras de erro representam o desvio padrão com base em 8 repetições para cada experimento. Não houve diferença estatística significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey.46
- Figura 7 - Atividade hemolítica em meio ágar sangue com 200 µL de SLC da cepa LABIM22 aplicado em cada poço.....47
- Figura 8 – Concentração inibitória mínima dos metabólitos de LABIM22 contra *Sclerotinia sclerotiorum*. As barras de erro representam o desvio padrão com base em 4 repetições para cada experimento (2 experimentos distintos). Os círculos representam as doses utilizadas.....49
- Figura 9 – Taxa de germinação de escleródios (%), estipes (unidades de estipes formadas) e apotécios (unidades de apotécios formados) de *Sclerotinia sclerotiorum* em teste de escleródios tratados com metabólitos de LABIM22 em 3 concentrações (2 mg/mL; 1 mg/mL; 0,5 mg/mL) fungicida químico (Spot - 200,00 g/L boscalida + 200,00 g/L dimoxistrobina); meio formulado (MF) e água. As barras de erro representam o desvio padrão com base em 5 repetições por tratamento e 20 escleródios por repetição. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey.....50
- Figura 10 – Germinação de sementes de soja inoculadas previamente com *Sclerotinia sclerotiorum* e tratadas com pó molhável a base de LABIM22 LABIM22 nas concentrações de 100g/100kg, 200g/100kg e 300g/100kg e fungicidas químicos (tiofanato metílico+fluazinam e boscalida+dimoxistrobina). As barras de erro representam o desvio padrão com base em 8 repetições por tratamento. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05). 51
- Figura 11 – Porcentagem de sementes de soja sadias em teste de germinação de sementes inoculadas previamente com *Sclerotinia sclerotiorum* e tratadas com pó molhável a base de LABIM22 LABIM22 nas concentrações de 100g/100kg, 200g/100kg e 300g/100kg e fungicidas químicos (tiofanato metílico+fluazinam e boscalida+dimoxistrobina). As barras de erro representam o

- desvio padrão com base em 8 repetições por tratamento. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).52
- Figura 12** – Teste de germinação de sementes de soja infectadas com *Sclerotinia sclerotiorum* e tratadas com formulações a base de LABIM22 (100g/ 100kg; 200g/ 100 kg e 300g/ 100kg de sementes de soja) e fungicidas químicos tiofanato metílico + fluazinam e boscalida + dimoxistrobina.53
- Figura 13** – Teste de antagonismo direto entre a cepa antagonista LABIM22 e os fitopatógenos *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* 06, *Fusarium solani* 145 e *F. solani* 234. A - Porcentagem de inibição (%) no teste de cultura dupla entre LABIM22 e os fungos fitopatogênicos. As barras de erro representam o desvio padrão com base em 4 repetições. Letras iguais nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey. B. Porcentagem de inibição do crescimento micelial de cada isolado de sp.....63
- Figura 14** – A. Porcentagem de inibição do crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* 06, *Fusarium solani* 145 e *F. solani* 234 em teste de difusão pelo SLC de LABIM22 cultivado nos meios de cultivo LB (Lúria Bertani), LB+M (Lúria Bertani acrescido de micronutrientes) e MF (meio formulado a base de fonte de carbono, nitrogênio e micronutrientes). As barras de erro representam o desvio padrão com base em 8 repetições por patógeno. Letras iguais não diferem entre si para o mesmo patógeno pelo teste de Tukey. B. Teste de difusão em ágar com *F. oxysporum* 06 vs. metabólitos de LABIM22 sintetizados nos três meios de cultivo. .65
- Figura 15** – Teste de estabilidade térmica sob temperaturas de 25 °C; 70 °C; 100 °C; 121 °C dos metabólitos produzidos pela cepa LABIM22 em meio formulado. A. Porcentagem de inibição do crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* 06, em teste de difusão pelo SLC de LABIM22 submetido a diferentes temperaturas. As barras de erro representam o desvio padrão com base em 8 repetições. B. Teste de difusão em ágar com *F. oxysporum* 06 vs. metabólitos de LABIM22 submetidos a diferentes temperaturas.68
- Figura 16** – Teste de estabilidade a diferentes comprimentos de onda de luz (Luz branca; 254 nm; 365 nm) dos metabólitos produzidos pela cepa LABIM22 em meio formulado. Antagonismo frente a *F. oxysporum* f. *phaseoli*. As barras de erro representam o desvio padrão com base em 8 repetições para cada experimento.69
- Figura 17** – Teste de estabilidade a diferentes faixas de pH (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, e 11) dos metabólitos produzidos pela cepa LABIM22 em meio formulado. Antagonismo frente a *F. oxysporum* f. *phaseoli*. As barras de erro representam o desvio padrão com base em 8 repetições para cada experimento.70
- Figura 18** – Concentração inibitória mínima dos metabólitos de LABIM22 produzidos em meio de cultivo MF contra *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*. No gráfico está plotado o índice de crescimento micelial em porcentagem (ICM) em função das doses utilizadas. Os círculos na curva representam a dose utilizada.....71

LISTA DE TABELAS

Tabela1 - Produtos usados no tratamento de sementes de soja.....	34
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AIA – Ácido indol acético

CONAB – Companhia nacional de abastecimento

dDDH - Hibridização DNA DNA digital

FAO - Food and Agriculture Organization

MIC – Concentração inibitória mínima

SLC – Sobrenadante livre de células

Sumário

1 INTRODUÇÃO	14
2 Revisão de literatura	16
2.1. FUNGOS FITOPATOGÊNICOS DE IMPORTÂNCIA AGRÍCOLA	16
2.1.1 <i>SCLEROTINIA SCLEROTIORUM</i>	16
2.1.2 <i>FUSARIUM OXYSPORUM</i> F. SP. <i>PHASEOLI</i>	18
2.2 BACTÉRIAS UTILIZADAS NO BIOCONTROLE DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS.....	19
2.3 <i>BACILLUS</i> SPP.....	20
2.4 BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO	22
3 ARTIGO A	24
3.1 Resumo	24
3.2 Abstract	26
3.3 Introdução	28
3.4. Material e métodos	29
3.4.1 MICRORGANISMOS.....	29
3.4.2 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DO ISOLADO LABIM22.....	30
3.4.3 PREDIÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	30
3.4.4 ENSAIO DE ANTAGONISMO DIRETO POR CULTURA DUPLA.....	30
3.4.5 PRODUÇÃO DE SOBRENADANTE LIVRE DE CÉLULAS	31
3.4.6 TESTE DE DIFUSÃO EM ÁGAR	31
3.4.7 TESTES DE ESTABILIDADE DOS METABÓLITOS DA CEPA LABIM22 A DIFERENTES TEMPERATURAS, FAIXAS DE LUZ E PH	32
3.4.8 PRODUÇÃO DE ÁCIDO INDOL ACÉTICO (AIA)	33
3.4.9 TESTE DE SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO	33
3.4.10 ATIVIDADE HEMOLÍTICA EM ÁGAR SANGUE	34
3.4.11 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA.....	34
3.4.12 GERMINAÇÃO DE ESCLERÓDIOS	35
3.4.13 TRATAMENTO DE SEMENTES DE SOJA COM CÉLULAS E METABÓLITOS DE LABIM22	36
3.4.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
3.5 Resultados e discussão	37
3.5.1 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DO ISOLADO LABIM22	37
3.5.2 PREDIÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	38
3.5.3 ENSAIO DE ANTAGONISMO DIRETO POR CULTURA DUPLA.....	40
3.5.4 TESTE DE SOBRENADANTE LIVRE DE CÉLULAS	41
3.5.5 TESTE DE ESTABILIDADE DOS METABÓLITOS	44
3.5.6 PRODUÇÃO DE ÁCIDO INDOL ACÉTICO (AIA)	46
3.5.7 TESTE DE SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO	47

3.5.8 ATIVIDADE HEMOLÍTICA EM ÁGAR SANGUE	47
3.5.9 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA.....	48
3.5.10 GERMINAÇÃO DE ESCLERÓDIO.....	49
3.5.11 TRATAMENTO DE SEMENTES DE SOJA COM CÉLULAS E METABÓLITOS DE LABIM22	51
3.6 Conclusão.....	54
4 Artigo B.....	55
4.1 Resumo.....	55
4.2 Abstract.....	56
4.3 Introdução	57
4.4 Materiais e Métodos	59
4.4.1 MICRORGANISMOS.....	59
4.4.2 ANTAGONISMO DIRETO POR CULTURA DUPLA	59
4.4.3 CULTIVO LÍQUIDO DA CEPA LABIM22	60
4.4.4 TESTE DE DIFUSÃO EM ÁGAR	61
4.4.5 AVALIAÇÃO DE ESTABILIDADE A TEMPERATURA, LUZ E PH DOS METABÓLITOS DA CEPA LABIM22	61
4.4.6 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA.....	62
4.5 Resultados e DISCUSSÃO	62
4.5.1 ANTAGONISMO DIRETO POR CULTURA DUPLA	62
4.5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO SLC	64
4.4.3 AVALIAÇÃO DE ESTABILIDADE A TEMPERATURA, LUZ E PH DOS METABÓLITOS DA CEPA LABIM22	66
4.4.4 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (MIC)	70
4.6 Conclusão.....	72
5 Conclusões gerais.....	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

1 INTRODUÇÃO

O controle com fungicidas de origem sintética, se bem utilizado, reduz os danos causados pelas doenças de plantas, entretanto, seu uso excessivo pode causar o desequilíbrio do ecossistema microbiano existente no sistema solo - planta. Um dos fatos mais preocupantes é a pressão de seleção que este tipo de manejo causa nos fitopatógenos, possibilitando o surgimento de populações de patógenos resistentes (CAO et al., 2011).

Segundo dados da FAO (2020), em 2017 o Brasil ficou em terceiro lugar no ranking mundial de uso de agrotóxicos (herbicidas, inseticidas, fungicidas, nematicidas e bactericidas), com um total utilizado de 216.026 mil toneladas de ingrediente ativo. Os fungicidas e bactericidas somados chegaram à marca de 59.124 toneladas, ou seja, mais de 27% em relação ao total, o que evidencia o quanto a agricultura brasileira depende do uso destes produtos para controlar as doenças das culturas.

Bardas et al. (2010) testaram a sensibilidade de 76 isolados do fungo *Botrytis cinerea* frente às moléculas dos fungicidas boscalida, piraclostrobina, ciprodinil, fenhexamida, fludioxonil, iprodiona e carbendazim, verificando que o fungo se mostrou resistente às moléculas de boscalida e piraclostrobina.

Oliveira et al. (2015) em seus estudos com *Pyricularia oryzae* causador da brusone no trigo, observaram que este fitopatógeno havia adquirido resistência cruzada à azoxistrobina e piraclostrobina.

Uma das alternativas para contornar este problema é o uso do controle biológico, definido como sendo o uso de um microrganismo para reduzir o nível de doença, bem como o uso de fitopatógenos para suprimir o crescimento de plantas daninhas (PAL & GARDENER, 2006).

Na elaboração de produtos à base de agentes de controle biológico, é possível utilizar tanto bactérias quanto fungos filamentosos ou leveduriformes (NAYAKA et al., 2009). As bactérias têm sido bastante estudadas para este fim, dentre as quais o gênero *Bacillus* tem se destacado por sua capacidade de formar endósporos, possuir diferentes mecanismos de ação e produzir metabólitos de grande interesse biotecnológico (LANNA FILHO et al., 2010).

Os compostos antimicrobianos produzidos por *Bacillus* spp. são em sua maioria lipopeptídeos cíclicos como as iturinas, que são potentes antifúngicos e

as fengicinas, que, além de possuírem atividade antagônica contra fungos, podem induzir o *priming* do sistema de defesa da planta contra estes microrganismos (ONGENA & JACQUES, 2008). Além destes compostos, bactérias deste gênero também são capazes de promover o crescimento de plantas.

São consideradas bactérias promotoras do crescimento de plantas aquelas que podem contribuir para o melhor desenvolvimento da planta de forma direta ou indireta através da solubilização de fosfato, produção de ácido indol acético, sideróforos e fixação de nitrogênio atmosférico (TORTORA et al., 2010).

Squartini et al. (2019) estudaram uma cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* isolada da rizosfera de plantas de morango e constataram através do teste de cultura dupla a habilidade antagonista da cepa isolada, além de sua capacidade de indução de resistência através de maior estímulo da transdução da proteína PR1, a qual ativa sistemas de defesa da planta.

Tian et al. (2020) isolaram a cepa W176 de *Bacillus* sp. e constataram seu potencial antagonista contra *Penicillium digitatum*, causador do bolor verde em laranja, obtendo porcentagens de inibição de 89,3% com o uso de suas células e 54,46% com o uso de seu sobrenadante livre de células em frutos de laranja. Entre as possíveis moléculas estão a surfactina, macrolactina, mycosubtilina e bacillaene.

Pandim et al. (2018) utilizaram a cepa de *Bacillus velezensis* QST713 para controlar o patógeno *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum*, causador do mofo verde em champignon. A cepa em estudo é produtora de antifúngicos da família das surfactinas e fengicinas, as quais possivelmente estão envolvidas no efeito antagonista.

O objetivo do estudo foi avaliar o potencial antagônico da cepa LABIM22 de *Bacillus velezensis* contra fungos fitopatogênicos, bem como sua capacidade de sintetizar substâncias promotoras de crescimento de plantas e de controle do mofo branco em sementes de soja.

2 Revisão de literatura

2.1. FUNGOS FITOPATOGÊNICOS DE IMPORTÂNCIA AGRÍCOLA

Há vários fungos que podem causar doenças em plantas, porém nem todos causam danos econômicos expressivos. Por outro lado, alguns destes, se não controlados, causam grandes prejuízos à produção. Entre eles estão: *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cinerea*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* sp. *phaseoli* e *Fusarium solani*.

2.1.1 SCLEROTINIA SCLEROTIORUM

Sclerotinia sclerotiorum é um fungo do filo Ascomycota, classe Leotimycetes, ordem Helotiales, família Sclerotinaceae (CABI, 2018). Possui mais de 600 espécies hospedeiras, dentre elas soja, feijão, girassol, tomate. Contudo, este fungo não é capaz de infectar gramíneas (HENNING, 2012). Na soja, causa a doença conhecida como mofo branco ou podridão branca da haste, sendo uma das doenças mais antigas da cultura. Atualmente a doença está disseminada em quase todas as regiões produtoras de soja do Brasil (EMBRAPA SOJA, 2011).

O mofo branco da soja nem sempre foi de ocorrência contínua e causador de grandes perdas em áreas de cultivo de sequeiro. Contudo, vários eventos contribuíram para que este patógeno ganhasse importância, como grandes áreas de monocultivo, ausência de rotação de cultura com espécies não hospedeiras (gramíneas), uso de sementes contaminadas, temperaturas noturnas abaixo de 18 °C, chuvas prolongadas, emprego de espécies suscetíveis para sucessão ou até mesmo safras contínuas de soja (SILVA et al., 2010; JULIATTI & JULIATTI, 2010).

Sua disseminação pelo país tem aumentado tanto no cerrado como no Sul e Sudeste. Segundo Meyer et al. (2014) no ano de 2014 o patógeno estava presente em cerca de 23% das áreas produtoras de soja, o que representa 6,8 milhões de hectares. Na safra 2015/2016, segundo a Conab (2016), este número já estava em

torno de 7,7 milhões de hectares, o que indica que o mofo branco vem causando cada vez mais prejuízos na cultura da soja.

Temperaturas entre 10°C a 21°C, umidade acima de 70% e altitudes superiores a 800 m são as condições ideais para o bom desenvolvimento do fungo. Devido ao elevado número de espécies hospedeiras o seu controle é difícil, recomendando-se rotação de cultura com gramíneas (BASTIEN et al., 2012). Ainda assim, esta prática não garante que a doença não seja reincidente pois o fungo produz escleródios, estrutura de resistência que permanece no solo até que haja condições ambientais favoráveis para o seu desenvolvimento, que permanecem na lavoura por um tempo prolongado que pode ser de anos.

Quando a cultura da soja atinge os estágios de desenvolvimento R2 (plena floração) e R3/R4 (início da formação de vagens), a parte aérea das plantas se encontra cobrindo a entrelinha de semeadura, o que favorece o aumento da umidade e diminuição da temperatura, que são condições ideais para os escleródios germinarem produzindo os apotécios, os quais originarão os ascósporos, que por sua vez irão infectar os tecidos senescentes das plantas de soja (CUNHA, 2010).

Os sintomas se iniciam como manchas de anasarca, com o avanço da doença estas manchas adquirem coloração castanho clara e forma se uma massa micelial branca de aspecto cotonoso, as quais em poucos dias irá originar os escleródios, podendo se formar na parte exterior e interior dos tecidos da planta. O patógeno pode infectar qualquer parte da planta, porém na maioria das vezes as infecções se iniciam nas inflorescências, axilas do pecíolo e ramos laterais (GODOY et al., 2016).

Trabalhos de controle químico coordenados pela Embrapa, demonstraram uma redução de 20 a 30% na produtividade da soja, chegando a 70% em alguns casos (MEYER et al., 2019).

Para o controle eficiente da doença a fim de reduzir os danos a níveis aceitáveis é necessário diminuir a fonte de inóculo (escleródios) e taxa de progresso da doença. Evitar a formação de escleródios, inviabilização da germinação destes através do uso de palhada de gramínea (espécie não hospedeira), rotação ou sucessão de cultura com gramíneas, controle biológico com o estabelecimento de antagonistas no solo, uso de sementes saudáveis e tratadas com fungicida e aplicações de moléculas de origem química sintética no estágio de maior vulnerabilidade da soja ao ataque de *S. sclerotiorum* (R1 a R4), são formas que podem ser combinadas a fim

de reduzir a quantidade de inóculo. A redução do inóculo inicial e incidência pode ser alcançada através de limpeza do maquinário utilizado nos tratos culturais, caso o mesmo tenha sido utilizado em áreas infestadas, escolha de cultivares com arquitetura de parte aérea que favoreça a circulação de ar e que tenham o período de florescimento mais curto, pois é a fase em que a infecção pelo patógeno é mais efetiva. Um bom controle depende deste conjunto de estratégias, tendo em vista que o uso de qualquer medida de manejo isolada possui baixa ou nenhuma efetividade (CAMPOS et al., 2010, MEYER, 2013).

Cultivares de soja com resistência completa ao mofo branco não foram identificadas até o momento (JULIO, 2016).

2.1.2 *FUSARIUM OXYSPORUM F. SP. PHASEOLI*

O fungo *Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *phaseoli* Kendrick e Snyder é um habitante de solo que no feijão causa a doença conhecida como murcha de fusarium, sendo uma das principais doenças da cultura, ocorrendo praticamente em todo o território brasileiro, sobretudo em áreas de monocultivo (WORDELL FILHO et al., 2013).

O fitopatógeno *F. oxysporum* pertence à família Nectriaceae, ordem Hypocreales, classe Sordariomycetes, filo Ascomycota, reino Fungi (GEISER et al., 2013).

O micélio de *F. oxysporum f. sp. phaseoli* com crescimento recente possui coloração branca, porém, com o tempo pode adquirir coloração rosada. Esta espécie produz 3 tipos de esporos: microconídios, macroconídios e clamidósporos. Microconídios são numerosos sendo a maior parte deles não septados, não apresentam uma uniformidade quanto ao seu formato podendo ser elíptico, oval ou cilíndrico. Macroconídios possuem uma forma mais homogênea, sendo curvos e mais pontiagudos em ambas as extremidades. A maioria possui 3 septos, são sempre maiores se comparados aos microconídios. Clamidósporos são ocasionalmente encontrados agrupados, porém, é mais comum ocorrerem de forma unitária, possuem paredes lisas ou rugosas (BOOTH, 1971).

O inóculo inicial de *F. oxysporum* pode estar no solo ou na semente em forma de clamidósporos, os quais utilizarão exsudados do próprio hospedeiro para

germinar e infectar a raiz através de aberturas pré-existentes (LUGO, 2008). Ao infectar a raiz o patógeno toma o córtex e o sistema vascular do hospedeiro, onde produzirá microconídios, os quais por sua vez serão transportados pelo xilema, causando novos pontos de infecção na parte aérea da planta (BECKMAN, 1987). A colonização do sistema vascular interrompe a passagem de água para a parte mais alta da planta, causando o sintoma de murcha (SILVA, 2012).

Os principais sintomas são folhas cloróticas evoluindo das partes inferiores até a parte superior do hospedeiro, murcha e reboleira em áreas recém infestadas (WORDELL FILHO et al., 2013).

Uma das formas de controle é impedir que o patógeno chegue na área, portanto, é importante realizar a limpeza dos equipamentos utilizados nos tratamentos culturais e utilizar água livre de contaminação. O tratamento de sementes com fungicida para proteger a planta em seus estágios iniciais, bem como o uso de sementes saudáveis também ajudam a conter a doença (BIANCHINI et al., 2005). A forma mais eficaz e econômica é a utilização de variedades resistentes, no entanto, há pouca disponibilidade destes materiais no mercado.

2.2 BACTÉRIAS UTILIZADAS NO BIOCONTROLE DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS.

Segundo o U.S. National Research Council (1995), "o controle biológico é o uso de organismos naturais ou modificados, genes ou produtos gênicos, para reduzir o efeito de organismos indesejáveis e favorecer organismos desejáveis como culturas, insetos benéficos e microrganismos"

O biocontrole não consiste em erradicar o patógeno, mas sim em amenizar os prejuízos biológicos e econômicos de forma sustentável. (GOVINDASAMY et al., 2010).

Para elaboração de um bioproduto pode-se utilizar desde as mais variadas espécies de bactérias, fungos filamentosos e até mesmo leveduras. (NAYAKA et al., 2009). O biocontrole utiliza microrganismos como antagonistas, os quais podem agir parasitando o patógeno, competindo por nutrientes e espaço ou até mesmo produzindo moléculas antimicrobianas.

Desde a década de 1980 vários microrganismos vêm sendo estudados como agentes de biocontrole.

Kerr (1980) utilizou uma cepa de *Agrobacterium radiobacter*, a qual produz a molécula agrocina 84 com ação antagonista a *A. tumefaciens*.

Smith et al. (1993) estudaram uma cepa de *Bacillus cereus* produtora de Zwittermicina A, inibidora do desenvolvimento de *Phytophthora medicaginis* e *Pythium aphanidermatum*.

Ji et al. (2013) trabalhando com uma cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* constataram que a mesma possuía ação satisfatória contra 12 fungos fitopatogênicos entre eles *S. sclerotiorum*, *B. cinerea* e *F. oxysporum*, por conta da produção de iturina.

As bactérias do gênero *Bacillus* se destacam entre os microrganismos mais estudadas por apresentar potencial não apenas na área agrônômica, mas também nas áreas farmacêutica e industrial (LANNA et al., 2010).

2.3 *BACILLUS* SPP.

O gênero *Bacillus* pertence à família Bacillaceae. São bactérias Gram positivas, aeróbias ou anaeróbias facultativas. São capazes de produzir substâncias de grande importância biotecnológica como precipitadores de íons, enzimas amilolíticas, proteolíticas e antimicrobianos (SCHWANTES-CEZARIO et al., 2017).

Estas bactérias encontram-se presentes na maioria dos ambientes por conta de sua capacidade de formar endósporos (estruturas de resistência que auxiliam na sua sobrevivência em situações adversas), desenvolvimento acelerado e baixa exigência nutricional (em comparação a outros gêneros bacterianos) (BLUMA & ETCHEVERRY, 2006).

Seu modo de ação sobre outros organismos pode acontecer por parasitismo e competição, porém, na maioria das vezes, ocorre por produção de lipopeptídeos com ação antimicrobiana (EARL et al., 2008). Lipopeptídeos são formados por peptídeos cíclicos ou lineares curtos podendo ser ligados a uma molécula lipofílica ou a um anel com cauda lipídica e possuem baixo peso molecular (ARNUSCH et al., 2012).

As iturinas são lipopeptídeos cíclicos ligados a sete resíduos de α -aminoácidos e um de β -aminoácido, contendo também uma cadeia lateral não sintetizada por ribossomos; seu peso molecular é de aproximadamente 1042 Da

(GRAU et al., 2000). Por sua natureza anfífila se ligam às membranas formando pequenas vesículas o que provoca a formação de poros, culminando na solubilização da membrana celular do patógeno (ETCHEGARAY et al., 2008).

A surfactina é um lipopeptídeo cíclico com um ácido graxo β -hidroxilado ligado a sete aminoácidos por um grupo amida e uma ligação lactona (KAKINUMA et al., 1969) seu peso é de aproximadamente 1050 Da (ARIMA et al., 1968). Atua como um poderoso biossurfactante, reduzindo a tensão superficial da água de 72 para 27,9 mN m⁻¹ (ARIMA et al., 1968). Esta substância sozinha não possui atividade antifúngica, porém, pode atuar de forma sinérgica com a iturina A (COUTTE et al., 2010), por conta de sua ação surfactante que enfraquece a membrana e facilita a ação da iturina A (MAGET-DANA et al., 1992).

As fengicinas são lipodecapeptídeos que possuem um anel lactona em sua fração peptídica e um ácido graxo β -hidroxi podendo ser insaturado ou saturado (MUKHERJEE & DAS, 2005). Estas substâncias são utilizadas como "fungicidas verdes" contribuindo para a sanidade de diversas culturas. Os antifúngicos peptídicos, além de possuir atividade antifúngica são capazes de induzir o *priming* do sistema de defesa das plantas. Entender melhor seu modo de ação é de grande importância para o desenvolvimento destes produtos (ONGENA & JACQUES, 2008).

Cao et al. (2018) estudaram duas cepas de *Bacillus velezensis* (Y6 e F7), e verificaram que os dois isolados em estudo eram capazes de inibir o crescimento de *Ralstonia solanacearum* em casa de vegetação de 65% para 29% com a cepa Y6 e 35% com a cepa F7, sendo identificadas biomoléculas da família das iturinas, surfactina e fengicina.

He et al. (2019) isolaram a cepa BJJ – 1 de *Bacillus subtilis* de uma placa de petri com cultivo de *Magnaporthe oryzae*. Através do teste de cultura dupla e da utilização do seu sobrenadante livre de células constataram seu potencial biotecnológico no controle do fungo *M. oryzae*, reduzindo a doença em 50% tanto na aplicação por pulverização em plantas de arroz quanto no tratamento de sementes. Já no tratamento de sementes de modo preventivo a redução da doença foi superior a 70%.

2.4 BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO

Bactérias promotoras de crescimento são microrganismos que de forma direta ou indireta melhoram o crescimento da planta, através da fixação do nitrogênio atmosférico, produção de sideróforos, oxidação do enxofre, solubilização de fósforo, produção de ácido indol acético (TORTORA et al., 2010) e de substâncias derivadas de adenina, que são precursores de reguladores vegetais, auxinas, citocininas, giberilinas, etileno e ácido ascórbico (SILVEIRA, 2008).

Muitas vezes a atividade promotora de crescimento está relacionada com a atividade antagonista a patógenos do solo, portanto, além de toda produção de substâncias benéficas ao desenvolvimento da planta, há possibilidade de produção de antimicrobianos e de indução de resistência sistêmica das plantas (DOORNBOS et al., 2012)

Os benefícios para as plantas podem ser desde a melhora da germinação de sementes, emergência de plântulas até o crescimento da raiz (FIGUEREDO et al., 2010).

O número de trabalhos visando entender melhor a relação entre microrganismos e plantas está aumentando, uma vez que o entendimento da mesma auxilia na seleção de cepas para serem utilizadas em grandes culturas. A aplicação destas bactérias junto a biofertilizantes vem sendo muito utilizada pois, além do aumento da produtividade e diminuição do impacto ambiental, os custos são mais reduzidos (BHATTACHARYYA & JHA, 2012).

Dentre as bactérias estudadas para este fim, se destacam os gêneros *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Rhizobium* e *Bacillus* (ARAUJO, 2008).

Szilagyi-Zecchin et al. (2014) estudaram uma cepa de *B. amyloliquefaciens* quanto a sua capacidade de promoção de crescimento em tomateiro. Verificaram que a mesma era produtora de compostos indólicos e sideróforos e que, quando aplicada em forma de suspensão de células em sementes aumentou os teores de clorofila e promoveu um ganho de crescimento da parte aérea da planta.

Hartmann et al. (2010) utilizando uma cepa de *B. megaterium* em aplicação de suspensão bacteriana em sementes de cebola e semeadas a campo, observaram que a cepa estudada aumentou o rendimento dos bulbos.

Mazzuchelli et al. (2015) trabalharam com *B. subtilis* em aplicação de suspensão aquosa no sulco de semeadura e inoculação em pó na semente e concluíram que o microrganismo estudado aumentou em 20% a massa fresca do milho quando comparado com o tratamento controle.

Portanto, o uso de bactérias do gênero *Bacillus* são de grande importância não apenas para o controle de doenças, mas também para a promoção de crescimento de plantas, sendo assim este gênero tem sido constantemente estudado por conter diversos interesses biotecnológicos.

3 ARTIGO A

EFICIÊNCIA DA CEPA DE *Bacillus velezensis* LABIM22 CONTRA *Sclerotinia sclerotiorum* IN VITRO E CONTROLE DO MOFO BRANCO EM SEMENTES DE SOJA

3.1 Resumo

O objetivo deste estudo foi identificar molecularmente a cepa LABIM22 e fazer uma predição dos metabólitos secundários presentes no seu genoma, avaliar *in vitro* seu potencial antagônico contra fungos fitopatogênicos (*Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani* e *Macrophomina phaseolina*) e de promoção de crescimento vegetal e, *in vivo*, avaliar a inibição da germinação carpogênica de escleródios e o controle do mofo branco em sementes infectadas com *S. sclerotiorum* e tratadas com uma formulação a base da cepa LABIM22. O sequenciamento completo do DNA revelou que a cepa em estudo possui 99% de semelhança com o gênero *Bacillus*. A partir do genoma foi realizada a predição de metabólitos e verificou-se que a cepa LABIM22 possui genes que codificam moléculas antimicrobianas (fengicina, bacilibactina, difucidina, macrolactina, bacilysina e bacilaene) e biossurfactante (surfactina). O potencial antagônico foi investigado pelo teste de cultura dupla entre LABIM22 e os fungos fitopatogênicos, exibindo redução do crescimento micelial de 59% para *S. sclerotiorum*, 66% para *M. phaseolina* e *B. cinerea* e 64% para *R. solani*. Com o objetivo de maximizar a produção de suas moléculas bioativas três meios de cultivo diferentes foram testados, sendo o meio formulado (formulação em processo de patente) o mais eficiente. A estabilidade do sobrenadante livre de células (SLC) a partir do cultivo da cepa LABIM22 foi estudado a diferentes temperaturas, pH e comprimentos de onda. Verificou-se que os metabólitos são estáveis a 121 °C 1 atm de pressão por 15 minutos, a pH entre 3 e 11 e sob luz com comprimentos de onda de 254 nm, 365 nm e luz branca. LABIM22 não mostrou atividade *in vitro* de metabolização de ácido indol acético nem de solubilização de fosfato. O resultado para produção de biossurfactante foi positivo, exibindo um halo de hemólise de 20 mm em meio ágar sangue. Na avaliação da inibição da germinação carpogênica de escleródios de *S. sclerotiorum*, foram utilizadas as concentrações de SLC liofilizado de 0,5 mg/ml, 1 mg/ml e 2 mg/ml e o

fungicida químico boscalida + dimoxistrobina (Spot SC®). A germinação dos escleródios não foi diferente do controle com água, porém, houve diminuição do número de apotécios formados a partir dos escleródios, mesma redução que a do tratamento com Spot SC®. O tratamento de sementes de soja, previamente infectadas com *S. sclerotiorum*, com pó molhável a base de LABIM22 na dose de 300g/100 kg de semente teve 93,5% de germinação e 94% de sementes saudáveis, sem diferença significativa com os fungicidas químicos utilizados como controle (tiofanato metílico+fluazinam e boscalida+dimoxistrobina). Conclui-se que a cepa LABIM22 de *B. velezensis* possui atividade antagonista frente a *S. sclerotiorum*, *B. cinerea*, *R. solani* e *M. phaseolina*, produz metabólitos antifúngicos estáveis em condições adversas, os quais juntamente com suas células foram capazes de inibir a formação dos apotécios a partir de escleródios de *S. sclerotiorum* e controlar o mofo branco em sementes de soja infectadas com *S. sclerotiorum*.

Palavras chave: Antagonismo, *Bacillus* sp., Biocontrole, tratamento de sementes.

3.2 Abstract

The objective of this study was to molecularly identify the LABIM22 strain and make a prediction of the secondary metabolites present in its genome, to evaluate its antagonistic potential *in vitro* against phytopathogenic fungi (*Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani* and *Macrophomina phaseolina*) and to promote plant growth and to evaluate *in vivo* the inhibition of carpogenic germination of sclerotia and the control of white mold in seeds infected with *S. sclerotiorum* and treated with a formulation based on the LABIM22 strain. Complete DNA sequencing revealed that the strain under study is 99% similar to *Bacillus* genus. From the genome, the metabolites were predicted and it was found that the LABIM22 strain has genes for producing antimicrobials (fengicin, bacillibactin, difigidin, macrolactin, bacilysin and bacilaene) and biosurfactant (surfactin). The antagonistic potential was investigated by dual culture test against phytopathogenic fungi, showing a reduction in mycelial growth of 59% for *S. sclerotiorum*, 66% for *M. phaseolina* and *B. cinerea* and 64% for *R. solani*. In order to maximize the production of its bioactive molecules, three different culture media were tested. The most efficient was the formulated medium (patent in process). The stability of cell-free supernatant (SLC) from the cultivation of the strain LABIM22 was studied at different temperatures, pH and wavelengths. It was found that the metabolites were stable at 121 °C and 1 atm of pressure for 15 minutes, at pH between 3 and 11 and under light with wavelengths of 254 nm, 365 nm and white light. LABIM22 showed no *in vitro* activity of indole acetic acid metabolism or phosphate solubilization. The result for the production of biosurfactant was positive, showing a hemolysis halo of 20 mm in blood agar medium. Lyophilized SLC from LABIM22 at 0.5 mg/ml, 1 mg/ml and 2 mg/ml and the chemical fungicide were tested on *S. sclerotiorum* sclerotia. Carpogenic germination of sclerotia was not different from control with water, however, at 1 mg/ml and 2 mg/ml there was a decrease in the number of apothecia, same reduction as in the chemical control (boscalide + dimoxystrobin). The treatment of soybean seeds previously infected with *S. sclerotiorum* with wettable powder based on LABIM22 at 300g/100 kg of seed showed 93.5% of germination and 94% of healthy seeds with no significant difference with the chemical control (methyl thiophanate +

fluazinam and boscalide + dimoxystrobin). It is concluded that *Bacillus velezensis* strain LABIM22 has antagonistic activity against *S. sclerotiorum*, *B. cinerea*, *R. solani* and *M. phaseolina*, produces antifungal metabolites stable in adverse conditions, which together with its cells were capable to inhibit the formation of apothecia from *S. sclerotiorum* sclerotia and efficiently controlled the incidence of white mold in soybean seeds infected with *S. sclerotiorum*.

Keywords: Biocontrol, seed treatment, *Bacillus* spp., *Sclerotinia stem rot*.

3.3 Introdução

A soja é uma das espécies mais cultivadas do mundo por conta de sua versatilidade, que vai desde o uso de seu óleo para consumo humano até a fabricação de biodiesel. Devido ao seu alto teor de proteína, serve como matéria prima tanto para alimentos de consumo humano quanto animal. Na safra 2018/2019 foram produzidas 362.075 milhões de toneladas do grão em uma área de cultivo de 125.691 milhões de hectares. Atualmente o Brasil se encontra na segunda posição do ranking mundial de produção da soja, com 114.843 milhões de toneladas produzidas na safra 2018/2019, ficando atrás apenas do EUA (EMBRAPA, 2020).

A produção de soja no Brasil vem crescendo ano a ano, com um aumento estimado de 2,6% em termos de área cultivada para o ano de 2020, o que representa o acréscimo de um milhão de hectares cultivados (CONAB, 2020).

Um dos fatores limitantes para produtividade da cultura são as doenças. O mofo branco, causado pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, se destaca por causar reduções de até 29% na produtividade da soja (MEYER et al., 2018).

Também conhecido popularmente como mofo branco ou podridão de esclerotinia, a doença pode se propagar tanto por micélio dormente na parte interna da semente quanto por escleródios presentes nos lotes (HENNING, et al., 2014). O escleródio é a estrutura de resistência do patógeno, que consiste em um emaranhado de hifas compactadas que podem germinar quando as condições ambientais tornam-se favoráveis.

Em ocasião do fechamento das entrelinhas pela parte aérea da planta, ocorre aumento da umidade e diminuição da temperatura, que são as condições ideais para a germinação carpogênica dos escleródios, os quais geram os apotécios que produzem os ascósporos. Estes esporos sexuais iniciam o processo de infecção dos tecidos senescentes da planta (CUNHA, 2010).

O manejo da doença consiste no uso de sementes saudáveis e tratamento com fungicidas de origem química sintética. Uma alternativa para o manejo integrado da doença é o uso do controle biológico utilizando fungos filamentosos como *Trichoderma* spp. ou leveduriformes, bactérias dos gêneros *Pseudomonas* ou *Bacillus* e até mesmo microvírus como relatado por Picarelli et al. (2017).

Dentre estes possíveis agentes de biocontrole bactérias do gênero *Bacillus* vêm sendo amplamente estudadas por sua capacidade de sintetizar

biomoléculas com ação antifúngica e bactericida, além de produzir substâncias que promovem o crescimento de plantas. Estes microrganismos podem formar endósporos em condições adversas, característica importante para sobrevivência do antagonista em formulações de bioprodutos e colonização dos órgãos vegetativos da planta (LANNA FILHO et al., 2010).

Portanto, o objetivo do estudo foi: a) identificar molecularmente a cepa antagonista LABIM22, b) comprovar seu potencial antagônico frente a *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cinerea*, *Macrophomina phaseolina* e *Rhizoctonia solani*, c) investigar *in vitro* sua capacidade de promoção de crescimento de plantas de soja, d) avaliar a inibição da germinação carpogênica de escleródios de *S. sclerotiorum* e e) avaliar o controle do mofo branco em sementes infectadas com *S. sclerotiorum* e tratadas com uma formulação a base da cepa LABIM22.

3.4. Material e métodos

3.4.1 MICRORGANISMOS

Para a escolha da cepa antagonista LABIM22 foi realizado um *screening* entre nove cepas isoladas de uma amostra ambiental do solo no Laboratório de Biotecnologia Microbiana – LABIM da Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil. Foi feito um teste de antagonismo direto por cultura dupla, na qual o isolado em questão mostrou-se com maior potencial de antagonismo frente ao fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum*.

A cepa LABIM22 está mantida na coleção do mesmo laboratório e a ativação da cepa foi realizada em meio Lúria Bertani a 28 °C por 24 h.

Os fungos fitopatogênicos *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cinerea*, *Macrophomina phaseolina* e *Rhizoctonia solani*, estão mantidos na coleção do Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual de Londrina. Para ativação das cepas fitopatogênicas, foram realizados cultivos em meio batata dextrose ágar (BDA) a 25 °C e fotoperíodo de 12/12 h.

3.4.2 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DO ISOLADO LABIM22

O genoma completo de LABIM22 foi sequenciado em plataforma Illumina MiSeq PE 300 na EMBRAPA Soja (Londrina). O resultado deste sequenciamento foi utilizado para identificação do gênero bacteriano no Laboratório de Biotecnologia Microbiana (LABIM) através de uma comparação de genomas usando o Ani calculator (<https://www.ezbiocloud.net/tools/ani>) e o dDDH (Hibridização DNA-DNA digital) (<https://www.dsmz.de/services/online-tools/genome-to-genome-distance-calculator-ggdc>) ambos web server.

3.4.3 PREDIÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

A identificação dos possíveis *Biosynthetic gene clusters* (BGCs) foi realizada através do web server antiSMASH 4.0 (WEBER et al., 2015).

3.4.4 ENSAIO DE ANTAGONISMO DIRETO POR CULTURA DUPLA

A cepa LABIM22 foi ativada em meio Lúria Bertani ágar (LBA) (Acumedia, USA) a 28 °C por 24 h. Para o teste de antagonismo, a cepa LABIM22 foi inoculada na borda da placa contendo meio BDA com auxílio de alça bacteriológica. Em seguida um disco micelial de 6 mm de diâmetro do fungo fitopatogênico (*S. sclerotiorum*, *M. phaseolina*, *B. cinerea* ou *R. solani*) foi inoculado no centro da placa. As placas foram incubadas a 25 °C e fotoperíodo de 12/12 h. Placas somente com o fungo fitopatogênico foram utilizadas como controle. Após 3 dias para *S. sclerotiorum* ou 7 dias para os fungos *M. phaseolina*, *B. cinerea* e *R. solani*, segundo a velocidade de crescimento de cada fungo fitopatogênico, foi avaliado o crescimento micelial em milímetros (mm). A porcentagem de inibição do crescimento micelial foi calculada através da seguinte fórmula:

$$\text{ICM (\%)} = \left[\frac{dc - dt}{dc} \right] \times 100$$

Onde, 'ICM' representa a porcentagem de inibição do crescimento micelial, 'dc' diâmetro médio da colônia no controle e 'dt', diâmetro médio da colônia de cada tratamento, todos medidos em mm (YAHYAZADEH et al., 2008).

O delineamento do experimento foi inteiramente casualizado com 8 repetições. O experimento foi realizado duas vezes.

3.4.5 PRODUÇÃO DE SOBRENADANTE LIVRE DE CÉLULAS

Para o preparo do pré-inóculo, colônias puras foram suspensas em solução salina (0,85% cloreto de sódio) e ajustada para 0,5 na escala de McFarland (1.5×10^8 UFC/mL). Para o preparo do inóculo, trinta microlitros dessa suspensão foram transferidos para frascos erlenmeyer de 125 mL contendo 30 mL de caldo LB e incubado a 28 °C por 24 h a 125 rpm (Shaker orbital Tecnal - TE 422, Brasil). Para a produção de metabólitos antifúngicos, alíquotas de 1% (v:v) de cada inóculo foram transferidos para frascos erlenmeyer de 1000 mL contendo 400 mL de três tipos de meio de cultivo diferentes. Meio 1 (LB): caldo LB (g L⁻¹: triptona 10.0, extrato de levedura 5.0, NaCl 5.0, pH 6.8-7.0). Meio 2 (LB + M): caldo LB + Micronutrientes (g L⁻¹: triptona 10.0, extrato de levedura 5.0, NaCl 5.0, diferentes micronutrientes - formulação em pedido de patente, pH 6.8-7.0). Meio 3 (MF): caldo formulado (meio composto por fontes de carbono, nitrogênio e diferentes micronutrientes – formulação em pedido de patente). Os três meios de cultivo, após inoculados, foram incubados a 28 °C e 200 rpm em incubadora giratória em disposição aleatória por 72 h (Shaker orbital Tecnal - TE 422, Brasil). Após a etapa de produção, as culturas foram centrifugadas a 4 °C e 9000 rpm por 10 min e filtradas em membranas de 0.22 µm para obtenção do sobrenadante livre de células (SLC).

3.4.6 TESTE DE DIFUSÃO EM ÁGAR

Os fungos fitopatogênicos foram repicados em meio BDA em placas de Petri de 90 mm de diâmetro e incubados a 25 °C e fotoperíodo de 12/12 h. Foi retirado um disco micelial de 6 mm de diâmetro de uma colônia fúngica de 3 dias para *S. sclerotiorum* ou 7 dias para os fungos *M. phaseolina*, *B. cinerea* e *R. solani*, dependendo da velocidade de desenvolvimento de cada patógeno e inoculado no centro da placa. Na borda da placa foram feitos de forma equidistantes quatro poços de 6 mm de diâmetro e 200 µL do SLC foram depositados nos poços. As placas foram incubadas a 25 °C e fotoperíodo de 12/12 h. Como controle foram utilizadas placas

somente com o fungo fitopatogênico. Após 3 dias para *S. sclerotiorum* ou 7 dias para os fungos *M. phaseolina*, *B. cinerea* e *R. solani*, segundo a velocidade de crescimento de cada fungo fitopatogênico, foi determinado o diâmetro da colônia fúngica. O delineamento do experimento foi inteiramente casualizado com 8 repetições. O experimento foi realizado duas vezes.

3.4.7 TESTES DE ESTABILIDADE DOS METABÓLITOS DA CEPA LABIM22 A DIFERENTES TEMPERATURAS, FAIXAS DE LUZ E PH

Para avaliar a estabilidade térmica dos metabólitos produzidos pela cepa LABIM22 após a cultivo da cepa antagonista em meio líquido, o sobrenadante foi centrifugado a 9000 rpm por 10 minutos e submetido a temperaturas constantes de 70 °C e 100 °C (banho maria, TECNAL, Brasil) por 30 minutos e de 121 °C por 15 min (autoclave, Primatec, Brasil). Uma alíquota sem tratamento térmico foi considerada como controle. Após o tratamento térmico, as amostras foram resfriadas até atingir temperatura ambiente (25 °C), esterilizadas com membrana de celulose de 0,22 µm (Millipore, Bedford, MA) e testadas segundo metodologia descrita no item 3.4.6.

Para avaliar a estabilidade fotométrica, amostras do sobrenadante centrifugado foram expostas a luz nos comprimentos de onda de 365 nm, 254 nm e luz branca por 30 minutos (distância de 15 cm da fonte luminosa). Após o tratamento, as amostras foram esterilizadas com membrana de celulose de 0,22 µm (Millipore, Bedford, MA) e testadas conforme o item 3.4.6.

Para avaliar a estabilidade química, amostras do sobrenadante centrifugado foram expostas a pH de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, e 11,0 e mantidos a 4 °C por 24 h. Foram utilizados HCl 1 M ou NaOH 1 M para obter os pH citados. Após este período, as amostras foram ajustadas novamente para pH 7,0, esterilizadas em membrana de celulose de 0,22 µm (Millipore, Bedford, MA) e testadas conforme o item 3.4.6.

Cada teste foi realizado separadamente com delineamento experimental inteiramente casualizado com 8 repetições. Todos os testes de estabilidade foram realizados apenas com *S. sclerotiorum*. Cada experimento foi realizado 3 vezes.

3.4.8 PRODUÇÃO DE ÁCIDO INDOL ACÉTICO (AIA)

Para avaliar a capacidade de produção de ácido indol acético da cepa LABIM22 foi utilizada a quantificação colorimétrica usando o reagente de Salkowsky de Sarwar e Kremer (1995) modificado por Bautista e Gallardo (2008). A cepa antagonista foi ativada conforme o item 3.4.1, cultivado em triplicata no meio DYGS líquido e incubado a 28°C e 180 rpm por 48 h. Após este período a concentração de células foi ajustada para uma densidade óptica de 600 nm igual a 0,3 ($DO_{600}=0,3$). Em seguida, 100 µL deste inóculo foi adicionado a 10 mL de meio DYGS suplementado com uma concentração de 100 mg/mL de L-triptofano e incubado a 28°C e 180 rpm por 48 h. O controle utilizado foi o meio DYGS suplementado com L-triptofano na mesma concentração, porém sem a presença do microrganismo antagonista. Após incubação, o fermentado foi centrifugado a 9000 rpm por 5 minutos. Um mL do SLC foi colocado junto com 2 mL do reagente de Salkowsk modificado ($FeCl_3$ 40 mM; H_2SO_4 7,9 M) no escuro a 25 °C por 30 minutos. A absorbância foi medida a 530 nm em espectrofotômetro.

A curva de AIA padrão foi realizada com uma concentração crescente de 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 µg/mL de AIA comercial misturado com o reagente de Salkowsk na proporção 1:2, respectivamente. A reação ocorreu no escuro a 25 °C por 30 minutos e a absorbância foi medida a 530 nm. Todas as determinações foram feitas em triplicata.

3.4.9 TESTE DE SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO

A atividade de solubilização de fosfato foi determinada qualitativamente em meio GL (KATZNELSON e BOSE, 1959). Para isso foram autoclavados 3 frascos separados contendo no frasco 1: glicose (5 g/L), extrato de levedura (1 g/L) e ágar (15 g/L). Frasco 2: 50 mL da solução de K_2HPO_4 10% e frasco 3: 100 mL da solução de $CaCl_2$ 10%. Após autoclavagem esperou-se os 3 frascos resfriarem a 50 °C e o frascos 2 e 3 foram adicionados ao frasco 1, precipitando $CaHPO_4$.

O isolado foi ativado em meio LBA a 28 °C por 24 h e posteriormente cultivado em meio GL e incubado a 28 °C por 3 dias. Um halo claro formado em torno

das colônias indica atividade de solubilização de fosfato. O isolado foi classificado como: (-) sem halo ou falta de atividade; (+) pequeno halo (até 2 mm), pouca atividade; (++) halo médio (2 a 4 mm) atividade mediana; (+++) halo grande (> 4 mm), atividade alta. O delineamento do experimento foi inteiramente casualizado com 8 repetições. O experimento foi realizado duas vezes.

3.4.10 ATIVIDADE HEMOLÍTICA EM ÁGAR SANGUE

A determinação de biossíntese de biossurfactante foi realizada em placas de petri contendo o meio ágar sangue (ágar 1,5% e sangue de carneiro 6%) através da detecção da atividade hemolítica. Para isso, em placas contendo meio ágar sangue foram feitos poços de 6 mm de diâmetro e aplicados 200 µL do SLC da cepa LABIM22. A formação de um halo translúcido em volta do poço indica a presença de biossurfactante. O teste foi constituído de 8 repetições. O experimento foi realizado duas vezes.

3.4.11 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

Para o experimento de concentração inibitória mínima o SLC foi liofilizado (modelo L101 – Liobras). Uma alíquota de 200 mg do material resultante da liofilização foi suspenso em 2 mL de água destilada, obtendo a concentração 100.000 µg/mL e diluídas para obtenção das concentrações 50.000 µg/mL, 25.000 µg/mL, 12.500 µg/mL, 62.50 µg/mL e 31.250 µg/mL. Após esta etapa, uma alíquota de 1 mL de cada concentração foi adicionada a 99 mL de BDA e o meio foi autoclavado a 121 °C e 1 atm por 15 minutos. Como controle foi adicionado 1 mL água a 99 mL de BDA. Após autoclavagem 10 mL de meio foi vertido em placa de 60 mm de diâmetro e inoculado no centro com um disco micial de *S. sclerotiorum*. As placas foram incubadas a 25 °C e fotoperíodo de 12/12 por 48 h. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 4 repetições. O experimento foi realizado duas vezes.

3.4.12 GERMINAÇÃO DE ESCLERÓDIOS

O SLC da LABIM22 foi liofilizado e ressuspenso para concentração de 2 mg/mL e diluído para obtenção das concentrações de 1 mg/mL e 0,5 mg/mL. Os tratamentos testados foram: 2 mg/mL, 1 mg/mL e 0,5 mg/mL de LABIM22, Spot SC da empresa BASF® (200,00 g/L boscalida + 200,00 g/L dimoxistrobina), meio formulado, e água destilada.

Os escleródios foram produzidos pelo cultivo de *S. sclerotiorum* em aveia preta. Para tanto, 400 g de grãos de aveia preta foram acondicionados em um erlenmeyer de 2 L, com adição de 60 mL de água destilada e autoclavado a 121 °C e 1 atm de pressão por 20 min. Após o primeiro ciclo de autoclavagem, adicionou-se mais 40 mL de água e autoclavou-se por mais 20 min. A partir de uma cultura de 3 dias em meio BDA, foram retirados discos miceliais para inocular os grãos de aveia preta já esterilizados no erlenmeyer. Os frascos foram incubados em a 18 °C por 30 dias. Após a formação dos escleródios, os mesmos foram coletados para utilização no experimento.

Uma mistura de solo e areia na proporção 3:1 (m/m) foram autoclavados a 121 °C e 1 atm de pressão por 2 h. Duzentos gramas da mistura solo/areia foram colocados em caixas plásticas de poliestireno (11 cm x 11 cm x 35 cm) e umedecidos com aproximadamente 40 mL de água destilada e esterilizada.

Os escleródios foram desinfetados superficialmente em álcool 70% por 1 min, hipoclorito de sódio 0,5% por 3 min, três lavagens em água destilada esterilizada e secos em papel filtro estéril em câmara de fluxo laminar.

Vinte escleródios foram dispostos na superfície da mistura solo/areia em caixa plástica e 240 µL de cada tratamento (equivalente a uma aplicação de 200L/ha) foram aplicados por aspersão. As caixas foram incubadas a 18 °C sob luz constante por 30 dias. Após este período foram avaliados o número de escleródios germinados, estipes e apotécios.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Cada tratamento foi composto por 5 repetições com 20 escleródios por repetição.

3.4.13 TRATAMENTO DE SEMENTES DE SOJA COM CÉLULAS E METABÓLITOS DE LABIM22

O sobrenadante obtido do cultivo da LABIM22 em meio formulado foi obtido conforme descrito no item 3.4.5 foi congelado a - 80 °C e liofilizado por 48 h a - 60 °C. Após liofilização foi obtido uma concentração de 10¹⁰ esporos/g de liofilizado. Os produtos e as doses utilizados no tratamento de sementes se apresentam na Tabela 1.

Tabela1: Produtos usados no tratamento de sementes de soja

Tratamentos
T1 Apenas inoculado com <i>S. sclerotiorum</i>
T2 Tiofanato metílico (350,00 g/L) + fluazinam (52,50 g/L) e inoculado com <i>S. sclerotiorum</i>
T3 Boscalida (200 g/L) + dimoxistrobina (200 g/L) e inoculado com <i>S. sclerotiorum</i>
T4 LABIM22 100 g de liofilizado/ 100 kg de semente e inoculado com <i>S. sclerotiorum</i>
T5 LABIM22 200 g de liofilizado/ 100 kg de semente e inoculado com <i>S. sclerotiorum</i>
T6 LABIM22 300 g de liofilizado/ 100 kg de semente e inoculado com <i>S. sclerotiorum</i>

As sementes foram desinfetadas com hipoclorito 1% por 1 minuto e depois lavadas 3 vezes com água estéril por 1 minuto e secas em fluxo laminar estéril por 20 minutos.

Após desinfetadas as sementes de soja foram infectadas com o patógeno através do contato direto com micélio de *S. sclerotiorum* por 24 horas. Após este período as sementes foram tratadas com produto em pó molhável, onde em um becker de 1 litro foram acondicionadas as sementes, o produto, o volume de calda na proporção de 1 L/ 100 kg de semente e homogeneizadas por 1 minuto. Após o tratamento as sementes foram acondicionadas em placas (150 mm) forradas com papel filtro estéril e umedecido com água estéril. Cada tratamento contou com 8 placas com 25 sementes cada, totalizando 200 sementes por tratamento. As placas foram umedecidas diariamente com água destilada estéril.

Como tratamento controle foram utilizados dois produtos comerciais: Certeza N da empresa IHARA® (52,50 g/L fluazinam + 350,00 g/L tiofanato metílico), produto específico para tratamento de sementes de soja para controle de *S.*

sclerotiorum; e Spot SC da empresa BASF® (200,00 g/L boscalida + 200,00 g/L dimoxistrobina).

As avaliações foram realizadas após sete dias da montagem do experimento. Foram avaliadas a incidência da doença (doentes, caso haja sinal do fungo e sadias caso não haja o sinal) e a porcentagem de germinação das sementes.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com 8 repetições. A unidade experimental foi uma placa de petri de 150 mm com 25 sementes. O experimento foi realizado uma vez.

Os dados de mortalidade foram submetidos à análise de variância, considerando o modelo linear generalizado com a distribuição binomial. Quando significativo, os tratamentos foram comparados utilizando o teste de comparação de médias de Tukey ($p < 0,5$).

3.4.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Com exceção ao item 3.4.13, o demais foram analisados através do software R studio, submetidos a análise de variância seguido por teste de Tukey.

3.5 Resultados e discussão

3.5.1 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DO ISOLADO LABIM22

A cepa LABIM22 apresenta 99% de semelhança com bactérias da espécie *Bacillus velezensis*.

Bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* sp. têm sido alvo de estudos por sintetizar vários compostos antimicrobianos com atividade contra doenças bacterianas e fúngicas, além de sua aplicabilidade no ramo farmacêutico. Seu uso é eficiente e de baixo risco ambiental e para a saúde humana, pois trata-se de um microrganismo comum na microbiota do solo. Sua capacidade de formar endósporos é de grande valor na elaboração de bioprodutos, pois tal estrutura é o que garante a permanência e ajuda na colonização do ambiente. Outra característica crucial que a torna alvo de estudos é sua capacidade de indução de resistência contra ataque de fitopatógenos e promoção de crescimento de plantas através da produção de

hormônios vegetais sideróforos e solubilização de fosfato (SHAFI & TIAN, 2017).

Ji et al. (2013) em estudos com uma cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* observaram sua capacidade de biocontrole frente a 12 fungos fitopatogênicos diferentes entre eles *S. sclerotiorum*, *B. cinerea* e *F. oxysporum*. O microrganismo em estudo produzia a iturina, composto antimicrobiano comumente sintetizado por bactérias pertencente a este gênero.

Em 2018, Baptista et al. publicaram o anúncio genômico de uma cepa de *Bacillus velezensis* LABIM40, a qual possui em seu genoma 33 *clusters* de genes que codificam moléculas bioativas contra fungos fitopatogênicos. Na prática seu efeitos antagonista foi observado ao utilizarem o sobrenadante livre de células frente a fungos de importância agrícola como: *S. sclerotiorum*, *B. cinerea*, *R. solani* e *M. phaseolina*; fato que evidenciou seu potencial biotecnológico, motivando estudos acerca do microrganismo estudado.

Tan et al. (2019) identificaram a cepa HZ-72 como sendo *Bacillus subtilis* baseado em sua morfologia, características bioquímicas e análise 16s rDNA, observaram em experimentos em casa de vegetação controle de 83,34% de *R. solani* na cultura do linho.

3.5.2 PREDIÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

A predição das possíveis BGCs feito através da web server antiSMASH 4.0 (WEBER et al., 2015) indicou a presença de 7 clusters que codificam biomoléculas antimicrobianas, dentre as quais fengicina, surfactina e bacilibactina possuem ação antifúngica e as demais, difcidina, macrolactina, bacilysina e bacilaene possuem atividade antibacteriana (Figura 1).

O gênero *Bacillus* é conhecido por sintetizar uma ampla gama das mais variadas classes de antimicrobianos com ação de controle contra doenças de plantas (SHAFI & TIAN, 2017). Cerca de 4 a 5% do genoma de *B. subtilis* é dedicado a síntese de metabólitos secundários, uma espécie próxima, *B. amyloliquefaciens* cepa FZB42 contém em torno de 8% de seu genoma dedicado a síntese de biomoléculas com interesse agrícola, como antimicrobianos peptídicos e lipopeptídicos, policetídeos e sideróforos (STEIN, 2005; RUCKERT et al., 2011).

Portanto é possível que haja outros clusters que codificam moléculas com outras funções de interesse agrícola no genoma da LABIM22.

Este gênero de bactéria, produz comumente três famílias de moléculas antifúngicas: fengicina, iturina e surfactina.

A fengicina é frequentemente identificada entre os metabólitos ativos quando se faz uso de *Bacillus* spp. para controle de doenças fúngicas. Trata-se de um lipodecapeptídeo cíclico com um ácido graxo – hidróxi com 16 a 19 átomos de carbono. Existem dois tipos de fengicinas, sendo dividido em fengicina A e B. Ambas atuam especificamente contra fungos filamentosos agindo através da inibição da fosfolipase A2 (NISHIKORI et al., 1986).

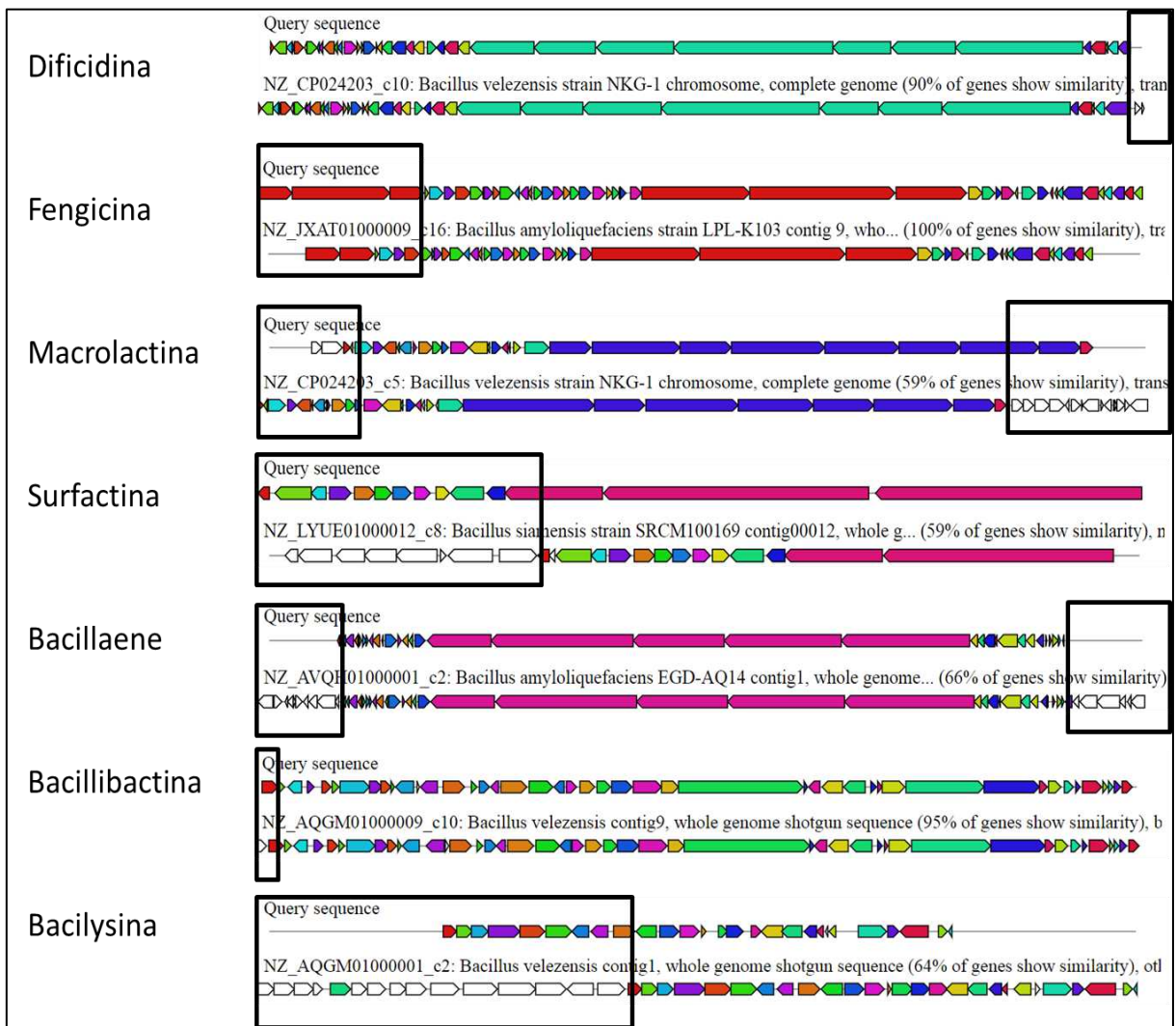


Figura 1 - Principais clusters de metabólitos secundários preditos pelo programa antiSMASH no genoma do isolado LABIM22 comparado com cepas de *Bacillus* spp. As áreas destacadas indicam as diferenças encontradas entre os clusters representados.

Surfactina é um poderoso biosurfactante natural, lipopeptídeos desta família interagem com as camadas lipídicas da membrana celular dos microrganismos, formando poros e solubilizando a camada, causando morte celular (ONGENA & JACQUES, 2008).

Representantes da família das iturinas não foram encontradas até o momento no genoma de LABIM22.

Bacilibactina é uma biomolécula siderófora de ferro, sua ação antifúngica acontece pela indisponibilização de íons de ferro. Karim et al. (2019) estudaram o genoma da cepa JRCGR – 1 (*Bacillus glycinifermentans*) e encontraram um cluster que codifica bacilibactina, assim como outros metabólitos secundários e concluíram que a cepa possui potencial de biocontrole contra doenças de solo.

3.5.3 ENSAIO DE ANTAGONISMO DIRETO POR CULTURA DUPLA

Bactérias do gênero *Bacillus* agem majoritariamente por antibiose, produzindo metabólitos secundários (EARL et al., 2008). Portanto a cepa antagonista precisa de tempo para sintetizar suas biomoléculas e expressar sua atividade antifúngica. Portanto, quanto mais lento o crescimento do patógeno, mais tempo há para biossíntese e difusão das moléculas no meio solidificado.

Sua capacidade de antibiose, síntese de hormônios vegetais, sideróforos, solubilização de fosfato e esporulação torna este gênero alvo constante de estudos (SHAFI & TIAN, 2017). A cultura dupla é uma metodologia amplamente utilizada para comprovar o potencial biotecnológico de uma cepa, sendo usado para *screening* de banco de microrganismos por ser rápido e confiável.

A Figura 2 mostra os resultados do teste de antagonismo direto, onde é possível notar que o isolado possui potencial antagônico frente a todos os fitopatógenos testados.

No ensaio de cultura dupla a menor porcentagem de inibição foi para *S. sclerotiorum* com 59%, seguido por *R. solani* com 64%. Já *M. phaseolina* e *B. cinerea* obtiveram a mesma porcentagem, 66% com diferença significativa entre os fitopatógenos. Nos estudos com a produção de metabólitos em cultivo líquido, observou se que *S. sclerotiorum* foi a mais suscetível, obtendo a maior porcentagem de inibição (dados apresentados no item 3.5.4). Esta diferença possivelmente se deve

ao tempo de crescimento de cada fungo, sendo *S. sclerotiorum* o mais rápido entre os patógenos utilizados, tomando a placa de petri de 90 mm de diâmetro em 4 dias, enquanto os demais demoraram 7 dias.

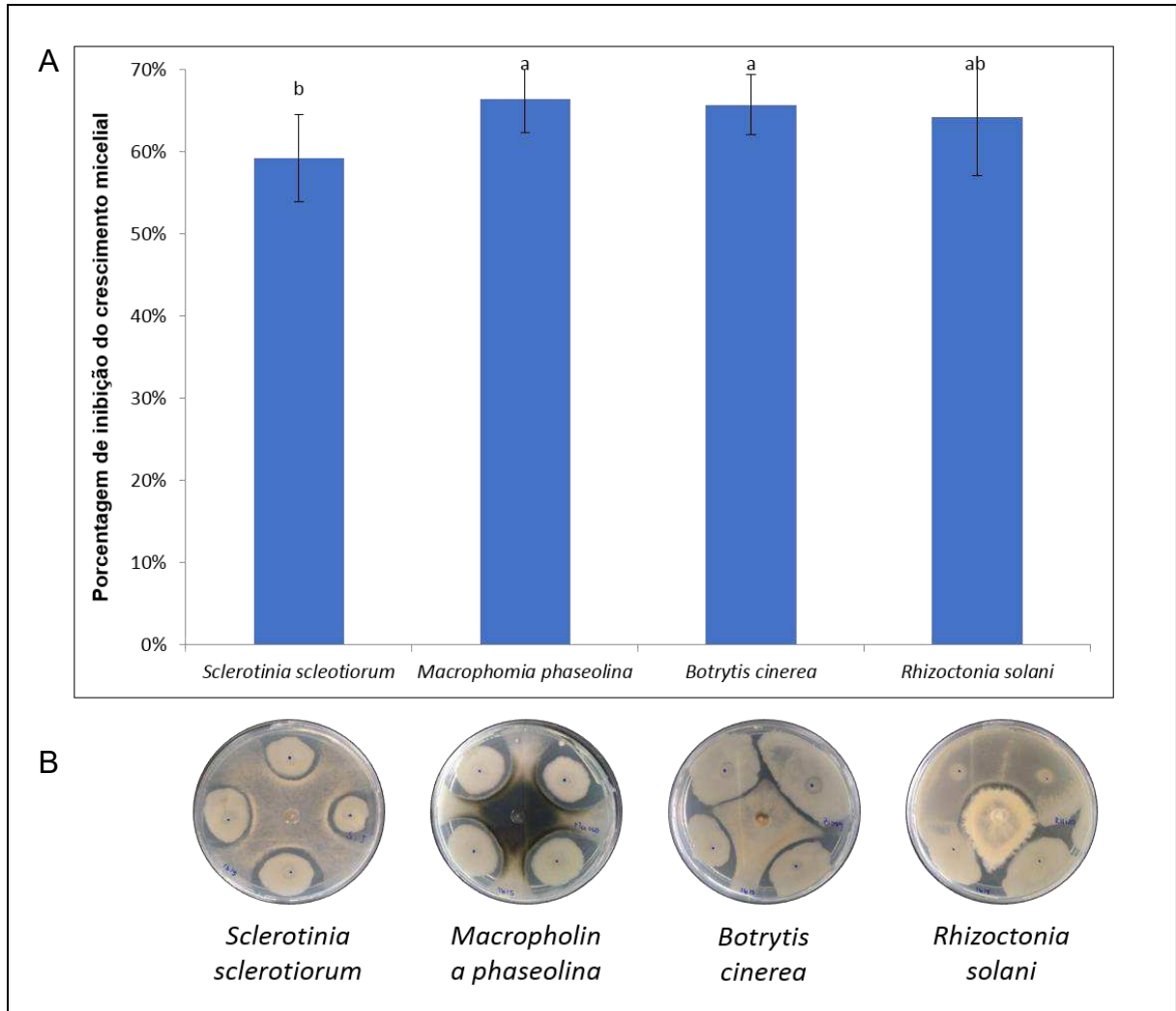


Figura 2 - Ensaio de antagonismo direto da cepa LABIM22 de *Bacillus* sp. contra fungos fitopatogênicos (*Sclerotinia sclerotiorum*, *Macrophomina phaseolina*, *Botrytis cinerea* e *Rhizoctonia solani*). A – Porcentagem de inibição por antagonismo direto entre a cepa LABIM22 e fitopatogênicos. As barras azuis representam porcentagem de inibição do crescimento micelial do fitopatogênio. As barras de erro representam o desvio padrão com base em 4 repetições por experimento. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey. B – Imagem da placa de petri contendo o experimento de antagonismo direto entre a cepa LABIM22 e fungo fitopatogênicos.

3.5.4 TESTE DE SOBRENADANTE LIVRE DE CÉLULAS

Os resultados para a atividade do sobrenadante livre de células obtidos pela fermentação em 3 meios diferentes contra os quatro fungos fitopatogênicos estão apresentados na figura 3 e 4.

Quando LABIM22 foi cultivada no Meio Formulado (MF) houve uma maior porcentagem de inibição frente a todos os patógenos confrontados, com diferença significativa para os outros meios de cultivo utilizados, indicando que o MF foi o mais eficiente para estimular a biossíntese de compostos antifúngicos. Este foi, portanto, o meio utilizado como padrão para os próximos ensaios. O fungo *Sclerotinia sclerotiorum* mostrou-se o mais suscetível e *R. solani* o mais resistente.

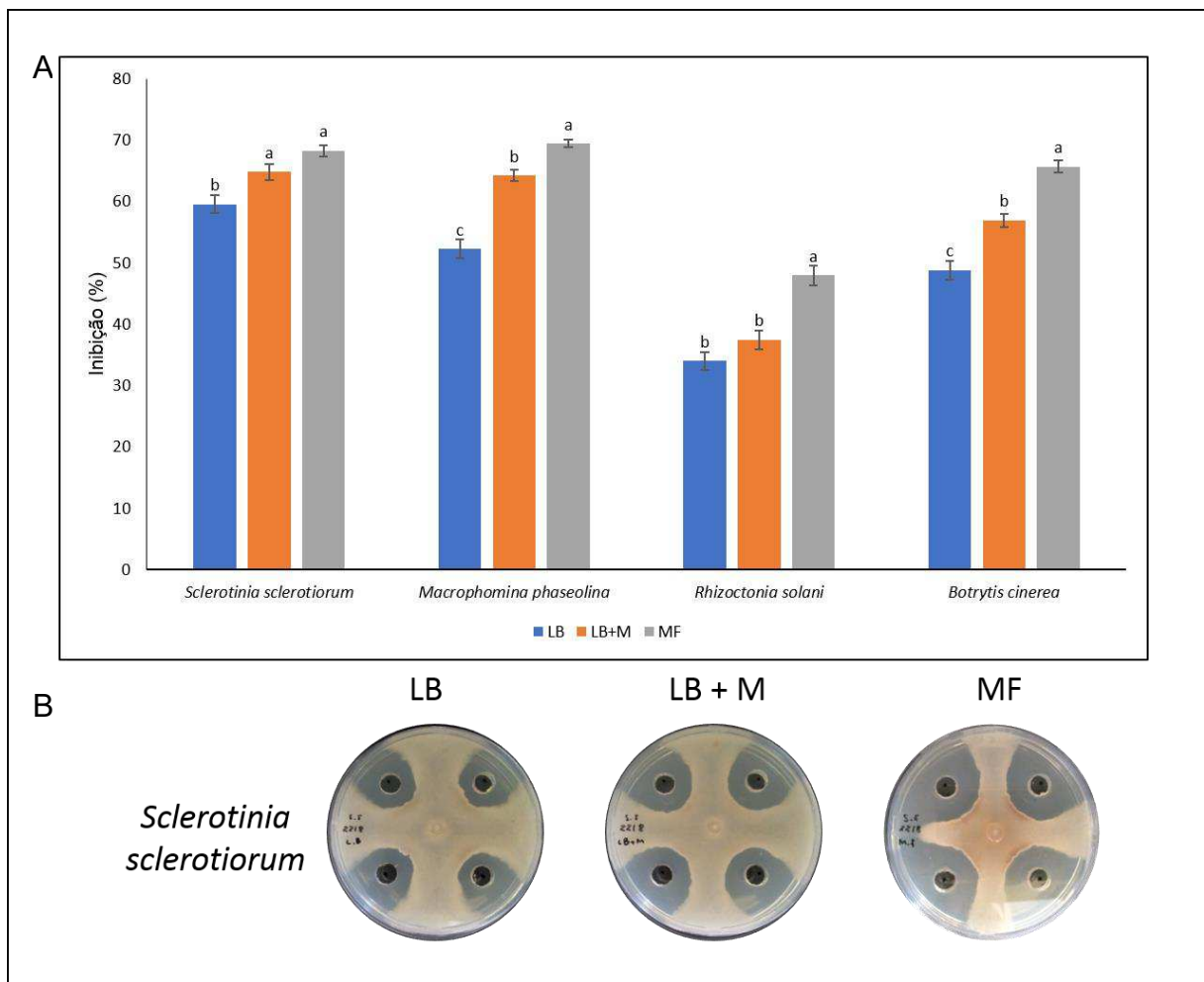


Figura 3 – A - Porcentagem de inibição de *Sclerotinia sclerotiorum*, *Macrophomina phaseolina*, *Botrytis cinerea* e *Rhizoctonia solani* pelo sobredanadante da cepa LABIM 22 de *Bacillus* sp. cultivada em três diferentes meios (LB – Lúria Bertani; LB+M – Lúria Bertania com micronutrientes; MF – Meio formulado). Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey. As barras de erro representam o desvio padrão com base em 8 repetições por experimento. O experimento foi repetido 3 vezes. B - Teste de difusão em ágar com *S. sclerotiorum* vs. metabólitos de LABIM22 sintetizados nos três meios de cultivo.

A composição do meio otimizado para síntese de metabólitos secundários é um ponto importante a ser levado em conta quando a fermentação é

voltada para produção de antifúngicos. Contudo, o estudo de diferentes meios de cultura não é um assunto encontrado em abundância na literatura.

Medeot et al. (2017), objetivaram em seu estudo variar fontes de carbono e nitrogênio afim de observar se haveria maior eficiência na produção de antifúngicos e observaram que há uma relação direta entre a fonte utilizada e a quantidade de biomassa e metabólitos obtidos, sendo a sucrose a melhor fonte testada.

Kilani – Feki et al. (2016), estudaram 13 meios de cultura diferentes para otimizar a produção de antifúngicos produzidos pela cepa V26 de *B. subtilis*, encontrando os melhores resultados ao adicionar farinha de soja como fonte de nitrogênio e extrato de batata como fonte de carbono. No estudo foi relatado que é possível utilizar fontes eficientes, de baixo custo e ainda assim obter um bom resultado, sendo de crucial importância para um bioproduto comercial. Contudo, essas fontes devem estar em quantidades ideais, segundo os autores, 30 g/L de farinha de soja e 200 g/L de extrato de batata. Ainda neste mesmo estudo é mencionada a importância da boa oxigenação no processo fermentativo, possuindo uma relação direta com a eficiência metabólica das biomoléculas. Composição do meio de cultura alinhado a uma boa aeração significou uma melhora de 90% na produção de antifúngico no trabalho mencionado. Em relação a aeração os autores utilizaram frascos Erlenmeyer com capacidade de 250 mL, contendo 50 mL de meio de cultivo e 150 rpm de agitação; no estudo envolvendo a cepa LABIM22 foi utilizado frasco Erlenmeyer com capacidade de 1 L, contendo 400 mL de meio de cultivo e 200 rpm de agitação, ou seja, em ambosos estudos o meio de cultura ocupou 1/3 do volume do frasco utilizado.

O meio formulado conta com fontes de nitrogênio, carbono e micronutrientes, este último atuando como fonte de cofatores enzimáticos. Os meios LB e LB+M não contam com a mesma quantidade e qualidade das fontes de carbono e nitrogênio presentes no meio formulado. Embora o meio LB+M possua micronutrientes adicionais, não foram observados resultados semelhantes ao MF, o que indica que, neste experimento, o suplemento das fontes de carbono e nitrogênio foram de grande valor para aumentar a quantidade de antifúngicos produzidos por LABIM22, dados que corroboram os do estudo de Kilani – Feki et al. (2016) citado acima.

3.5.5 TESTE DE ESTABILIDADE DOS METABÓLITOS

As figuras 4, 5 e 6 mostram os resultados das análises de estabilidade revelando que os metabólitos produzidos pela cepa antagonista são estáveis às temperaturas (25, 70, 100 e 121° C), luz (branca, 254 nm e 365 nm) e pH (entre 3 e 11), respectivamente não havendo diminuição do efeito inibitório do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* (análise de variância não significativo $p < 0.05$).

Conhecer a temperatura na qual os metabólitos do antagonista estudado são ativos é importante na elaboração de um bioproduto, tendo em vista que em muitos casos o armazenamento e o transporte serão em condições de altas temperaturas. Após aplicação as biomoléculas serão expostas a altas temperaturas e a longos períodos de exposição à luz UV.

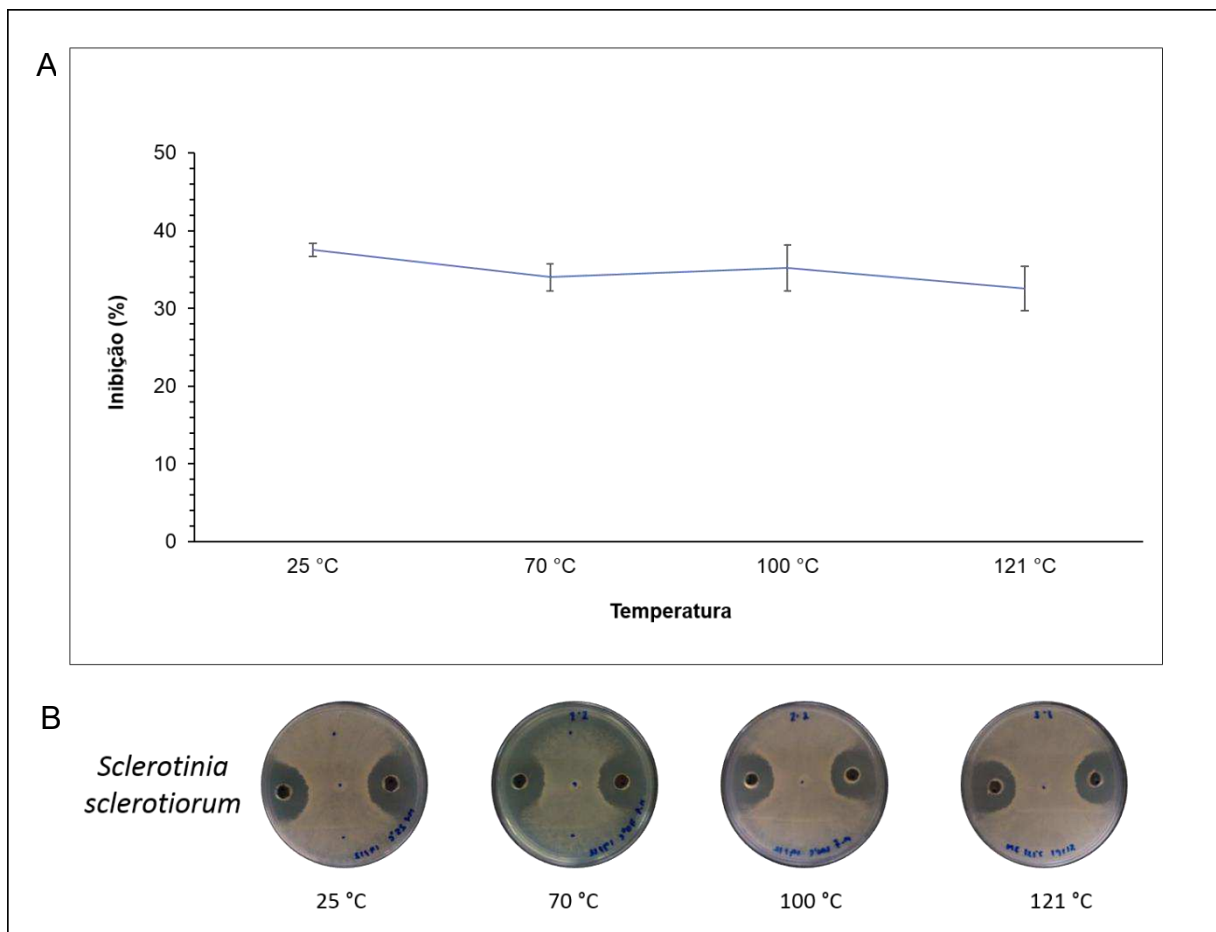


Figura 4 - Testes de estabilidade térmica (25 °C; 70 °C; 100 °C; 121 °C) dos metabólitos produzidos pela cepa LABIM22 em meio formulado A - Porcentagem de inibição do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* em teste de difusão pelo SLC de LABIM22 submetido a diferentes temperaturas. As barras de erro representam o desvio padrão com base em 8 repetições. B - Teste de difusão em ágar com *S. sclerotiorum* contra metabólitos de LABIM22 submetidos a diferentes temperaturas.

A estabilidade frente a um ciclo de autoclavagem (normalmente a 121 °C e 1 atm por 15 minutos) é importante não apenas por conta de suportar uma situação extrema, mas por ser este o método de esterilização utilizado no processo do desenvolvimento do produto.

O pH do solo varia do básico ao ácido de acordo com cada tipo de solo e região. Para formulação normalmente o pH é ácido afim de evitar a germinação dos esporos da bactéria antagonista.

Os endósporos, por serem estruturas de resistência permanecem viáveis em condições adversas. Se os seus metabólitos são também estáveis nessas condições, isso facilitará que o esporo enfrente menos concorrência na colonização dos tecidos da planta.

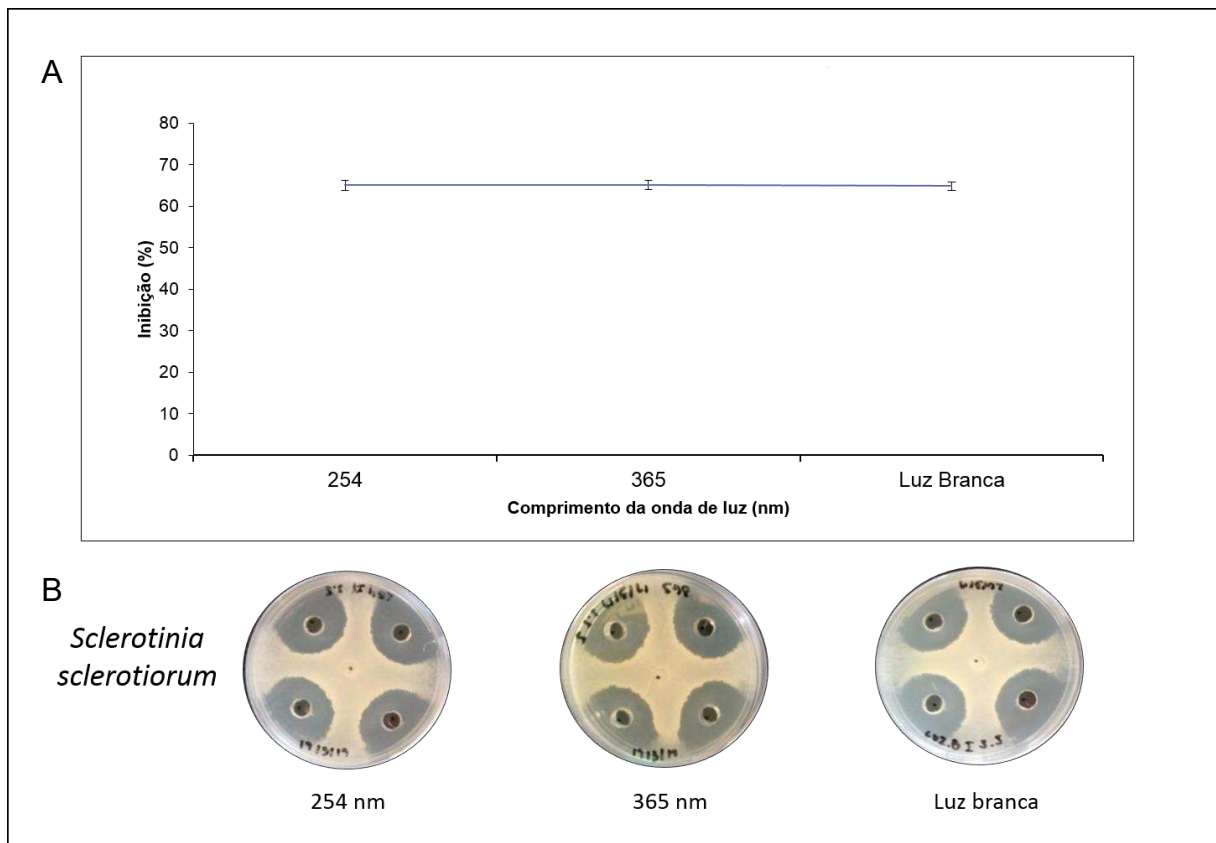


Figura 5 – Testes de estabilidade a diferentes comprimentos de ondas de luz (Luz branca; 254 nm; 365 nm) dos metabólitos produzidos pela cepa LABIM22 em meio formulado. A - Porcentagem de inibição do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* em teste de difusão pelo SLC de LABIM22 submetido a diferentes comprimentos de ondas de luz. As barras de erro representam o desvio padrão com base em 8 repetições. B - Teste de difusão em ágar com *S. sclerotiorum* contra metabólitos de LABIM22 submetidos a diferentes comprimentos de ondas de luz.

Casos de moléculas resistentes a condições adversas têm sido relatados por vários pesquisadores. Ji et al. (2013) estudaram o potencial biotecnológico da cepa de *B. amyloliquefaciens* CNU114001 contra 8 fungos fitopatogênicos, dentre os quais, *B. cinerea* e *S. sclerotiorum*. Após verificarem seu

bom desempenho como agente antagonista, fizeram a avaliação de estabilidade a temperatura variando de -25 a 100 °C e luz UV de 254 nm e 365 nm e verificaram que seus metabólitos foram estáveis a estas condições. Parte dos metabólitos identificados por este grupo de cientistas coincidem com os metabólitos encontrados na predição de clusters de antifúngicos presentes no genoma da LABIM22 (item 3.5.2), sendo estes: fengicina e surfactina.

Nawaz et al. (2018) obtiveram resultados semelhantes ao do presente estudo utilizando a cepa de *Bacillus licheniformis* OE-04. Seus metabólitos foram estáveis a temperatura de 25 a 100 °C e variações de pH entre 5 e 9.

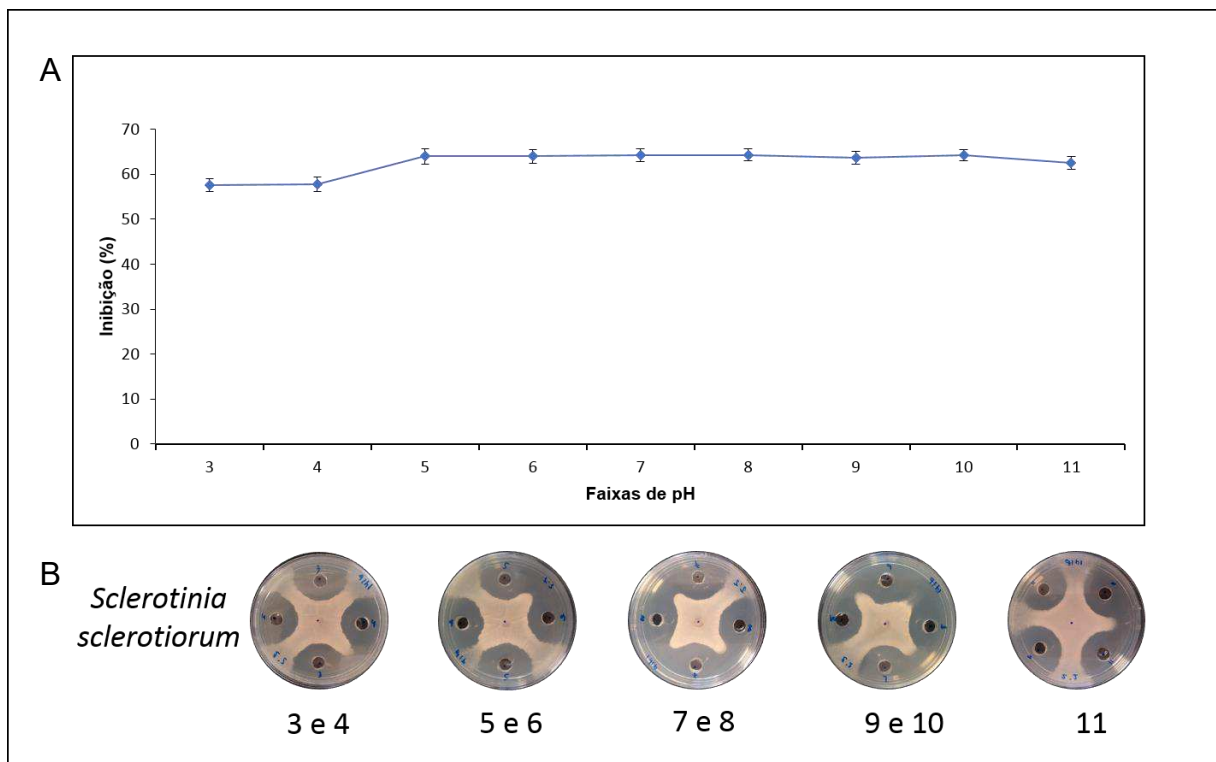


Figura 6 – Testes de estabilidade a diferentes pH (3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 11) dos metabólitos produzidos pela cepa LABIM22 em meio formulado. A - Porcentagem de inibição do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* em teste de difusão pelo SLC de LABIM22 submetido a diferentes faixas de pH. As barras de erro representam o desvio padrão com base em 8 repetições. B - Teste de difusão em ágar com *S. sclerotiorum* contra metabólitos de LABIM22 submetidos a diferentes faixas pH.

3.5.6 PRODUÇÃO DE ÁCIDO INDOL ACÉTICO (AIA)

A cepa estudada produziu baixa quantidade de AIA, apenas 2,11 µg/mL. Esse valor é baixo em relação ao encontrado no estudo de Bhutani et al. (2018) no qual isolaram 33 bactérias endofíticas de plantas de feijão moyashi (*Vigna radiata*) e verificaram que todas produziam AIA em níveis que variaram de 8,3 a 92,03 µg/mL.

Dentre os 33 isolados os melhores foram cepas de *Bacillus aryabhatai*, *B. megaterium* e *B. cereus*, demonstrando que o gênero *Bacillus* é bom produtor de ácido indol acético, hormônio essencial ao desenvolvimento fisiológico da planta.

Em alguns casos bactérias podem produzir AIA como uma forma de tolerância a metais pesados como o cromo (Cr) (SAGAR et al., 2012), como demonstrado por Shim et al. (2015) que isolaram uma cepa de *Bacillus* sp. (JH 2-2) da rizosfera de uma planta contaminada por metais pesados, a qual reduz o Cr (VI) a Cr(III), secretando AIA e conseqüentemente promovendo o crescimento da planta. A síntese de AIA está intimamente ligada à presença do Cr.

3.5.7 TESTE DE SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO

Não houve formação de halo em torno da colônia de LABIM22, indicando que, em meio de cultura GL, a cepa em estudo não foi capaz de solubilizar fosfato inorgânico (CaHPO_4). Para um resultado mais conclusivo é necessário avaliar se a cepa em estudo é capaz de solubilizar fosfato com outros meios de cultivo sólidos.

3.5.8 ATIVIDADE HEMOLÍTICA EM ÁGAR SANGUE

A Figura 8 mostra que houve atividade hemolítica em ágar sangue por parte do SLC da LABIM22. O aparecimento de um halo translúcido em torno do poço com um diâmetro médio de 20 mm revela que houve produção de biosurfactante.



Figura 7 - Atividade hemolítica em meio ágar sangue com 200 μL de SLC da cepa LABIM22 aplicado em cada poço.

Vários autores relatam a presença de moléculas da família da surfactina em seus estudos com *Bacillus* sp.: Ji et al. (2013); Chen et al. (2009) com *B. amyloliquefaciens*; He et al. (2019) com *B. subtilis* e Karim et al. (2019) com *B. glycinifermentans*.

A surfactina é um lipopeptídeo cíclico com sete a dez aminoácidos, ácidos graxos e cadeia de hidrocarbonetos, o que possibilita variadas formas isoméricas. O mecanismo de ação das surfactinas se dá pela característica anfifílica e sua capacidade de interação com a membrana celular dos fitopatógenos. Esta interação é devido ao seu poder biosurfactante, causando a formação de poros e a completa degradação da membrana celular do microrganismo alvo, causando sua morte (ONGENA e JACQUES, 2008).

A atividade desta família de biomoléculas não se limita ao seu poder antifúngico, mas também auxilia a bactéria em funções de mobilidade como *swarming* e formação de biofilme. Cepas que não produzem surfactina não costumam formar biofilme e não possuem mobilidade (FIRA et al., 2018).

Além da ação direta nas células de fitopatógenos, a mobilidade através de *swarming* juntamente com a formação de biofilme possibilitam uma colonização mais eficiente, o que reflete diretamente no sucesso do biocontrole de doenças e na promoção de crescimento de plantas. A produção de surfactina por parte da cepa de *Bacillus* LABIM22 evidencia ainda mais seu potencial biotecnológico.

3.5.9 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

No ensaio de concentração inibitória mínima foi encontrada o ponto de inibição de 100% do crescimento micéliogênico em 500 µg/mL do liofilizado, com atividade inibitória decrescendo gradualmente a partir da concentração de 250 µg/mL com 82,72% de inibição e 47,93% para 125 µg/mL. Já as doses de 62,5 µg/mL e 31,25 µg/mL demonstraram atividade parcial, uma vez que as hifas de *S. sclerotiorum* ficaram pouco densas em relação a placa controle.

Com a confirmação da estabilidade a altas temperaturas e a um ciclo de autoclavagem completo (121 °C, 1 atm, 15 min), foi possível utilizar este método de esterilização, o que facilitou a metodologia a ser utilizada.

As concentrações de completa inibição (100%) com 500 µg/mL e a mais próxima a 50% de controle, 250 µg/ml, foram satisfatória e corroboram com resultados já publicados por Ji et al. (2013) onde avaliaram a concentração inibitória mínima também contra *S. sclerotiorum* e encontraram um valor de 100% de inibição nas faixas de 500 a 100 µg/ml utilizando extrato bruto de *Bacillus amyloliquefaciens*.

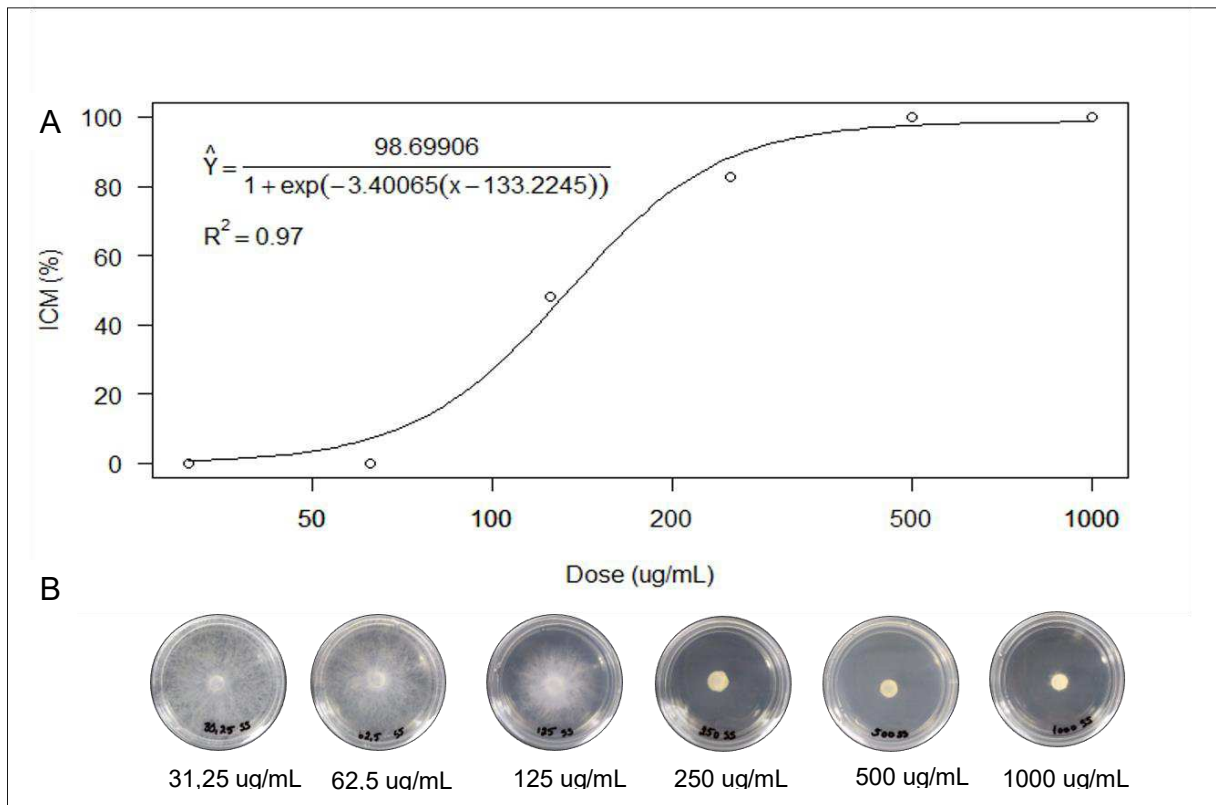


Figura 8 – Concentração inibitória mínima dos metabólitos de LABIM22 contra *S. sclerotiorum*. A - Índice de crescimento micelial em porcentagem (ICM) em função das doses utilizadas (31,25 ug/ml, 62,5 ug/ml, 125 ug/ml, 250 ug/ml, 500 ug/ml e 1000 ug/ml). Os círculos na curva representam a dose utilizada. B – Crescimento micelial de *S. sclerotiorum* frente aos metabólitos da LABIM22.

3.5.10 GERMINAÇÃO DE ESCLERÓDIO

Na figura 9 se apresentam os dados de taxa de germinação de escleródios (Nº em unidades), estipes (Nº em unidades) e apotécios (Nº em unidades) de *S. sclerotiorum* produzidos com aplicação de metabólitos de LABIM22 em 3 concentrações diferentes. A germinação foi igual para os escleródios tratados com os metabólitos de LABIM22 e o controle com água, havendo efeito deletério apenas no tratamento com fungicida químico. Já para o número de estipes a maior dose de metabólitos (2 mg/ml) não diferiu do tratamento químico, porém, não teve diferença com o controle água. Considerando o número de apotécios formados, as

concentrações de metabólitos a 1 e 2 mg/mL tiveram uma média significativamente igual ao fungicida químico e menor ao controle com água.

Impedir a germinação do escleródio é uma forma eficiente de assegurar a sanidade da lavoura, uma vez que os escleródios ficam viáveis no solo por longos períodos e germinam em condições ambientais ideais. Após germinarem emitem as estipes as quais dão origem aos apotécios onde se produzem os ascósporos, que são os esporos sexuais que infectam a planta e causam a doença (CAMPOS et al., 2010, MEYER, 2013).

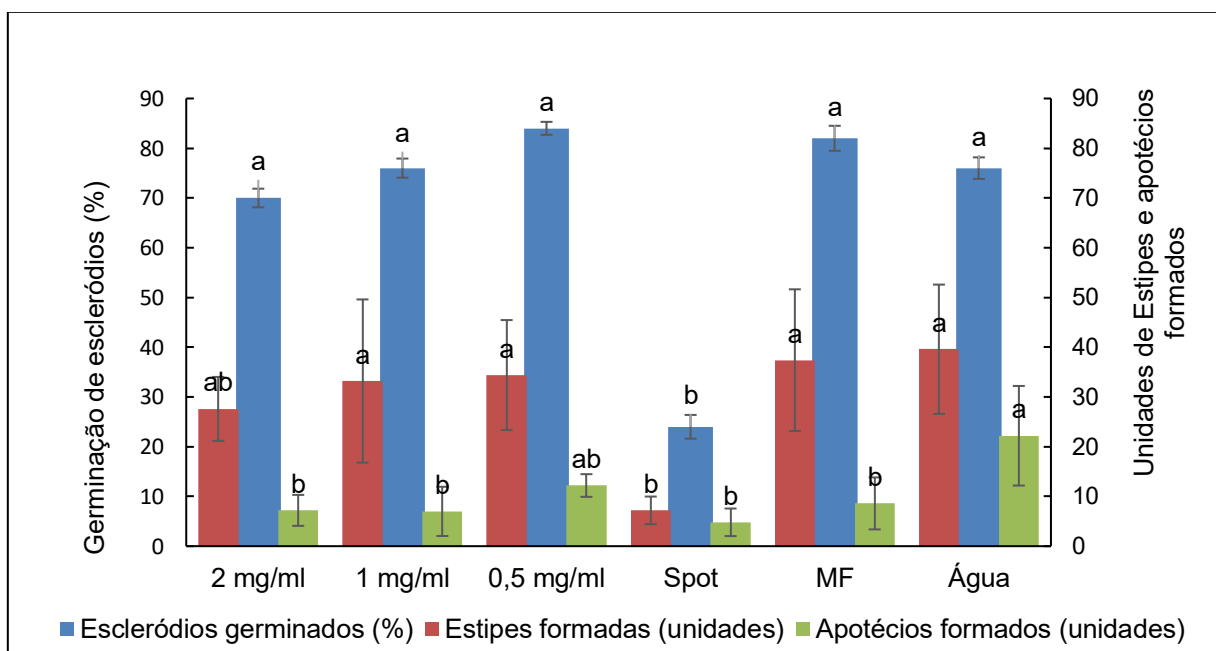


Figura 9 – Taxa de germinação de escleródios (%), estipes (unidades de estipes formadas) e apotécios (unidades de apotécios formados) de *Sclerotinia sclerotiorum* em teste de escleródios tratados com metabólitos de LABIM22 em 3 concentrações (2 mg/mL; 1 mg/mL; 0,5 mg/mL) fungicida químico (Spot - 200,00 g/L boscalida + 200,00 g/L dimoxistrobina); meio formulado (MF) e água. As barras de erro representam o desvio padrão com base em 5 repetições por tratamento e 20 escleródios por repetição. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey.

Qualquer etapa interrompida impedirá o progresso da doença, portanto, embora os metabólitos de LABIM22 não tenham inibido a germinação carpogênica, houve a redução de 22,2 apotécios no controle com água para 7,2 apotécios na concentração de LABIM22 a 2mg/mL, o que diminuirá a quantidade de ascósporos liberados no ar e por tanto a quantidade de inóculo na lavoura.

3.5.11 TRATAMENTO DE SEMENTES DE SOJA COM CÉLULAS E METABÓLITOS DE LABIM22

Não houve diferença significativa na germinação de sementes de soja inoculadas com *S. sclerotiorum* e tratadas com metabólitos de LABIM22 e fungicidas químicos, mas sim com germinação de semente somente inoculada com o fungo. Na média o tratamento com LABIM22 e os fungicidas químicos tiveram uma germinação de 95,5% para tiofanato metílico + fluazinam; 94% para boscalida + dimoxistrobina; 91,5% para LABIM22 100g/100kg; 94,5% para LABIM22 200g/100kg e 93,5% para LABIM22 300g/100kg em comparação com uma média de 39,5% sementes germinadas no tratamento controle, o que representa um aumento de mais de 50% para todos os tratamentos (Figura 11). Os resultados indicam também que não há efeito fitotóxico do pó molhável a base de LABIM22 na germinação das sementes de soja.

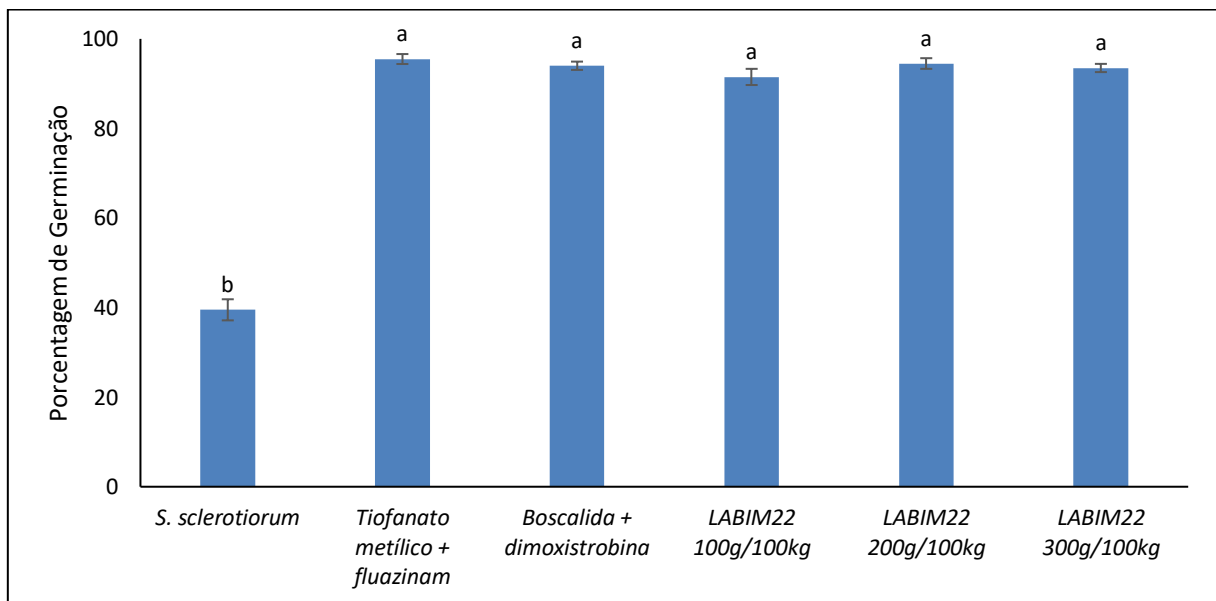


Figura 10 – Germinação de sementes de soja inoculadas previamente com *Sclerotinia sclerotiorum* e tratadas com pó molhável a base de LABIM22 nas concentrações de 100g/100kg, 200g/100kg e 300g/100kg e fungicidas químicos (tiofanato metílico+fluazinam e boscalida+dimoxistrobina). As barras de erro representam o desvio padrão com base em 8 repetições por tratamento. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A porcentagem de sementes saudias no controle somente inoculado com *S. sclerotiorum* foi de 2,5%, enquanto na concentrações de 200 e 300 g/100 kg de LABIM22 foi de 93% e 94% de sementes saudias respectivamente, não havendo diferença significativa quando comparado aos produtos químicos utilizados (Figura 12).

Há poucos estudos na literatura sobre tratamento de sementes com *Bacillus* spp. ou outros gêneros de bactérias para biocontrole de *S. sclerotiorum*.

Uma das formas de transmissão da doença para novas áreas pode ser o trânsito de maquinários que carregam os propágulos do patógeno, escleródios em lotes de semente bem como micélio no interior da semente (HENNING et al., 2014). Esta última forma de transmissão é de difícil indentificação e controle, portanto, o tratamento de sementes que assegura a sanidade da semente tem muita importância epidemiológica.

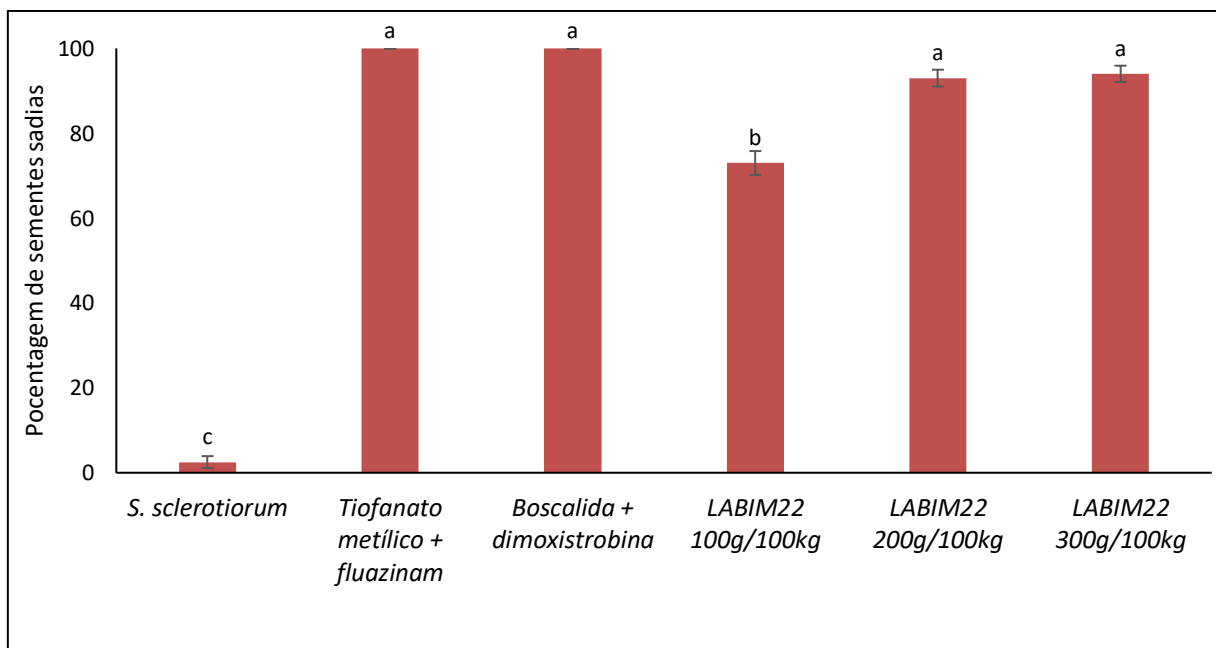


Figura 11 – Porcentagem de sementes de soja saudias em teste de germinação de sementes inoculadas previamente com *Sclerotinia sclerotiorum* e tratadas com pó molhável a base de LABIM22 LABIM22 nas concentrações de 100g/100kg, 200g/100kg e 300g/100kg e fungicidas químicos (tiofanato metílico+fluazinam e boscalida+dimoxistrobina). As barras de erro representam o desvio padrão com base em 8 repetições por tratamento. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Hu et al. (2019) em seu trabalho com o *B. subtilis* cepa BY-2 também obteveram resultados positivos no tratamento de sementes de colza com $2,5 \cdot 10^8$ UFC/semente. As sementes foram semeadas a campo em quatro regiões distintas, e verificaram menores índices de podridão de sclerotinia quando comparado ao controle

não tratado. Para fermentar a cepa antagonista, os autores utilizaram o meio LB, meio ideal para crescimento de biomassa, porém ao estimular o crescimento populacional do microrganismo, a síntese de moléculas antifúngicas acaba sendo prejudicada, havendo baixa presença destas para o controle da doença (KILANI – FEKI et al., 2016).

O sucesso do controle obtido no tratamento de sementes é decorrente de uma combinação de metabólitos antifúngicos, os quais irão diminuir a competição da cepa antagonista com fitopatógenos para que a mesma tenha tempo o suficiente para colonizar e metabolizar mais biomoléculas benéficas para a planta. No genoma da LABIM22 estão presentes os clusters de fengicina, bacilibactina e surfactina, e, possivelmente, o efeito antagônico obtido no presente trabalho está ligado à presença destes compostos. A colonização provavelmente está sendo auxiliada por moléculas da família das surfactinas, as quais segundo Fira et al. (2018) auxiliam na mobilidade e formação de biofilme, características essenciais para uma boa colonização, além de possuir propriedade antagonistas através da interação com a membrana celular dos fitopatógenos.



Figura 12 – Teste de germinação de sementes de soja infectadas com *Sclerotinia sclerotiorum* e tratadas com formulações a base de LABIM22 (100g/ 100kg; 200g/ 100 kg e 300g/ 100kg de sementes de soja) e fungicidas químicos tiofanato metílico + fluazinam e boscalida + dimoxistrobina.

O resultado obtido neste experimento corrobora a predição de metabólitos secundários (item 3.4.3) contendo moléculas com conhecido efeito antimicrobiano que auxilia no antagonismo e na colonização eficiente da cepa LABIM22.

3.6 Conclusão

O sequenciamento da cepa LABIM22 revelou que a mesma pertence à espécie *Bacillus velezensis*. A atividade antifúngica frente aos fungos fitopatogênicos *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cinerea*, *Macrophomina phaseolina* e *Rhizoctonia solani* foi mais eficiente quando LABIM22 foi cultivada em meio MF. O tratamento de sementes de soja, previamente infectadas com *S. sclerotiorum*, com pó molhável a base de LABIM22 mostrou controle eficiente do mofo branco, comparável àquele obtido com os fungicidas químicos utilizados como controle (tiofanato metílico+fluazinam e boscalida+dimoxistrobina). A atividade antagonista *in vitro* e o sucesso de biocontrole do mofo branco *in vivo* sugere uma ação antagonista ligada às moléculas de fengicina, surfactina e bacilibactina produzidas pela cepa LABIM22. Essas moléculas bioativas foram previstas a partir da identificação dos *biosynthetic gene clusters* após o sequenciamento do genoma da cepa LABIM22 de *B. velezensis*.

4 Artigo B

ANTAGONISMO *IN VITRO* DA CEPA DE *Bacillus velezensis* LABIM22 FRENTE A *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* E *Fusarium solani*.

4.1 Resumo

Os fungos *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, causador da murcha de fusarium e *Fusarium solani*, agente causal da podridão radicular seca causam danos expressivos na cultura do feijão. Uma alternativa eficiente e de baixa agressividade ao meio ambiente e á saúde humana é o uso do controle biológico usando fungos e bactérias antagonistas. O objetivo deste trabalho foi investigar o potencial antagonista contra *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* e *F. solani* da cepa de *Bacillus velezensis* LABIM22. O antagonismo *in vitro* foi investigado pelo teste de cultura dupla no qual LABIM22 apresentou 72% e 75% de inibição de crescimento micelial de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* e *F. solani* 145, respectivamente. Para determinar o melhor meio de cultivo para otimização da produção de metabólitos secundários, foram testados o meio Luria Bertani (LB); LB+ micronutrientes (LB+M) e o meio formulado (MF - formulação em pedido de patente). O MF apresentou inibição superior quando comparado com os demais meios, portanto foi utilizado como meio padrão para cultivo. No experimento de estabilidade térmica e pH, observou-se que os metabólitos de LABIM22 foram estáveis. Já para variação de comprimentos de ondas de luz houve um incremento de 5% de inibição no comprimeto de onda de 365 nm. A concentração inibitória mínima revelou que uma concentração de 1000 ug/mL foi capaz de inibir 51% do crescimento micelial de *F. oxysporum*. Este conjunto de dados evidenciam o potencial biotecnológico da cepa LABIM22 como agente de controle biológico contra *F.oxysporum* f. sp. *phaseoli* e *F. solani*.

Palavras chave: Antagonismo, controle biológico, feijão.

4.2 Abstract

Fusarium oxysporum f. sp. *phaseoli*, which causes fusarium wilt and *Fusarium solani*, the causal agent of dry root rot, causes significant damage to the bean crop. An efficient and low-aggressive alternative to the environment and human health is the use of biological control using fungi and antagonistic bacteria. The aim of this work was to investigate the potential antagonist against *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* and *F. solani* from the *Bacillus velezensis* LABIM22 strain. *in vitro* antagonism was investigated by the double culture test in which LABIM22 showed 72% and 75% mycelial growth inhibition of *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* and *F. solani* 145, respectively. To determine the best culture medium to optimize the production of secondary metabolites, the Luria Bertani (LB) medium was tested; LB + micronutrients (LB + M) and the formulated medium (MF - formulation in patent application). The MF showed superior inhibition when compared to the other media, so it was used as a standard medium for cultivation. For the thermal stability and pH experiment, where it was observed that the metabolites of LABIM22 were stable, with no significant difference by the Tukey test. As for the variation in light wavelengths, there was an increase of 5% in the 365 nm range. The minimum inhibitory concentration revealed that a concentration of 1000 µg/mL was able to inhibit 51% of the mycelial growth of *F. oxysporum*. This data set shows the biotechnological potential of the strain LABIM22 as a biological control agent against *F.oxysporum* f. sp. *phaseoli* and *F. solani*.

Keywords: Antagonism, Common bean, *Fusarium* spp.

4.3 Introdução

O feijão é um alimento básico na dieta do brasileiro, sendo para muitos a principal fonte de proteínas com um consumo médio de 3,05 milhões de toneladas no país. Seu ciclo curto possibilita o cultivo em basicamente 3 épocas: de setembro a novembro (feijão das águas), janeiro a março (safra da seca) e maio a julho (safra de inverno ou terceira época). Para a primeira safra de 2020 é estimada uma área de 904,7 mil hectares, plantio reduzido em comparação com a última safra, explicado pela competição de preços com soja e milho, além de coincidir com épocas chuvosas na colheita, o que acarreta em uma menor qualidade do produto. Já para a segunda safra a área estimada é de 1.4 milhões de hectares e 597,8 mil hectares para a terceira safra (CONAB, 2020).

Com uma produção que se estende de norte a sul do país e nas mais diferentes épocas do ano, um dos entraves na produtividade da cultura é o aparecimento de doenças. Dentre os patógenos que causam prejuízos econômicos, os fungos que habitam o solo se destacam não apenas pelos danos, mas também pela dificuldade de implementação de tratamentos químicos e culturais, sendo de grande importância a adoção de diferentes formas de controle.

Fungos do gênero *Fusarium* estão entre os fitopatógenos habitantes do solo de importância econômica, como *Fusarium solani*, agente causal da podridão radicular seca. O patógeno é favorecido em condições de solo compactado, baixas temperaturas e alta umidade. Os sintomas se iniciam na raiz e no hipocótilo de plântulas ou plantas jovens em forma de estrias verticais com coloração avermelhada. A doença evolui com o aparecimento de lesões irregulares, avermelhadas, que quando coalescem se tornam marrons, atingindo a superfície do solo. O patógeno destrói o sistema radicular, podendo acometer toda raiz, impedindo a absorção de água e conseqüentemente as demais atividades fisiológicas. O tratamento de sementes pode impedir o avanço da doença para novas áreas ou proteger as plântulas após a germinação. O uso de cultivares com maior volume de raiz, semeadura mais rasa, menor número de plantas no stand e solo bem drenado são medidas de controle. (WENDLAND et al., 2016; WENDLAND et al., 2018).

O fitopatógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, causador da murcha de fusarium em plantas de feijão é mais expressiva economicamente no plantio da seca. O patógeno infecta o hospedeiro pela raiz e coloniza o tecido em

direção ao xilema. Os principais sintomas da doença são: folhas cloróticas que secam e senescem com o tempo, murcha generalizada principalmente na época de enchimento de vagens. Em plantas mais jovens o crescimento fica reduzido e em casos de colonização severa a planta morre. Em condições de alta umidade há o aparecimento de micélio rosado no caule da planta, o que indica a produção de conídios pelo fitopatógeno. A severidade da doença aumenta em presença de nematoides como *Meloidogyne* spp. e *Pratylenchus* spp., os quais causam ferimentos na raiz, facilitando a infecção pelo *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*. Como medida preventiva de controle, o uso de sementes sadias ou tratamento químico das mesmas, semeadura rasa, plantio em épocas de altas temperatura e solo profundo são importantes para assegurar a sanidade da lavoura. Outras medidas possíveis é o uso de variedades resistentes, rotação de cultura com gramíneas, evitando sempre plantas hospedeiras (WENDLAND et al., 2018).

As formas de controle culturais e com produtos químicos sintéticos que têm sido comumente utilizadas são eficazes quando utilizadas de forma correta. Contudo, o controle biológico tem sido uma alternativa a implementar se utilizar no manejo integrado de doenças, aumentando a eficácia de controle, diminuindo riscos ambientais e à saúde humana (RAUT e KARUPPAYIL, 2014).

Dentre os microrganismos utilizados para biocontrole de doenças de plantas, as bactérias dos gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus* estão entre as mais frequentemente estudadas. Bactérias pertencente ao gênero *Bacillus* são aeróbias ou anaeróbias facultativas, podem utilizar várias fontes de carbono para seu crescimento além de formarem endósporos (MADIGAN et al., 2016). A formação de endósporos, que são estruturas de resistência, é a característica deste gênero com que possibilita sua sobrevivência e colonização rizosférica. A capacidade de biossintetizar metabólitos secundários com atividade antimicrobiana é de interesse para o desenvolvimento de bioprodutos para a agricultura (BAPTISTA et al., 2018; PAZ et al., 2018).

O objetivo deste trabalho foi investigar a atividade antagonista in vitro da cepa LABIM22 contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (FOP06) e *Fusarium solani* (FUS145 e FUS234), bem como otimização de meio de cultivo para maximizar a produção de moléculas bioativas e avaliar a estabilidade de seus metabólitos frente a fontes de estresse.

4.4 Materiais e Métodos

4.4.1 MICRORGANISMOS

A cepa LABIM22 foi isolada no Laboratório de Biotecnologia Microbiana (LABIM) localizado na Universidade Estadual de Londrina (UEL) a partir de uma amostra ambiental do solo. Este microrganismo se encontra depositado na coleção do LABIM. A ativação da cepa a partir da solução estoque foi realizada em meio Lúria Bertani ágar (LBA) a 28 °C por 24 h.

O presente microrganismo foi obtido através de um *screening* onde foram testadas um total de 9 cepas provenientes de uma amostra ambiental do solo. Através do desafio por cultura dupla indentificou se LABIM22 como o microrganismo com maior potencial biotecnológico dentre as bactérias testadas.

Os fitopatógenos utilizados para os experimentos serão *Fusarium solani* 145, *Fusarium solani* 234 e *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* 06, os quais estão mantidos na coleção da professora Dra. Maria Isabel Balbi-Peña no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual de Londrina. O cultivo dos fungos fitopatógenos foi realizado em meio de cultivo batata dextrose ágar (BDA), a 25 °C e fotoperíodo de 12/12 h.

4.4.2 ANTAGONISMO DIRETO POR CULTURA DUPLA

O microrganismo foi ativado como já mencionado no item 4.4.1 e feito um segundo cultivo em LBA e incubado em B.O.D a 28 °C por 24 h. Após este período, com o auxílio de uma alça bacteriológica o antagonista foi inoculado nas bordas da placa de petri contendo meio BDA. No centro desta mesma placa foi adicionado um disco micelial de 6 mm de diâmetro do fitopatógeno (*Fusarium solani* 145, *Fusarium solani* 234 e *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* 06). Como controle utilizou se placas de BDA contendo apenas o disco micelial do patógeno inoculado ao centro. O experimento foi incubado em B.O.D a 25 °C com fotoperíodo de 12/12 h. Após 7 dias foi avaliado o crescimento micelial em milímetros (mm) com auxílio de paquímetro e calculado a porcentagem de inibição através da seguinte fórmula (YAHYAZADEH et al., 2008):

$$\text{ICM (\%)} = \left[\frac{dc - dt}{dc} \right] \times 100$$

Onde:

ICM = Porcentagem de inibição do crescimento micelial

dc = diâmetro médio da colônia no controle (mm)

dt = diâmetro médio da colônia de cada tratamento (mm)

O delineamento do experimento será inteiramente casualizado com 8 repetições. O experimento será repetido.

4.4.3 CULTIVO LÍQUIDO DA CEPA LABIM22

O pré-inóculo foi preparado a partir de colônias puras (obtidas conforme descrito no item 4.4.1), as quais foram suspensas em salina (0,85% cloreto de sódio) e ajustada para 0,5 na escala de McFarland (1.5×10^8 UFC/mL). O inóculo foi preparado a partir de 30 uL dessa suspensão bacteriana, as quais foram transferidas para um frasco erlenmeyer de 125 mL contendo 30 mL de caldo LB e incubado a 28 °C por 24 h a 125 rpm (Shaker orbital Tecnal - TE 422, Brasil). Para fermentação alíquotas de 1% (v:v) do inóculo foi adicionado aos seguintes meios de cultivo: Meio 1 (LB): caldo LB (g L⁻¹: triptona 10.0, extrato de levedura 5.0, NaCl 5.0, pH 6.8-7.0). Meio 2 (LB + M): caldo LB + Micronutrientes (g L⁻¹: triptona 10.0, extrato de levedura 5.0, NaCl 5.0, diferentes micronutrientes -formulação em pedido de patente, pH 6.8-7.0). Meio 3 (MF): caldo formulado (meio composto por fontes de carbono, nitrogênio e diferentes micronutrientes – formulação em pedido de patente). Após inoculação as amostras foram incubadas em agitadora orbital em disposição aleatória a 200 rpm a 28 °C por 72 h. Após a produção o fermentado foi centrifugado a 9000 rpm por 10 min a 4 °C e posteriormente filtrado em membranas de 0,22 µm afim de se obter o sobrenadante livre de células (SLC).

4.4.4 TESTE DE DIFUSÃO EM ÁGAR

Os fitopatógenos foram cultivados em meio BDA em placas de Petri de 90 mm de diâmetro e incubados a 25 °C com fotoperíodo de 12/12 h. Foi retirado um disco micelial de 6 mm de diâmetro de uma colônia fúngica de 5 dias de crescimento dos fitopatógenos (*F. solani* 145, *F. solani* 234 e *F. oxysporum f. sp. phaseoli* 06) e inoculado ao centro da placa.

Poços de 6 mm de diâmetro foram perfurados em placas de petri contendo BDA e aplicados 200 µL do SLC proveniente de cada meio de cultivo descrito no item 4.4.3. Como controle utilizou se placas de BDA contendo apenas o disco micelial do patógeno (*F. solani* 145, *F. solani* 234 e *F. oxysporum f. sp. phaseoli* 06) inoculado ao centro da placa de Petri. O experimento contou com 8 repetições. Este experimento foi realizado duas vezes.

4.4.5 AVALIAÇÃO DE ESTABILIDADE A TEMPERATURA, LUZ E PH DOS METABÓLITOS DA CEPA LABIM22

O cultivo líquido da cepa antagonista foi realizado como descrito no item 4.4.3. Para os próximos experimentos apenas o meio de cultivo MF foi utilizado. O fermentado foi centrifugado a 9000 rpm por 10 min a 4 °C e utilizado o sobrenadante para os teste de estabilidade.

Amostras do sobrenadante foram submetidos a temperatura de 70 °C e 100 °C (banho maria, TECNAL, Brasil), por 30 minutos e 121 °C por 15 min (autoclave, Prismatec, Brasil), uma alíquota sem tratamento térmico foi considerada como controle.(25 °C). Após os tratamentos o sobrenadante foi esterilizado em membranas de 0,22 µm e avaliada sua atividade conforme o item 4.4.4.

Para avaliar sua estabilidade a diferentes comprimentos de ondas de luz, o sobrenadante foi exposto a faixas de onda de luz de 365 nm, 254 nm e luz branca por 30 minutos a uma distância de 15 cm da fonte luminosa. Após o tratamento as amostram foram esteilizadas com membrana de celulose de 0,22 µm e testada conforme o item 4.4.4.

A estabilidade a variações de pH foram feitas com as faixas de pH de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, e 11,0 e mantidos a 4 °C por 24 h, para ajustar a faixa de pH

desejada utilizou se HCl 1 M ou NaOH 1 M. Após este período todas as amostras foram ajustadas novamente para pH 7 e esterilizadas em filtros de celulose com membrana de 0,22 µm e testadas conforme o item 4.4.4.

Cada experimento foi realizado separadamente. O deliamento experimental foi inteiramente casualizado com 8 repetições para cada tratamento. Todos os testes de estabilidade foi realizado apenas com *F. oxysporum* 06. Todos os experimentos foram realizados 3 vezes.

4.4.6 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

Para a obtenção do fermentado foi seguido a mesma metodologia já citada no item 4.4.3. Ao final do processo fermentativo o sobrenadante o SLC foi liofilizado (modelo L101 – Liobras). Uma alíquota de 200 mg do material resultante da liofilização foi diluído em 2 ml de água destilada, resultando em uma concentração de 100.000 µg/ml e diluídas para obtenção das concentrações de, 50.000 µg/ml, 25.000 µg/ml, 12.500 µg/ml, 62.50 µg/ml e 31.250 µg/ml. Após esta etapa uma alíquota de 1ml de cada concentração foi adiciona a 99 ml de BDA e autoclavado por 121 °C a 1 atm por 15 minutos. Como controle foi utilizado o meio BDA sem adição de nenhum tratamento. Após autoclavagem foram vertidos 10 ml de cada tratamento em placas de petri de 60 mm de diâmetro e inoculado um disco micelial de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* 06 ao centro e incubado em B.O.D a 25 °C por 7 dias. O experimento contou com 4 repetições por dose. O ensaio foi realizado duas vezes.

4.5 Resultados e Discussão

4.5.1 ANTAGONISMO DIRETO POR CULTURA DUPLA

O teste de antagonismo direto revelou que a cepa LABIM22 possui atividade antagonista frente aos três isolados confrontados (Figura 14), não tendo diferença significativa entre os patógenos pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A cepa em estudo foi identificada por Higashi et al., (2020) como sendo do gênero *Bacillus*.

Microrganismos possuem a habilidade de habitar desde o ambiente mais hostil, até o mais favorável. As interações entre estes seres vivos são complexas e podem ser favoráveis para ambos ou interações antagônicas onde um organismo pode inibir o desenvolvimento de outro (FIRA et al., 2018).

A cepa LABIM22 apresenta boa atividade antagônica frente a fungos fitopatogênicos filamentosos, além de produzir surfactina e AIA em baixa quantidade, como relata Higashi et al. (2020) em seu estudo.

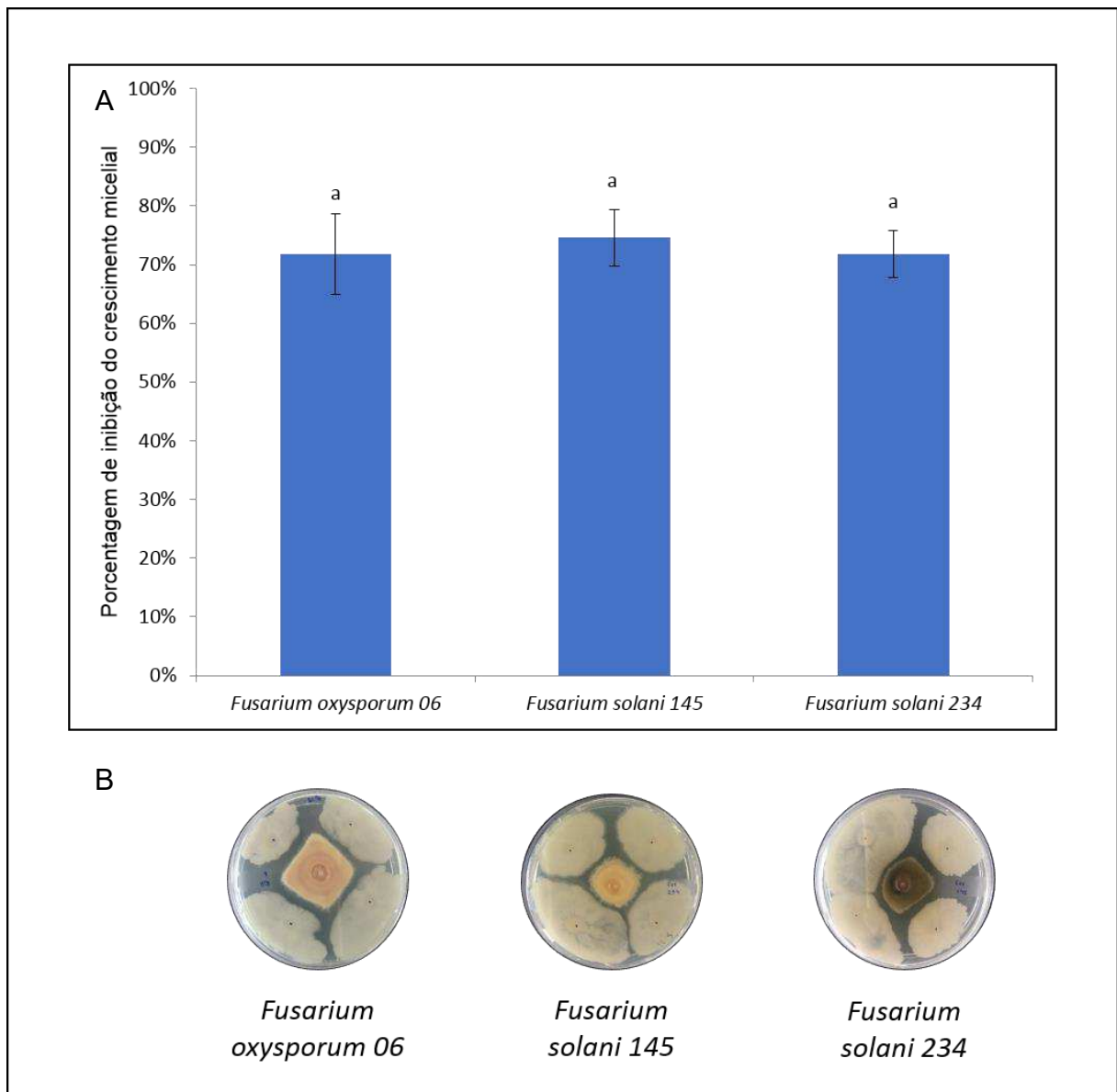


Figura 13 – Teste de antagonismo direto entre a cepa antagonista LABIM22 e os fitopatógenos *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* 06, *Fusarium solani* 145 e *F. solani* 234. A - Porcentagem de inibição (%) no teste de cultura dupla entre LABIM22 e os fungos fitopatogênicos. As barras de erro representam o desvio padrão com base em 4 repetições. Letras iguais nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey. B - Porcentagem de inibição do crescimento micelial de cada isolado de *Fusarium* sp.

Outras substâncias como solubilizadores de fosfato e sideróforos, que estimulam o desenvolvimento da planta resultando em um maior crescimento vegetal também são comumente relatados. No estudo de Sabaté et al. (2017) constataram que a cepa B14 de *Bacillus amyloliquefaciens* inoculada em sementes de feijão aumentava sua germinação em 10%, e produziram plantas que apresentavam raízes 2 cm maiores e parte aérea 6 cm maiores quando comparadas com sementes não tratadas com a bactéria, além de apresentarem um bom antagonismo contra *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia sclerotium*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani* e *Macrophomina phaseolina*.

Dorjey et al. (2018) estudaram 24 rizobactérias isoladas de diferentes culturas, e, dentre estes microrganismos, a cepa I21 foi identificada como *Bacillus cereus* e utilizada para tratamento de sementes de feijão contra *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* o qual diminuiu a incidência da doença de 42,36% para 17,36%, concluindo que a cepa é um bicontrolador em potencial.

Cucu et al. (2020) testaram a cepa QST713 de *Bacillus subtilis* contra *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* em aplicação preventiva por pulverização no solo onde plantou-se tomate e observaram uma redução de 70% da murcha de fusarium quando comparado com solo não tratado.

Yuan et al. (2012) concluíram que a cepa NJN-6 de *Bacillus amyloliquefaciens* inibe o crescimento micelial e a germinação de esporos de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* através de 11 compostos voláteis produzidos pelo antagonista.

4.5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO SLC

O meio de cultivo MF estimulou a cepa LABIM22 a sintetizar uma quantidade maior de compostos antifúngicos quando comparados com LB e LB+M, havendo diferença significativa entre os meios pelo teste de Tukey. O mesmo foi observado para todos isolados confrontados (Figura 15). No caso de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* 06 se deu a maior diferença entre LB e LB+M (26% de inibição) em comparação ao MF (49% de inibição) com uma porcentagem de inibição quase duas vezes maior.

Esta diferença de porcentagem se deve ao fato de o meio LB ser

menos estressante e por não possuir co-fatores enzimáticos como ferro, magnésio e manganês. Contudo o meio menos estressante foi também o que produziu a maior biomassa (dados não publicados).

Segundo Kilani – Feki et al. (2016), um meio que favorece uma maior biomassa compromete a síntese de metabólitos antifúngicos, fato observado ao estudarem 13 meios com composição diferente para fermentar *Bacillus* e verificar sua atividade frente a fungos filamentosos.

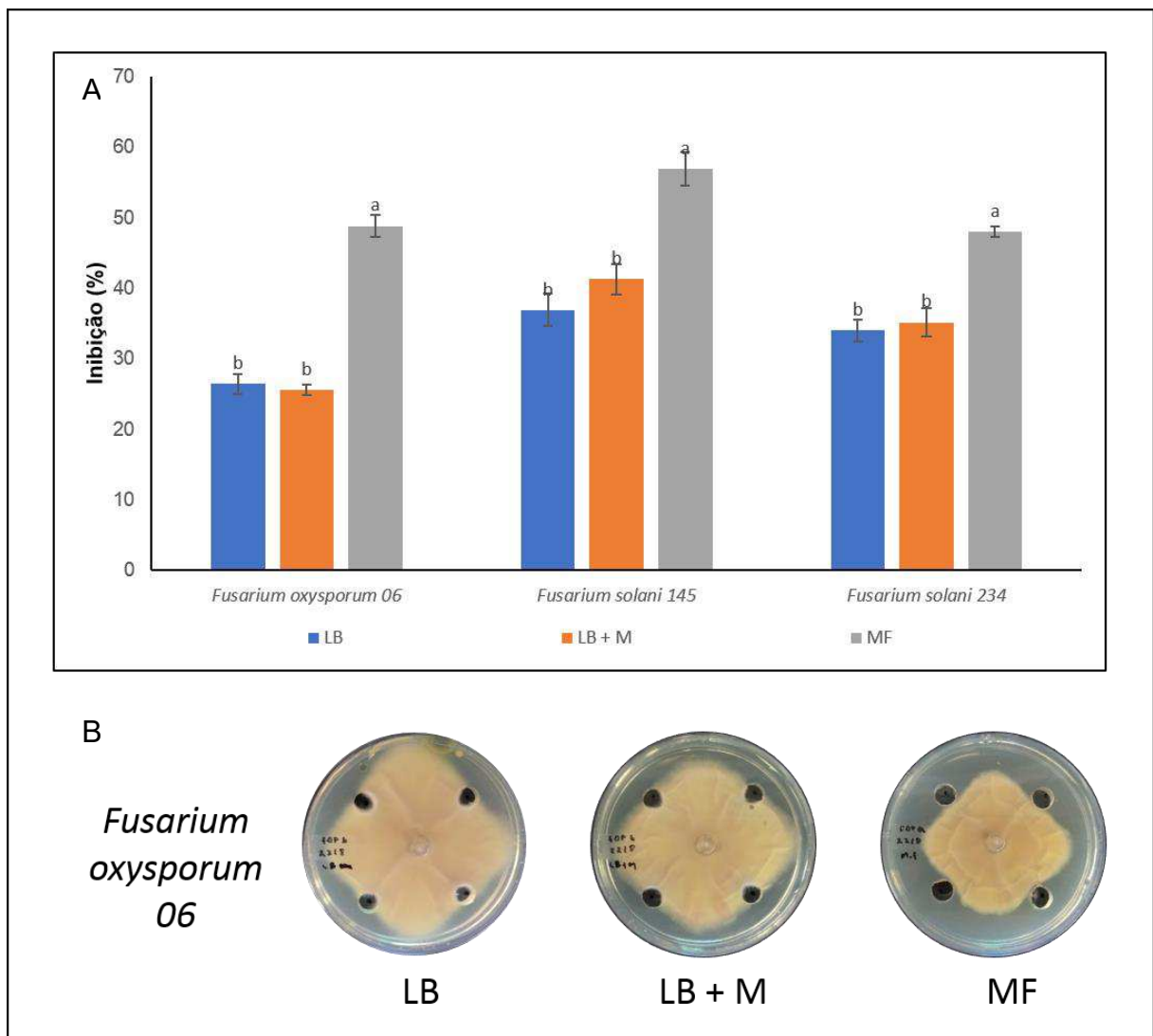


Figura 14 – A - Porcentagem de inibição do crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* 06, *Fusarium solani* 145 e *F. solani* 234 em teste de difusão pelo SLC de LABIM22 cultivado nos meios de cultivo LB (Lúria Bertani), LB+M (Lúria Bertani acrescido de micronutrientes) e MF (meio formulado a base de fonte de carbono, nitrogênio e micronutrientes). As barras de erro representam o desvio padrão com base em 8 repetições por patógeno. Letras iguais não diferem entre si para o mesmo patógeno pelo teste de Tukey. B - Teste de difusão em ágar com *F. oxysporum* 06 vs. metabólitos de LABIM22 sintetizados nos três meios de cultivo.

A influência da composição do meio de cultura não se resume a quantidade de biomassa e antifúngicos, atua também sobre a esporulação, bem como o tamanho e formato das mesmas. Esta interação é tão complexa que pode variar entre espécies diferentes de *Bacillus*, como explica Xu Zhou et al. (2017), em seu estudo com duas espécies de *Bacillus* spp, *cereus* e *megaterium*, em que concentração de sais inorgânicos cada vez maiores exerceram mudanças diferentes para cada espécie, onde para *B. cereus* houve apenas pequenas diferenças de tamanho, já para *B. megaterium* alterou não só a sua forma de arredondada para alongada como também aumentou seu tamanho em torno de 30%.

Fatores como pH mais alcalino e temperatura maior reduziram o volume dos esporos de ambas espécies em 25%. Portanto, a depender do que se deseja, um meio de cultivo bem ajustado faz muita diferença.

Fontes de carbono e nitrogênio para cultivo de *Bacillus* spp., é um dos principais custos no processo de fermentação industrial. Quanto mais açúcar disponível a um custo menor, mais rentável economicamente se torna o meio de cultivo. Navarro – Mtz et al. (2019) estudaram o processamento de farelo de soja, um substrato rico em proteína e açúcar bastante utilizado para fermentação de vários microrganismos, porém, sendo necessária a moagem para disponibilizar o açúcar. Após a processo de moagem, a quantidade de açúcar disponível aumentou em 34,1 vezes, refletindo diretamente na produção de biomassa.

O meio de cultivo MF conta com maiores teores de carbono e nitrogênio bem como diferentes micronutrientes, que causam um estresse controlado na cepa LABIM22, resultando em uma maior quantidade de moléculas bioativas contra os fitopatógenos testados.

4.4.3 AVALIAÇÃO DE ESTABILIDADE A TEMPERATURA, LUZ E PH DOS METABÓLITOS DA CEPA LABIM22

As figuras 15, 16 e 17 mostram os resultados das análises de estabilidade revelando que os metabólitos produzidos pela cepa LABIM22 são estáveis às temperaturas (25, 70, 100 e 121° C) e pH (entre 3 e 11), não havendo diminuição do efeito inibitório do crescimento micelial de *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli* nem das cepas de *F. solani* (análise de variância não significativo $p < 0.05$).

Os metabólitos de LABIM22, quando expostos ao comprimento de 365 nm, apresentaram um incremento de atividade com uma média de 43% de inibição do crescimento micelial, enquanto que para luz branca e comprimento de 254 nm as médias de inibição foram de 39% e 38%, respectivamente.

Segundo estudos de Higashi et al. (2020) a cepa LABIM22 possui em seu genoma clusters que codificam antifúngicos como a fengicina, surfactina e bacilibactina e antibacterianos como a difucidina, macrolactina, bacilysina e bacilaene. Nesse mesmo estudo testaram a estabilidade a diferentes temperaturas, comprimentos de onda e pH das moléculas produzidas por LABIM22 em meio de cultivo MF contra *S. sclerotiorum*, e observaram que estas moléculas foram estáveis, não havendo perda de atividade antifúngica.

Zhang et al. (2017), em seus estudos com a cepa Z-14 de *Bacillus subtilis*, testaram a estabilidade a temperatura e pH utilizando o fungo *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* como bioindicador. Estes autores observaram que seus metabólitos foram estáveis a temperaturas de 40 °C, 60 °C e 80 °C, porém a 100 °C houve perda de 11,8% de atividade. Quanto ao pH houve estabilidade na faixa de 3 a 8, porém em condições de meio alcalino (pH = 11) houve uma diminuição de 86,6% de atividade. A principal molécula identificada pelos autores foi a iturina, molécula que não foi detectada no genoma da LABIM22 por Higashi et al. (2020).

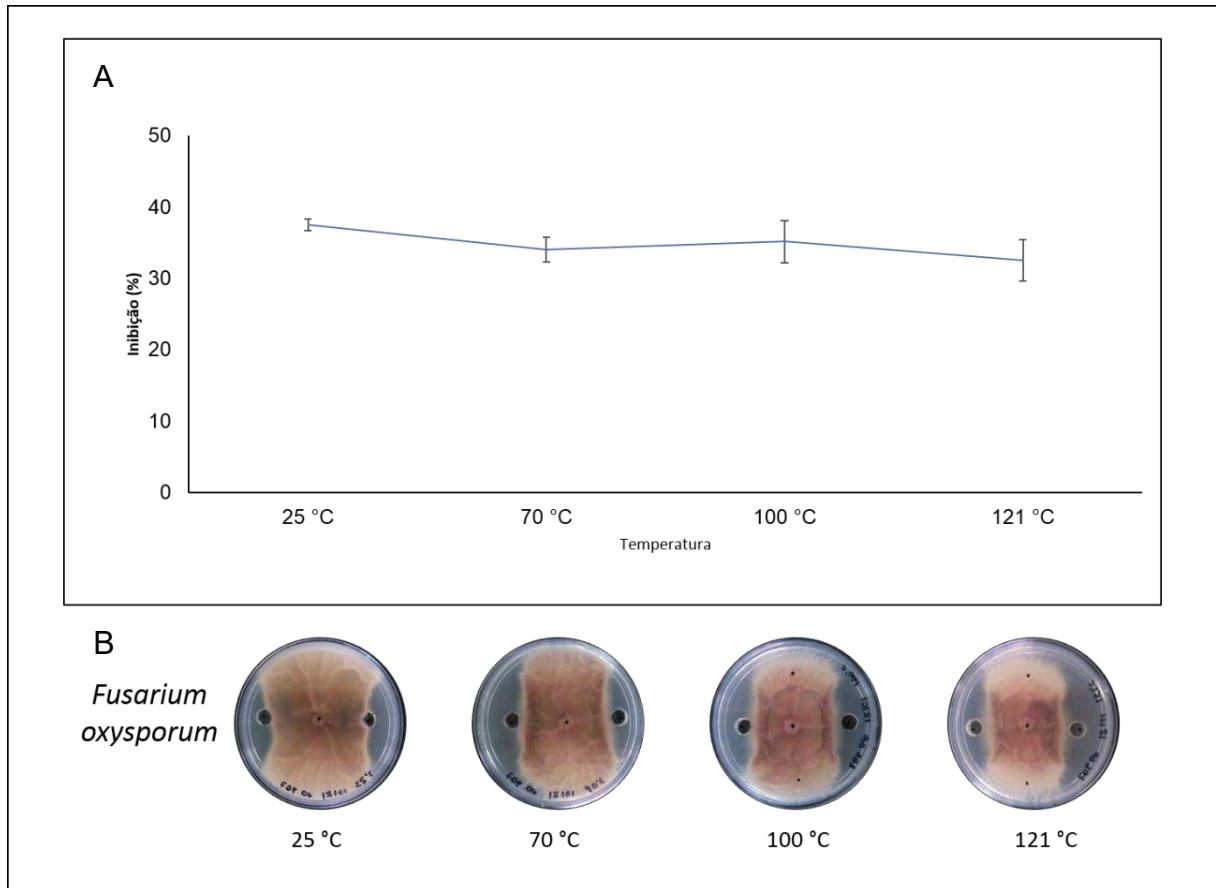


Figura 15 – Teste de estabilidade térmica sob temperaturas de 25 °C; 70 °C; 100 °C; 121 °C dos metabólitos produzidos pela cepa LABIM22 em meio formulado. A - Porcentagem de inibição do crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* 06, em teste de difusão pelo SLC de LABIM22 submetido a diferentes temperaturas. As barras de erro representam o desvio padrão com base em 8 repetições. B - Teste de difusão em ágar com *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* 06 contra metabólitos de LABIM22 submetidos a diferentes temperaturas.

Por outro lado, as moléculas de surfactina e fengicina presentes no genoma da LABIM22 (HIGASHI, 2020), foram relatadas por outros autores como termoestáveis. Rawal e Keharia (2019) extraíram lipopeptídeos da cepa AB30a de *Bacillus amyloliquefaciens* por precipitação ácida e testaram sua estabilidade a alta temperatura, utilizando como bioindicador de atividade antifúngica *Aspergillus niger* e observaram que mantinha sua atividade mesmo após um ciclo de autoclavagem (15 min e 1 atm por 15 min). Estes pesquisadores relatam ainda que os lipopeptídeos extraídos pertenciam à família das iturinas, fengicinas e surfactinas, estas duas últimas também presentes no SLC produzido por LABIM22 no presente estudo.

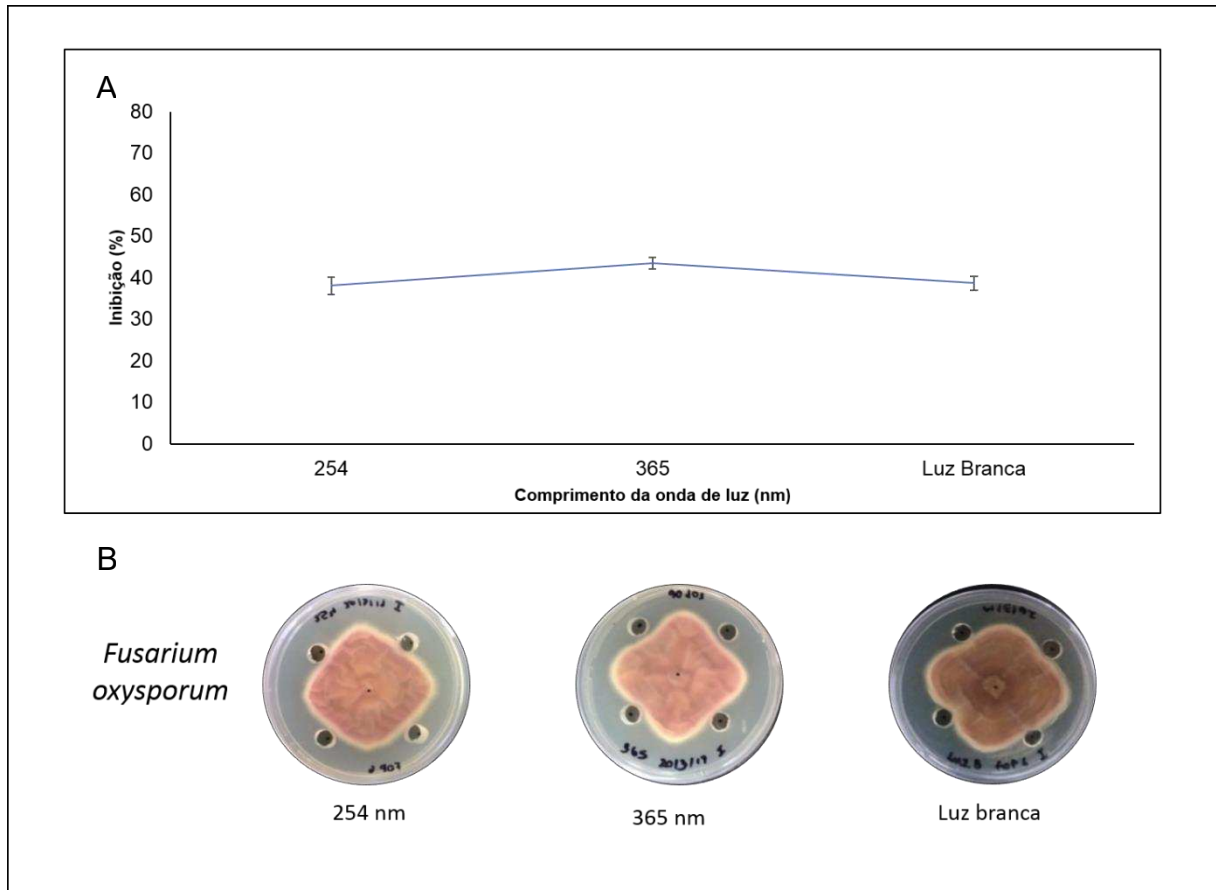


Figura 16 – Teste de estabilidade a diferentes comprimentos de onda de luz (Luz branca; 254 nm; 365 nm) dos metabólitos produzidos pela cepa LABIM22 em meio formulado. A - Porcentagem de inibição do crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* 06, em teste de difusão pelo SLC de LABIM22 submetido a diferentes comprimentos de ondas de luz. As barras de erro representam o desvio padrão com base em 8 repetições para cada experimento. B - Teste de difusão em ágar com *F. oxysporum* 06 contra metabólitos de LABIM22 submetidos a diferentes comprimentos de ondas de luz.

Os metabólitos de LABIM22 quando produzidos em meio de cultivo MF são estáveis em uma ampla faixa de temperaturas (25 °C, 70 °C, 100 °C e 121 °C 1 atm), comprimentos de onda (245 nm, 365 nm e luz branca) e pH (3 a 11). Conhecer a temperatura na qual os metabólitos do antagonista estudado são ativos é importante na elaboração de um bioproduto, tendo em vista que em muitos casos o armazenamento e o transporte serão em condições de altas temperaturas. Após aplicação a campo, as biomoléculas serão expostas a altas temperaturas e a longos períodos de exposição à luz UV.

A estabilidade frente a um ciclo de autoclavagem (normalmente a 121 °C e 1 atm por 15 minutos) é importante por ser este o método de esterilização utilizado no processo do desenvolvimento do produto, dispensando o uso de filtros, que além de representarem maior custo, também exigem maior cuidado em sua manipulação.

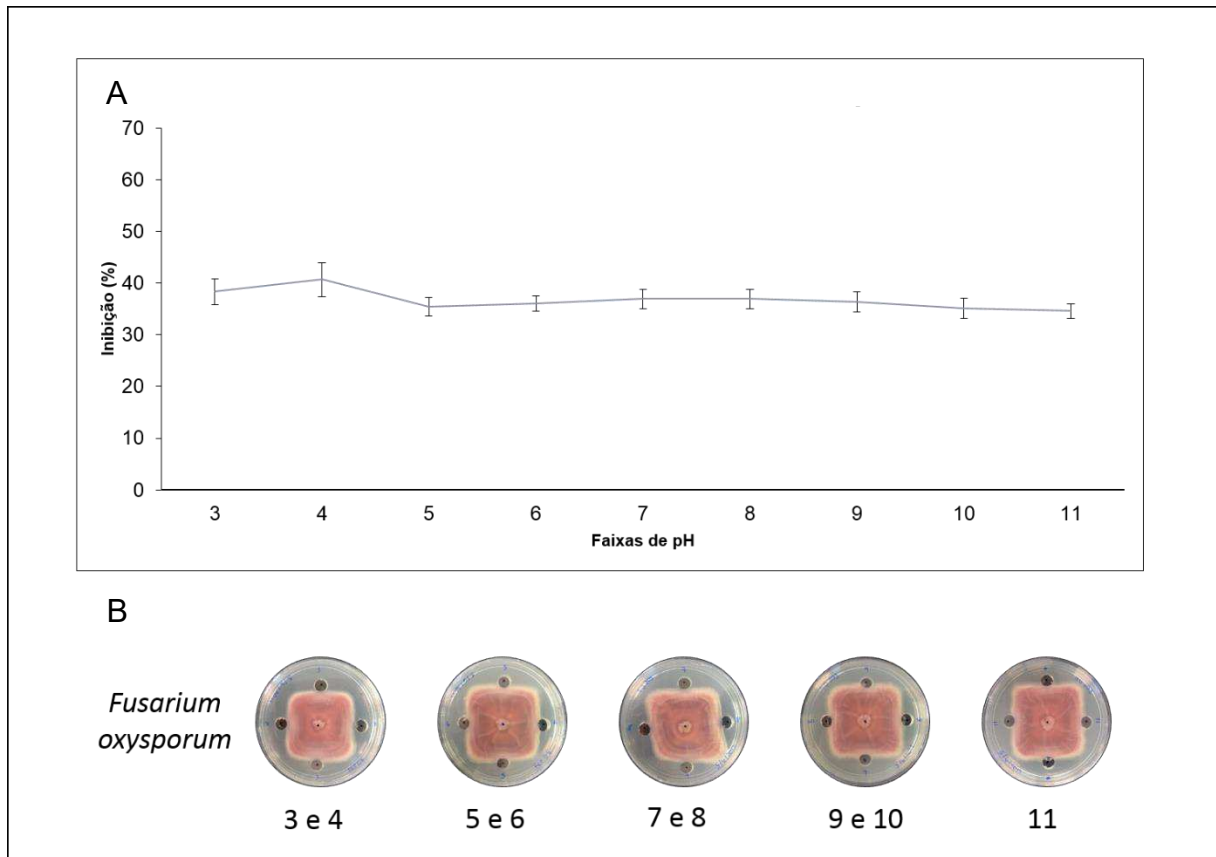


Figura 17 – Teste de estabilidade a diferentes faixas de pH (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, e 11) dos metabólitos produzidos pela cepa LABIM22 em meio formulado. A - Porcentagem de inibição do crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* 06, em teste de difusão pelo SLC de LABIM22 submetido a diferentes faixas de pH. As barras de erro representam o desvio padrão com base em 8 repetições para cada experimento. B - Teste de difusão em ágar com *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* 06 contra metabólitos de LABIM22 submetidos a diferentes faixas de pH.

4.4.4 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (MIC)

A concentração de 1000 ug/mL, a maior utilizada, foi capaz de inibir apenas 51% do crescimento micelial, enquanto a concentração de 500 ug/mL apresentou 29,58%, as demais concentrações (250 ug/mL; 125 ug/mL; 62,5 ug/mL; e 31,25 ug/mL) não apresentaram qualquer sinal de atividade antifúngica. Dados apresentados no figura 18.

Fusarium oxysporum f. sp. *phaseoli* se mostrou menos sensível aos metabólitos de LABIM22 se comparado a *S. sclerotiorum* como demonstrado por Higashi et al. (2020).

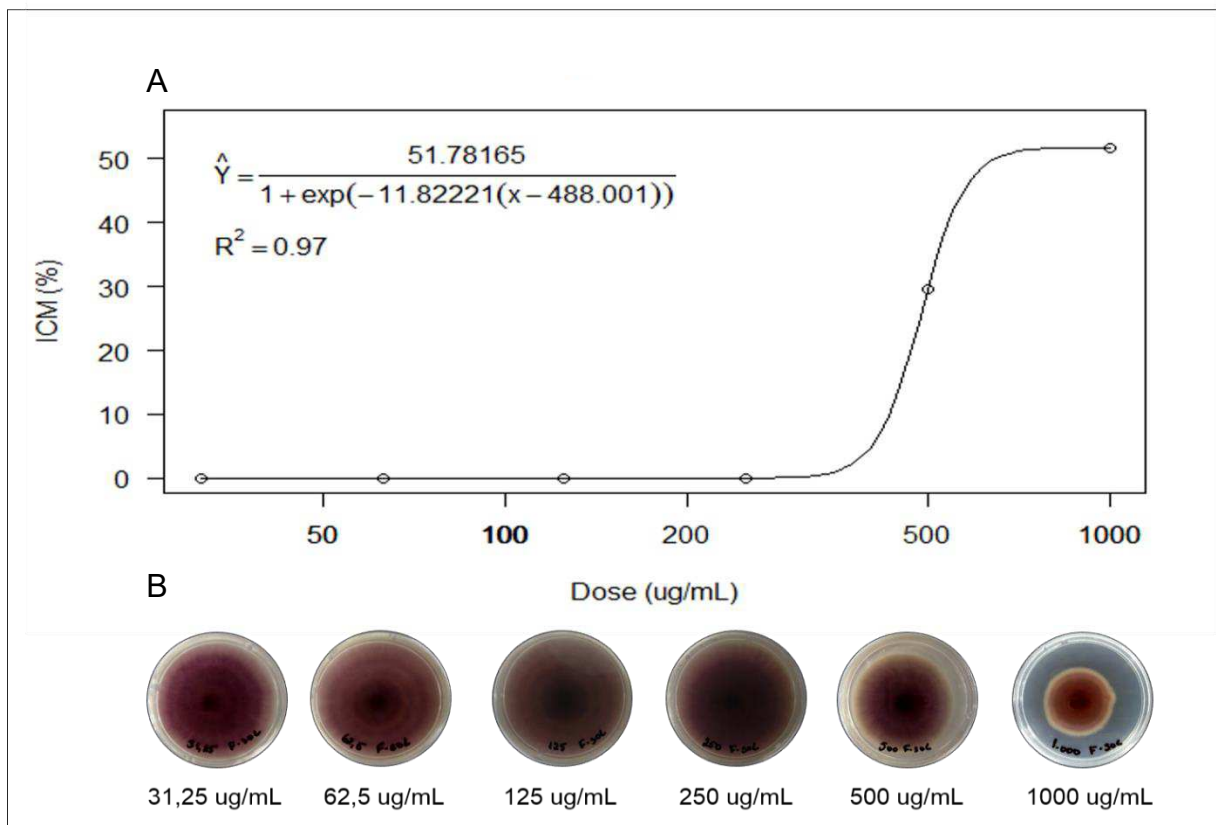


Figura 18 – Concentração inibitória mínima dos metabólitos de LABIM22 produzidos em meio de cultivo MF contra *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*. A - Índice de crescimento micelial em porcentagem (ICM) em função das doses utilizadas (31,25 ug/ml, 62,5 ug/ml, 125 ug/ml, 250 ug/ml, 500 ug/ml e 1000 ug/ml). Os círculos na curva representam a dose utilizada. B – Crescimento micelial de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* frente aos metabólitos da LABIM22.

No teste de antagonismo direto foram obtido médias acima de 70% de inibição, já no teste com o SLC a média de inibição foi inferior a 50%, o que coincide com a alta dosagem (1000 ug/mL) necessária para inibir apenas 51% do crescimento micelial do patógeno. A diferença entre as porcentagens de inibição do crescimento micelial do antagonismo direto (70%), SLC e MIC (ambos 50 %) se deve ao fato da velocidade de crescimento do fitopatógeno em questão ser lenta, demorando 7 dias para tomar uma placa de petri de 90 mm de diâmetro. Já a cepa LABIM22 além de boa colonizadora possui um crescimento mais acelerado em relação ao patógeno utilizado, dando tempo de colonizar o meio e sintetizar seus compostos antifúngicos, portanto quando utilizado suas células, as mesmas irão crescer rapidamente em direção ao fitopatógeno, aumentando a porcentagem de inibição do crescimento micelial (Higashi et al., 2020).

Zhao et al. (2013) isolaram fengicina de uma cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* e determinaram a concentração inibitória mínima desta molécula frente a *F. oxysporum*, utilizando as concentrações de 1000 ug/mL; 500 ug/mL; 250

ug/mL; 125 ug/mL; 62,5 ug/mL; 31,25 ug/mL; 15,625 ug/mL e 7,8125 ug/mL e obtiveram inibição de 100% até concentração de 31,25 ug/mL.

No presente trabalho não foi alcançado a inibição de 100% utilizando apenas o extrato bruto liofilizado. Espera-se que utilizando um método de purificação e utilizando frações purificadas seria possível chegar a porcentagens maiores de inibição de *F. oxysporum* e *F. solani* com a cepa LABIM22.

4.6 Conclusão

A cepa LABIM22 de *Bacillus* sp. apresentou atividade fungitóxica em teste de cultura dupla contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (FOP06) e *Fusarium solani* (FUS145 e FUS234). Quando LABIM22 foi cultivada em meio de cultivo MF (formulação em pedido de patente), expressou uma atividade antifúngica contra *F. solani* 06 49% maior que quando cultivada em meio LB. Seus metabólitos se mostraram estáveis às variações de temperatura, luz e pH. A concentração de 1000 ug/mL foi capaz de inibir 51% do crescimento micelial de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*.

Estes fatos evidenciam o potencial da cepa de *Bacillus* LABIM22 como agente de biocontrole frente a *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* e *F. solani*.

5 Conclusões gerais

A cepa LABIM22 foi identificada como *Bacillus velezensis*. A atividade antagonista *in vitro* observada frente a todos os fungos fitopatógenos utilizados no estudo e o sucesso de biocontrole do mofo branco *in vivo* sugere uma ação antagonista ligada às moléculas de fengicina, surfactina e bacilibactina produzidas pela cepa LABIM22. Essas moléculas bioativas foram preditas a partir da identificação dos *biosynthetic gene clusters* após o sequenciamento do genoma da cepa LABIM22 de *B. velezensis*. O controle de 94% do mofo branco em sementes de soja sustentam os resultados obtidos em análises *in silico* e *in vitro*, evidenciando a ação da surfactina na colonização da superfície de sementes de soja juntamente com a atividade fungitóxica da fengicina. A coerência entre os resultados das análises *in silico*, *in vitro* e *in vivo* sugerem o potencial biotecnológico da cepa de *Bacillus* LABIM22 para seu uso como agente de biocontrole de doenças fúngicas em plantas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGROFIT: **Sistemas de agrotóxicos fitossanitários**. Disponível em <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons> Acesso em 05 Ago 2019.
- AMORIM, L., REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN F. A. **Manual de fitopatologia**. 4 ed. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2011. p.704.
- ARAUJO, F. F. Inoculação de sementes com *Bacillus subtilis*, formulado com farinha de ostras e desenvolvimento de milho, soja e algodão, **Ciência Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 2, p. 456-462, 2008
- ARIMA, K., KAKINUMA, A., TAMURA, G. Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation, **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 31, n. 3, p. 488–494, 1968.
- ARNUSCH, C.J., ULM, H., JOSTEN, M., SHADKCHAN, Y., OSHERO, V. N., SAHL, H. G., SHAI, Y. Ultrashort peptide bioconjugates are exclusively antifungal agents and synergize with cyclodextrin and amphotericin B. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n.1, p. 1-9, 2012.
- BAUTISTA, L. X. C.; GALLARDO, I. R. Estandarización de métodos de detección para promotores de crecimiento vegetal (ácido indol acético y giberelinas) em cultivos microbianos. **Pontificia Universidad Javeriana**, Bogotá, p 117, 2008.
- BAPTISTA, J. P., SANCHES, P. P., TEIXEIRA, G. M., MOREY A. T., TAVARES, E. R., YAMADA-OGATTA, S. F., DA ROCHA, S. P. D., HUNGRIA, M., RIBEIRO, R. A., BALBI-PEÑA, M. I., CHIDEROLI, R. T., PEREIRA, U. P., DE OLIVEIRA, A. G. Complete genome sequence of *Bacillus velezensis* LABIM40, an effective antagonist of fungal plant pathogens. **Genome Announcements**, v. 6, n. 25, p. e00595-18, 2018
- BARDAS, G. A., VELOUKAS, T., KOUTITA, O., KARAOGLANIDIS, G. S. Multiple resistance of *Botrytis cinerea* from kiwifruit to SDHIs, Qols and fungicides of other chemical groups. **Pest management science**, v. 66(9), p. 967-973, 2010.
- BASTIEN, M., HUYNH, T. T., GIROUX, G., IQUIRA, E., RIOUX, S., BELZILE, F. A reproducible assay for measuring partial resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v.92, n.1, p.279-288, 2012.
- BECKMAN, C. H. **The nature of with diseases of plants**. St. Paul: APS Press, 175pp, 1987.
- BOLAND G. J., Hall R. Relationships between the spatial pattern and number of apothecia of *Sclerotinia sclerotiorum* and stem rot of soybean. **Plant Pathology** 37:3:329–336, 1988.
- BOOTH, C. **The genus *Fusarium* sp.** Kew: Common wealth Mycological Institute.

237pp, 1971.

BOTELHO, L. S. **Relações de *Sclerotinia sclerotiorum* com sementes de soja: detecção e transmissibilidade do patógeno**. 2011. 156 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia). Universidade Federal de Lavras, Lavras.

BOTELHO, L. S., ZANCAN W. L. A., MACHADO J. C, BARROCAS E. N. Performance of common bean seeds infected by the fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. **Journal of Seed Science** v. 35, p. 153-160, 2013.

BHATTACHARYYA, P. N., JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World Journal Microbiology Biotechnology**, Dordrecht, v. 28, n. 4, p. 1327–1350, 2012.

BLUMA, R.V., ETCHEVERRY, M.G. Influence of *Bacillus* spp. isolated from maize agroecosystem on growth and aflatoxin B1 production by *Aspergillus* section Flavi. **Pest Management Science**, Sussex, v. 62, p. 242–251, 2006.

CABI DATABASES. **Dictionary of the Fungi**. Disponível em: <<http://www.scspeciesfungorum.org/names/fundic.asp>> Acesso em: 15 Jul 2018.

CAO, Y., PI, H., CHANDRANGSU, P., LI, Y., WANG, Y., ZHOU, H., CAI, Y. Antagonism of two plant-growth promoting *Bacillus velezensis* isolates against *Ralstonia solanacearum* and *Fusarium oxysporum*. **Scientific reports**. v.8, n.1, p.1-14, 2018.

CAO, Y., ZHANG, Z., LING, N., YUAN, Y., ZHENG, X., SHEN, B.; Shen, Q. *Bacillus subtilis* SQR 9 can control *Fusarium* wilt in cucumber by colonizing plant roots. **Biology and Fertility of Soils**. v47, p.495-506, 2011.

CAMPOS, H.D., SILVA, L.H.C.P., MEYER, M.C., SILVA, J.R.C., NUNES JUNIOR, J. Mofo branco na cultura da soja e os desafios da pesquisa no Brasil. **Tropical Plant Pathology**, v.35, p. C-CI, 2010.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira de grãos, julho/2016 – décimo levantamento. Brasília: **Conab**, v.3, n.10, 179p, 2016.

CONAB. – Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira de grãos, janeiro/2020 – quarto levantamento. Disponível em <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos>>. Acesso em: 15 jan. 2020.

COUTTE, F., LECLÈRE, V., BÉCHET, M., GUEZ, J. S., LECOUTURIER, D., CHOLLETIMBERT, M., DHULSTER, P., JACQUES, P. Effect of pps disruption and constitutive expression of *urfA* on surfactin productivity, spreading and antagonistic properties of *Bacillus subtilis* 168 derivatives. **Journal of Applied Microbiology**, v.109, n.2, p.480-491, 2010.

CUCU, M. A., GILARDI, G., PUGLIESE, M., GULLINO, M. L., GARIBALDI, A. An assessment of the modulation of the population dynamics of pathogenic *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in the tomato rhizosphere by means of the application of

Bacillus subtilis QST 713, *Trichoderma* sp. TW2 and two composts. **Biological Control**. v.142, p.104158, 2020.

CUNHA, W. G. **Resistência a *Sclerotinia sclerotiorum* em plantas de soja geneticamente modificadas para expressar o gene da oxalato descarboxilase de 52 *Flammulina velutipes***. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2010.

DORJEY, S., SHAH, T. A., BHAT, N. A., SOFI, P. A., BABA, Z. A., CHATTOO, M. A. Evaluation of PGPR Isolates for the Management of Beans Wilt Caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. **International Journal of Current and Applied Sciences Microbiology**. v.7, n.3, p.355-365, 2018.

DOORNBOS, R. F.; VAN LOON, L. C.; BAKKER, P. A. Impact of root exudates and plant defense signaling on bacterial communities in the rhizosphere. A review. **Agronomy for Sustainable Development**. v.32, p.227–243, 2012

EARL, A. M., LOSICK, R., KOLTER, R. Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. **Trends in Microbiology**, MA, USA, v. 16, n. 6, p. 269-275, 2008.

EHR, R. J., KEMMITT, G. **Periodic table of the fungicides**. Indianapolis: Dow Agrosciences, 2002.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de pesquisa Agropecuária. **Embrapa soja**. Disponível em <<https://www.embrapa.br/web/portal/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>> Acesso em 15 jan. 2020.

ENCINAS, O. **Conservación de maderas. Trujillo** (Venezuela): GICOM – Grupo de Investigación em Conservación de Maderas, p.22, 2004.

ETCHEGARAY, A., DE CASTRO BUENO, C., DE MELO, I. S., TSAI, S. M., FIORE, M. F., SILVA-STENICO, M. E., DE MORAES, L. A., TESCHKE, O. Effect of a highly concentrated lipopeptide extract of *Bacillus subtilis* on fungal and bacterial cells. **Archives of Microbiology**. v.190, p.611-622, 2008.

FAOSTAT- Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database, **United Nations**, 2020.

FIGUEREDO, M. V. B., MARTINEZ, C.R., BURITY, H. A., CHANWAY, C. P. Plant growth-promoting rhizobacteria for improving nodulation and nitrogen fixation in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v.24, p.1187-1193, 2008.

FIGUEREDO, M. V. B., SELDIN, L., ARAUJO F. F; MARIANO, R. L. R. Plant growth promoting rhizobacteria: fundamentals and applications In: MAHESHWARI, D. K. (Ed.) **Plant growth and health promoting bacteria**. 1ª ed. Berlin: Springer-Verlag, v.18, p.45-68, 2010.

FIRA, D., DIMKIĆ, I., BERIĆ, T., LOZO, J., STANKOVIĆ, S. Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. **Journal of biotechnology**. v.285, p.44-55, 2018.

FORCELINI, C. A. **Fungicidas inibidores da síntese de esteróis. I. triazoles. RAPP**, Passo Fundo, v.2, p.335-355, 1994.

GEISER; D. M. et al. One fungus, one name: Defining the genus *Fusarium* in a scientifically robust way that preserves longstanding use. **Phytopathology**, v. 103, n. 5, p. 400–408, 2013.

GODOY, C. V., ALMEIDA, A. M. R., COSTAMILAN, L. M., MEYER, M. C., DIAS, W. P., SEIXAS, C. D. S., SOARES, R. M., HENNING, A. A., YORINORI, J. T., FERREIRA, L. P., SILVA, J. F. V. Doenças da Soja. In: AMORIN, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de Fitopatologia: Doenças de Plantas cultivadas**. 5ª ed. Piracicaba: Agronômica Ceres, p. 596 – 618. 2016.

GOVINDASAMY, V., SENTHILKUMAR, M., MAGHESHWARAN, V., KUMAR, U, BOSE, P., SHARMA, V., ANNAPURNA, K. *Bacillus* and *Paenibacillus* spp.: potential PGPR for sustainable agriculture. In: **Plant growth and health promoting bacteria**. Springer Berlin Heidelberg, p. 333-364, 2010.

GRAU, A., ORTIZ, A., GODOS, A. D., GÓMEZ-FERNÁNDEZ, J. C. A. Biophysical study of the interaction of the Lipopeptide Antibiotic Iturin A with Aqueous Phospholipid Bilayers. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.377, n.2, p.315-323, 2000.

HAHN, M. The rising threat of fungicide resistance in plant pathogenic fungi: Botrytis as a case study. **Journal of chemical biology**. v. 7, n. 4, p. 133-141, 2014.

HARTHMANN, O. E. L.; MÓGOR, Á. F.; WORDELL FILHO, J. A.; LUZ, W.C. Rizobactérias no crescimento e na produtividade da cebola. **Ciência Rural**. v.40, n.2, p.462-465, 2010.

HE, Y., ZHU, M., HUANG, J., HSIANG, T., ZHENG, L. Biocontrol potential of a *Bacillus subtilis* strain BJ-1 against the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. **Canadian journal of plant pathology**, v.41, n.1, p.47-59, 2019.

HENNING, A. A. **Patologia e tratamento de sementes: noções gerais**. Londrina: Embrapa Soja. p 51. 2004.

HENNING, A. A., ALMEIDA, A. M. R., GODOY, C. V., SEIXAS, C. D. S., YORINORI, J. T., COSTAMILAN, L. M.; FERREIRA, L. P.; MEYER, M. C., SOARES, R. M., DIAS, W. P. **Manual de identificação de doenças de soja**. 5.ed. Londrina: Londrina: Embrapa Soja, (Embrapa Soja Documentos 256), 76 p 2014.

HU, X., ROBERTS, D. P.; XIE, L.; QIN, L.; LI, Y.; LIAO, X.; HAN, P.; YU, 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.

KARIM, A., POIROT, O., KHATOON, A., AURONGZEB, M. Draft genome sequence of a novel *Bacillus glycinifermentans* strain having antifungal and antibacterial properties. **Journal of global antimicrobial resistance**. v.19, p.308-310, 2019.

KILANI-FEKI, O., KHEDHER, S. B., DAMMAK, M., KAMOUN, A., JABNOUN-KHIAREDDINE, H., DAAMI-REMADI, M., TOUNSI, S. Improvement of antifungal

metabolites production by *Bacillus subtilis* V26 for biocontrol of tomato postharvest disease. **Biological control**, v.95, p.73-82, 2016.

JI, S. H., PAUL, N. C.; DENG, J. X., KIM, Y. S., YUN, B. S., YU, S. H. Biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* CNU114001 against fungal plant diseases. **Mycobiology**, v.41(4), p.234-242, 2013.

JULIATTI, F. C., JULIATTI, F. C. **Podridão branca da haste da soja: Manejo e uso de fungicidas em busca da sustentabilidade nos sistemas de produção**. Uberlândia-MG, 2010.

JULIATTI, F. C., SAGATA, E., JACCOUD FILHO, D. S., JULIATTI, B. C. M. Métodos de inoculação e avaliação da resistência de genótipos de soja à *Sclerotinia sclerotiorum*. **Bioscience Journal, Uberlândia**, v. 30, n. 4, p. 958-968, 2014.

JULIATTI, F. C., FIGUEIRÓ, A. A., GARCIA, R. Á., & SANTOS, J. B. *Sclerotinia sclerotiorum* e Mofo branco: Estudos básicos e aplicados. **Ver. Anual de Patologia de Plantas**, 23, 159-194. 2015.

JULIO, V. A. **Manejo de mofo branco na cultura da soja**. 2016. Disponível em: <<http://www.pioneersementes.com.br/blog/119/manejo-de-mofo-branco-na-cultura-dasoja>>. Acesso em: 21 out. 2016

KAKINUMA, A., SUGINO H., ISONO M., TAMURA G., ARIMA K. Determination of fatty acid in surfactin and elucidation of the total structure of surfactin. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.33, n.6, p.973-976, 1969.

KERR, A. Biological control of crown gall through production of agrocin 84. **Plant Disease**. v.64, p.25-30, 1980.

KHAN, A. L., WAQAS, M.; ASAF, S., KAMRAN, M., SHAHZAD, R.; BILAL, S., KHAN, M. A., KANG, S. M., KIM, Y. H.; YUN, B. W., AL-RAWAHI, A., AL-HARRASI, A., LEE I. J. Plant growth-promoting endophyte *Sphingomonas* sp. LK11 alleviates salinity stress in *Solanum pimpinellifolium*. **Environmental and Experimental Botany**, v.133, p.58–69, 2017.

LUGO, L. S. C. **Manejo biorracional de la pudrición de la corona y raiz (*Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopercisi*) del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.)**. Tese de Mestrado, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Sinaloa, Departamento Agropecuario, Guasave, Sinaloa, México, 79pp, 2008.

LANNA, F. R., FERRO, H. M., PINHO, R. S. C. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Trópica**, UFMA, MA, v. 4, n. 2, p. 12-20, 2010.

LOPER, J. E., SCHROTH, M. N. Influence of bacterial sources of indole-2-acetic acid on root elongation of sugar beet. **Phytopathology**, v.76, p.386-389, 1986.

MAGET-DANA, R., THIMONB, L., PEYPOUXB, F.; PTAKA, M. Surfactin/Iturin A interactions may explain the synergistic effect of surfactin on the biological properties of iturin A. **Biochimie**, v.74, p.1047-1051, 1992.

MAZZUCHELLI, R. D. C. L., Sossai, B. F., Araújo, F. F. D. Inoculação de *Bacillus subtilis* e *Azospirillum brasilense* na cultura do milho. **Colloquium Agrariae**, v.10, n.2, p.40-47, 2015.

MEDEOT, D. B., BERTORELLO-CUENCA, M., LIAUDAT, J. P., ALVAREZ, F., FLORES-CÁCERES, M.L., JOFRÉ, E. Improvement of biomass and cyclic lipopeptides production in *Bacillus amyloliquefaciens* MEP218 by modifying carbon and nitrogen sources and ratios of the culture media. **Biological Control**, v.115, p.119-128, 2017

MEYER, M. C., CAMPOS, H. D., GODOY, C. V., MITINORI, C., UTIAMADA, A. R. D., DE SOUZA JACCOUD FILHO, D., LOPES, F. C., SILVA, L. N. S., DE OLIVEIRA, M. C. N., MARTINS, M.C. AND TORMEN, N.R. Eficiência de fungicidas para controle de mofo-branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) em soja, na safra 2017/2018: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. **Londrina: Embrapa Soja**, p.5, 2018.

MEYER, M. C.; CAMPOS, H. D., GODOY, C. V., UTIAMADA, C. M., MACHADO, A. Q., PIMENTA, C. B., CASSETARI NETO, D., JACCOUD FILHO, D. S., BORGES, E. P., SIQUERI, F. V.; JULIATTI, F. C., NUNES JUNIOR, J., CARNEIRO, L. C., SILVA, L. H. C. P. da; MADALOSSO, M.; BALARDIN, R. S.; & VENANCIO, W. S. Eficiência de fungicidas para controle de mofo-branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) em soja, na safra 2013/2015: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. **Londrina: Embrapa Soja**, p.4, 2015.

MEYER, M.C., MACHADO, T.A., CRUZ, G.P.O., ROCHA, M.B., VENANCIO, W.S., NUNES JUNIOR, J., CARNEIRO, L.C., CAMPOS, H.D., SILVA, L.H.C.P., BORGES, E. Efeito de tratamentos para biocontrole de mofo branco sobre a viabilidade de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*. In: Reunião de Pesquisa de Soja da Região Central do Brasil, 33., Londrina. **Resumos Brasília**, DF: Embrapa, 2013. p. 124-126.

MUELLER, D. S., A. E. DORRANCE, R. C. DERKSEN, E. OZKAN, J. E. KURLE, C. R. GRAU, J. M. GASKA, G. L. HARTMAN, C. A. BRADLEY, AND W. L. PEDERSEN. Efficacy of fungicides on *Sclerotinia sclerotiorum* and their potential for control of *Sclerotinia* stem rot on soybean. **Plant disease**, v.86, n.1, p 26-31, 2002.

MUKHERJEE, A. K., DAS, K. Correlation between diverse cyclic lipopeptides production and regulation of growth and substrate utilization by *Bacillus subtilis* strains in a particular habitat. **FEMS Microbiology Ecology**, v.54, p 479-489, 2005.

NAVARRO-MTZ, A. K., MARTINEZ-GARCIA, R., URZUA-VALENZUELA, M., ROLDAN-SABINO, C., KAKAZEY, M., JUAREZ-ARELLANO, E. A. High-energy ball milling treatment of soybean for *Bacillus thuringiensis* culture media. **Journal of bioscience and bioengineering**. v.128, n.3, p.296-301, 2019.

NAWAZ, H. H., RAJAOFERA, M. N., HE, Q., ANAM, U., LIN, C., MIAO, W. Evaluation of antifungal metabolites activity from *Bacillus licheniformis* OE-04 against *Colletotrichum gossypii*. **Pesticide biochemistry and physiology**. v.146, p.33-42, 2018.

NAYAKA, S. C., SHANKAR, A. C. U., REDDY, M. S., NIRANJANA, S. R., PRAKASH, H. S.; SHETTY, H. S.; MORTENSEN, C. N. Control of *Fusarium verticillioides*, cause

of ear rot of maize, by *Pseudomonas fluorescens*. **Pest Management Science**, London, v. 65, p. 769-775, 2009.

NISHIKORI, T., NAGANAWA, H., MURAOKA, Y., AOYAGI, T., UMEZAWA, H., Plipastatins: new inhibitors of phospholipase A2, produced by *Bacillus cereus* BMG302-fF67. III. Structural elucidation of plipastatins. **The Journal of Antibiotics**. V.39, p.755–761, 1986

OLIVEIRA, G. **Cadeia respiratória e fosforilação oxidativa – geração de ATP**. Disponível em: <<http://www.geocities.com/bioquimicaplicada/resumosatp.thm>> Acesso em: 05 out. 2017.

OLIVEIRA, S. C., CASTROAGUDIN, V., PEREIRA, D. A. S.; MACIEL, J. L. N., CERESINI, P. C. Resistência cruzada aos fungicidas IQoazoxistrobina e piraclostrobina no patógeno da brusone do trigo *Pyricularia oryzae* no Brasil. **Summa Phytopathologica**, v.41, n.3, p.298-304, 2015.

ONGENA, M., JACQUES, P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v.16, p.115-125, 2008.

PANDIN, C., DARSONVAL, M., MAYEUR, C., LE COQ, D., AYMERICH, S., BRIANDET, R. Biofilm formation and synthesis of antimicrobial compounds by the biocontrol agent *Bacillus velezensis* QST713 in an *Agaricus bisporus* compost micromodel. **Applied and environmental microbiology**. v.85, n.12, e00327-19, 2019.

PAL, K. K., GARDENER, B. M. Biological control of plant pathogens. **The Plant Health Instructor**, 2006.

PAZ, I. C. P., SANTIN, R. C. M., GUIMARÃES, A. M., ROSA, O. P. P. D., QUECINE, M. C., SILVA, M. C. P. E., AZEVEDO, J. L., MATSUMURA, A. T. S. Biocontrol of *Botrytis cinerea* and *Calonectria gracilis* by eucalypts growth promoters *Bacillus* spp. **Microbial Pathogenesis**, 2018.

PELTIER, A. J., GRAU, C. R. The influence of light on relationships between Sclerotinia stem rot of soybean in field and controlled environments. **Plant Disease**. V.92, p.1510–1514, 2008.

PICARELLI, M. A. S. C., GOBATTO, D., PATRÍCIO, F., RIVAS, E. B., COLARICCIO, A. Vírus que infectam fungos fitopatogênicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.84, e0162016-e0162016, 2017.

RAUT, J.S. e KARUPPAYIL, S.M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**. V. 62, p. 250-264, 2014.

RAWAL, K., & KEHARIA, H. Prevention of Fungal Contamination in Plant Tissue Culture Using Cyclic Lipopeptides Secreted by *Bacillus amyloliquefaciens* AB30a. **Plant Tissue Culture and Biotechnology**. v.29, n.1, p.111-119, 2019.

RODRIGUES, M. A. T. **Classificação de fungicidas de acordo com o mecanismo de ação proposto pelo FRAC**. 2006. 249f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu. 2006.

RUCKERT, C., BLOM, J., CHEN, X.H., REVA, O., BORRISS, R. Genome sequence of *Bacillus amyloliquefaciens* type strain DSM7T reveals differences to plant associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. **Journal of Biotechnology**. V.155, p.78-85, 2011.

DOS SANTOS, R. R., DE MORAIS, T. P. and JULIATTI, F. C. Detection of *Sclerotinia sclerotiorum* on soybean and common bean seeds by modified neon-s test. **Bioscience Journal**, 34(1).v. 34, n. 1, p. 67-74, 2018.

SAGAR, S., DWIVEDI, A., YADAV, S., TRIPATHI, M., KAISTHA, S. D. Hexavalent chromium reduction and plant growth promotion by *Staphylococcus arlettae* Strain Cr11. **Chemosphere**, v.86, p.847–852, 2012.

SARWAR, M.; KREMER, R. J. Determination of bacterially derived auxins using a microplate method. **Letters in Applied Microbiology**. v.20, p.202-205, 1995.

SCHWANTES-CEZARIO, N., MEDEIROS, L. P., DE OLIVEIRA, A. G., NAKAZATO, G.; KOBAYASHI, R. K. T., TORALLES, B. M. Bioprecipitation of calcium carbonate induced by *Bacillus subtilis* isolated in Brazil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.123, p 200-205, 2017.

SESKAR, M., SHULAEV, V.; RASKIN, I. Endogenous methyl salicylate in pathogen-inoculated tobacco plants. **Plant Physiology**, v.116, n.1, p.387-392, 1998.

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

SHIM, J., KIM, J. W., SHEA, P. J., & OH, B. T. IAA production by *Bacillus* sp. JH 2-2 promotes Indian mustard growth in the presence of hexavalent chromium. **Journal of basic microbiology**. v.55, n.5, p.652-658, 2015.

SILVA, J. C. D. **Efeito de isolados de *Fusarium oxysporum* não patogênicos na redução da severidade da Murcha-de-Fusário do tomateiro**. Tese de Mestrado em agronomia, Botucatu – SP: UNESP, 2010.

SILVA, L. H. C. P., CAMPOS, H. D, SILVA, J. R. C. Manejo do mofo branco da soja. In: SILVA, L. H. C. P., CAMPOS, H. D., SILVA, J. R. C. (Ed.). Manejo fitossanitário de cultivos agroenergéticos. **Lavras: UFLA**, p.205-214, 2010.

SILVA, T.D. 2012. **Análise do perfil protéico em raiz de tomateiro submetido á inoculação com *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Biotecnologia, Recife, 50pp.

SILVEIRA, A. B. **Isolamento e caracterização de linhagens de *Bacillus* e *Paenibacillus* promotores de crescimento vegetal em lavouras de arroz e trigo do Rio Grande do Sul**. Tese de doutorado em genética e biologia molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008.

SINDIVEG - **Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal**.

Disponível em: <<http://sindiveg.org.br>> Acesso em: 015 jul 2018

SHAFI, J., TIAN, H., JI, M. *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v.31, n.3, p. 446-459, 2017.

SMITH, K. P., HAVEY, M. J., HANDELSMAN, J. Suppression of cottony leak of cucumber with *Bacillus cereus* strain UW85. **Plant Disease**, v.77, p.139-142, 1993.

SOJA, Embrapa. **Tecnologias de produção de soja—região central do Brasil 2012 e 2013**. Embrapa Soja, Londrina, 2011

Squartini, A., Amzil, J., Hamdache, A., Baldan, B., Ezziyani, M. *Bacillus amyloliquefaciens* Enhanced Strawberry Plants Defense Responses, upon Challenge with *Botrytis cinerea*. **Advanced Intelligent Systems for Sustainable Development**. v.1 p.911, 46, 2019.

STEIN, T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. **Molecular Microbiology**. V.56, n.4, p.845-857, 2005.

SZILAGYI-ZECCHIN, V. J., MÓGOR, Á. F.; RUARO, L., RÖDER, C. Crescimento de mudas de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) estimulado pela bactéria *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42 em cultura orgânica. **Revista de Ciências Agrárias**, v.38, n.1, p.26-33, 2015.

TIAN, Z., CHEN, C., CHEN, K., LIU, P., FAN, Q., ZHAO, J., LONG, C. A. Biocontrol and the mechanisms of *Bacillus* sp. w176 against postharvest green mold in citrus. **Postharvest Biology and Technology**, v.159, p.111022, 2020.

TAN, T., ZHU, J., SHEN, A., LI, J., YU, Y., ZHANG, M., ZHAO, M., LI, Z., CHEN, J., GAO, C., CHENG, Y. Isolation and identification of a *Bacillus subtilis* HZ-72 exhibiting biocontrol activity against flax seedling blight. **European journal of plant pathology**, v.153, n.3, p.825-836., 2019.

TERAMOTO, A., MACHADO, T. A., NASCIMENTO, L. M., MEYER, M. C., CUNHA, M. G. Sensibilidade a fungicida de isolados de *Corynespora cassicola* provenientes do estado de Goiás. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, Cuiabá. **Anais**. Brasília: Embrapa, 2012.

TOFOLI, J. G., FERRARI, J. T.; DOMINGUES, R. J., NOGUEIRA, E. M. C. *Botrytis* sp. em espécies hortícolas: hospedeiros, sintomas e manejo. **Biológico, São Paulo**, v.73, n.1, p.11-20, 2011.

TORTORA, M. L., DIAZ-RICCI, J. C., PEDRAZA, R. O. *Azospirillum brasilense* siderophores with antifungal activity against *Colletotrichum acutatum*. **Archives of Microbiology**, v.193, p.275–286, 2011.

VENÂNCIO, W. S, ZAGONEL, J., FURTADO, E. L., SOUZA, N. L. Novos fungicidas. I – Produtos naturais e derivados sintéticos: estrobilurinas e fenilpirroles. In: LUZ, W. C.; FERNANDES, J. M.; PRESTES, A. M.; PICININI, E. C. **Revisão anual de patologia de plantas**. 7. Ed. Passo Fundo, p.103-55, 1999.

ZHAO, H., KIM, Y. K., HUANG, L., XIAO, C. L. Resistance to thiabendazole and baseline sensitivity to fludioxonil and pyrimethanil in *Botrytis cinerea* populations from apple and pear in Washington State. **Post harvest Biological Technology**, v.56, p.12-18, 2010.

ZHANG, D., GAO, T., LI, H., LEI, B., ZHU, B. Identification of antifungal substances secreted by *Bacillus subtilis* Z-14 that suppress *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. **Biocontrol Science and Technology**. v.27, n.2, p. 237-251, 2017.

WENDLAND, A., LOBO JUNIOR, M., de FARIA, J. C. Manual de identificação das principais doenças do feijoeiro-comum. **Embrapa Arroz e Feijão**. Capítulo em livro técnico (INFOTECA-E), 2018.

WENDLAND, A.; MOREIRA, A.S.; BIANCHINI, A.; GIAMPAN, J.S.; LOBO JR., M. (2016). Doenças do feijoeiro. In: AMORIM, L.; RESENDE, J.A.M.; CAMARGO, L.E.A. **Manual de Fitopatologia**, v.2, ed.5, (pp.383-396).

WORDELL FILHO, J. A. et al. Manejo de doenças na cultura do feijão, in: WORDELL FILHO, J.A.; CHIARADIA, L.A.; BALBINOT, A. (Eds.), **Manejo Fitossanitário na Cultura do Feijão**. EPAGRI, Florianópolis, 2013, v. 1, 47 p.

YAHYAZADEH, M., OMIDBAIGI, R., ZARE, R., AND TAHERI, H. Effects of some essential oils on mycelial growth of *Penicillium digitatum* Sacc. **World J. Microbiology and Biotechnology**. V.24, p;1445–1450, 2008. doi: 10.1007/s11274-007-9636-8