



ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE *Xenorhabdus* spp. E *Photorhabdus* sp. CONTRA FUNGOS FITOPATOGÊNICOS

NATHALIE OTOYA MARTINEZ

INSTITUTO BIOLÓGICO

PÓS-GRADUAÇÃO

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE *Xenorhabdus* spp. E *Photorhabdus* sp. CONTRA
FUNGOS FITOPATOGÊNICOS**

Nathalie Otoyá Martínez

Tese apresentado ao Instituto Biológico, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, para obtenção do título de Doutora em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema

Orientador: Dr. Luís Garrigós Leite

Coorientador: Dr. César Junior Bueno

Campinas - SP

2023

Eu **Nathalie Otoy Martinez**, autorizo o Instituto Biológico (IB-APTA), da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, a disponibilizar gratuitamente e sem ressarcimento dos direitos autorais, o presente trabalho acadêmico de minha autoria, no portal, biblioteca digital, catálogo eletrônico ou qualquer outra plataforma eletrônica do IB para fins de leitura, estudo, pesquisa e/ou impressão pela Internet desde que citada a fonte.

Assinatura: _____ Data ___/___/___

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo
Núcleo de Informação e Documentação – IB

Martinez, Nathalie Otoy. Atividade antifúngica de *Xenorhabdus* spp. e *Photorhabdus* sp. contra fungos fitopatogênicos. / Nathalie Otoy Martinez. - Campinas, 2023.

64 p.

doi: 10.31368/PGSSAAA.2023T.NM09

Tese (Doutorado). Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação.

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.

Linha de pesquisa: Sanidade, gestão ambiental e qualidade de alimentos, produtos e processos na produção agropecuária sustentável.

Orientador: Luis Garrigós Leite

Coorientador: César Junior Bueno

Versão do título para o inglês: Antifungal activity of *Xenorhabdus* spp. and *Photorhabdus* sp. against phytopathogenic fungi.

1. Mofo branco 2. Podridão de *Botrytis* 3. Murcha de *Fusarium* 4. Podridão cinzenta de *Macrophomina* 5. Bactérias simbiotes de nematoides entomopatogênicos I. Martinez, Nathalie Otoy II. Leite, Luis Garrigós III.

Instituto Biológico (São Paulo) IV. Título.

IB/Bibl./2023/09

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador **Prof. Dr. Luis Garrigós Leite (IB/CAPSA)** pela orientação e ensinamentos desde o estágio.

Ao meu co-orientador **Prof. Dr. César Júnior Bueno (IB/CAPSA)** pelos ensinamentos e guia nas técnicas de fitopatologia desde o mestrado, e principalmente pela dedicação, disponibilidade e apoio no desenvolvimento do trabalho.

Ao **Prof. Dr. Selçuk Hazir** por me acolher no seu laboratório na Universidade Adnan Menderes, na cidade de Aydin na Turquia. Gratidão pela dedicação, orientação e confiança no tempo que trabalhei nesse laboratório.

À **Dra. Julie Chacon Orozco**, pelos conselhos, a amizade e por ainda ser a minha inspiração como profissional.

Ao **Instituto Biológico** e aos docentes do programa de Pós-graduação pela oportunidade e ensinamentos.

Agradeço à **FAPESP** pelo apoio financeiro processo N° 2019/23702-7, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Aos meus colegas de trabalho no **Laboratório de Animais Invertebrados da Universidade Adnam Menderes**, pelos ensinamentos e pela ajuda altruísta nos experimentos e na vida longe de casa.

Aos meus colegas e amigos do **Laboratório URL de Controle Biológico (IB/CAPSA)**.

À família que eu escolhi no Brasil **Érika, Julie, Fernando e Sarita** pela companhia incondicional e a amizade.

À minha mãe **Neyla Martinez Renals**, que foi a pessoa que mais torceu pela obtenção desse título, dedico este trabalho a você que me fez chegar até onde estou hoje.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

Meus sinceros agradecimentos

RESUMO

OTOYA-MARTINEZ, Nathalie. Atividade antifúngica de *Xenorhabdus* spp. e *Photorhabdus* sp. contra fungos fitopatogênicos. Tese (Doutorado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, 2023.

As bactérias entomopatogênicas *Photorhabdus* e *Xenorhabdus* são fonte de novos compostos antimicrobianos, com potencial nas indústrias farmacêutica e agropecuária. O presente estudo objetivou avaliar a inibição *in vitro* de diferentes fungos fitopatogênicos pela ação de filtrados de bactérias simbiotes de nematoides entomopatogênicos e identificar compostos antifúngicos bioativos produzidos pela bactéria mais eficaz. Além disto, verificar o efeito da bactéria *Xenorhabdus szentirmaii* e seus filtrados armazenados em diferentes temperaturas no controle *in vitro* e *in vivo* do fungo *Sclerotinia sclerotiorum*. A atividade antifúngica *in vitro* de diferentes filtrados de *Xenorhabdus* spp. e *Photorhabdus* sp. foi verificada no crescimento micelial dos isolados dos fungos fitopatogênicos *Botrytis cinereae*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Macrophomina phaseolina* e *Fusarium oxysporum*, através da diluição dos filtrados no meio de cultivo batata dextrose ágar (BDA). Após seleção da bactéria mais eficaz, foram identificados o(s) composto(s) antifúngico(s) bioativo(s) produzido(s), pelo método easyPACId (*easy Promoter Activated Compound Identification*). Avaliou-se a viabilidade da suspensão de *X. szentirmaii* e de seus filtrados na inibição do crescimento micelial de *S. sclerotiorum*, armazenando-os nas temperaturas de 5, 25°C e 35°C por 365 dias. A avaliação foi realizada mensalmente, incorporando os tratamentos no meio BDA e medindo-se o diâmetro de crescimento da colônia de *S. sclerotiorum*. O efeito da suspensão de *X. szentirmaii* e de seus filtrados foi verificado na germinação de sementes de soja, com e sem a inoculação do fungo *S. sclerotiorum*. Os filtrados dos isolados de *X. szentirmaii* e *X. doucetiae* na concentração de 20%, principalmente de *X. szentirmaii*, inibiram com alto percentual de controle ($\geq 85,0\%$) o crescimento micelial dos fungos fitopatogênicos *B. cinerea*, *S. sclerotiorum*, *M. phaseolina* e *F. oxysporum*. A fabclavinas tem alta eficiência de controle micelial dos fungos avaliados, com percentual de inibição $> 70,0\%$. A suspensão de *X. szentirmaii* PAM 25 e seus metabólitos secundários mantêm-se eficientes e viáveis no controle de *S. sclerotiorum*, quando armazenados na temperatura de 5°C, com percentual de controle $\geq 96,0\%$. A suspensão de *X. szentirmaii* PAM 25 e seus metabólitos secundários diluídos a 10% controlaram eficientemente o desenvolvimento de *S. sclerotiorum* em sementes de soja, sendo o percentual de controle acima de 80,0%.

Palavras-chave: Controle, Mofo branco, Podridão de *Botrytis*, Murcha de *Fusarium*, Podridão cinzenta de *Macrophomina*, Bactérias simbiotes de nematoides entomopatogênicos.

ABSTRACT

OTOYA-MARTINEZ, Nathalie. Antifungal activity of *Xenorhabdus* spp. and *Photorhabdus* sp. against phytopathogenic fungi. Thesis (PhD in Health, Food and Environmental Safety in Agribusiness) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, 2023.

The entomopathogenic bacteria *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* are source of new antimicrobial compounds, with potential in the pharmaceutical and agricultural industries. The present study aimed to evaluate the *in vitro* inhibition of different phytopathogenic fungi by the action of *Xenorhabdus* spp. and *Photorhabdus* sp. cell-free supernatants (CFS) and to identify bioactive antifungal compounds produced by the most effective bacteria. Furthermore, to verify the shelf-life of antifungal metabolite-containing CFS and bacterial growth culture (BGC) of *X. szentirmaii* stored at different temperatures against *S. sclerotiorum* and to assess the *X. szentirmaii* BGC as well as their CFS on the protection of soybean seeds against *S. sclerotiorum*. The *in vitro* antifungal activity of *Xenorhabdus* spp. and *Photorhabdus* sp. cell-free supernatants against *Neofusicoccum parvum* on agar medium was verified against the mycelial growth of the phytopathogenic fungi *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Macrophomina phaseolina* and *Fusarium oxysporum*, through the incorporation of CFS in potato dextrose agar (PDA) medium. After selecting the most effective bacteria, the bioactive antifungal compound(s) produced were identified using the easyPACId (easy Promoter Activated Compound Identification) method. The shelf-life of the bacterial growth culture and CFS containing secondary metabolites of *X. szentirmaii* was evaluated against *S. sclerotiorum*, by storing them at 5, 25 and 35°C for 365 days. The assessment was carried out monthly, by incorporating in PDA medium and measuring the colony growth diameter. The CFS and bacterial growth culture of *X. szentirmaii* was tested to control *S. sclerotiorum* on soybean seeds. The CFS of *X. szentirmaii* and *X. doucetiae* at 20%, has a great inhibition of phytopathogenic fungi *B. cinerea*, *S. sclerotiorum*, *M. phaseolina* and *F. oxysporum* ($\geq 85.0\%$). The fabclavins was effective against mycelial growth of the fungi assessed ($> 70.0\%$). The bacterial growth culture and CFS of *X. szentirmaii* PAM 25 remain efficient and viable against *S. sclerotiorum*, when stored at 5°C ($\geq 96.0\%$). The bacterial growth culture and CFS of *X. szentirmaii* PAM 25 diluted at 10%, efficiently controlled the development of *S. sclerotiorum* in soybean seeds, with the control percentage being above 80.0%.

Keywords: Control, White mold, *Botrytis* rot, *Fusarium* wilt, *Macrophomina* gray rot, Entomopathogenic nematodes symbiotic bacteria.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Escala diagramática (GARCIA; JULIATTI, 2012) modificada para avaliar a severidade da doença causada por *Sclerotinia sclerotiorum* em folhas de soja cultivar BMX Potência - RR.....33
- Figura 2.** Atividade dos filtrados livre de células das bactérias simbiotes de nematoide entomopatogênico nas concentrações 5%, 10% e 20%, sobre fungos fitopatogênicos. A. *Sclerotinia sclerotiorum*. B. *Botrytis cinerea*. C. *Macrophomina phaseolina*. D. *Fusarium oxysporum*. X. n: *Xenorhabdus nematophila*. P. k: *Photorhabdus kayaii*. X. d: *Xenorhabdus doucetiae*. X. sz: *Xenorhabdus szentirmaii* DSMZ 16338. PAM 25: *Xenorhabdus szentirmaii* PAM 25.37
- Figura 3.** Atividade dos filtrados livres de células de cada metabolito secundário produzido pela cepa *Xenorhabdus szentirmaii* Δ hfq, sobre fungos fitopatogênicos. A. *Sclerotinia sclerotiorum*; B. *Botrytis cinerea*; C. *Macrophomina phaseolina*; D. *Fusarium oxysporum*. Controle positivo: isolado *X. szentirmaii* DSMZ 16338 (Wild Type).40
- Figura 4.** Atividade dos filtrados livres de células de cada metabolito secundário produzido pela cepa *Xenorhabdus doucetiae* Δ hfq, sobre fungos fitopatogênicos. A. *Sclerotinia sclerotiorum*; B. *Botrytis cinerea*; C. *Macrophomina phaseolina*; D. *Fusarium oxysporum*. Controle positivo: isolado *X. doucetiae* (Wild Type).....42
- Figura 5.** Folhas de soja apresentando lesão aquosa causada por *Sclerotinia sclerotiorum*, e presença abundante de micélio e escleródios do fungo (setas).44
- Figura 6.** Comportamento do percentual de inibição do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* em meio BDA com metabólitos secundários da bactéria *Xenorhabdus szentirmaii* PAM 25 armazenados em diferentes temperaturas, por até 360 dias. A linha de tendência de cada temperatura está representada por uma cor diferente. CV (%) = 6,90. Os dados referem-se à média de 16 repetições.....45

Figura 7. Percentual de inibição do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* em meio BDA com a suspensão bacteriana de *Xenorhabdus szentirmaii* PAM 25 armazenada em diferentes temperaturas por até 360 dias. A linha de tendência de cada temperatura está representada por uma cor diferente. CV (%) = 8,21. Os dados referem-se à média de 16 repetições.47

Figura 8. Percentual de germinação de sementes de soja tratadas com filtrados de *Xenorhabdus szentirmaii* PAM 25 e com a suspensão da bactéria diluídos ou não a 10%, seguido de inoculação ou não do fungo *Sclerotinia sclerotiorum*. SM: metabolitos secundários. Letras minúsculas fazem referência às comparações entre os tratamentos, através do teste de Tukey a 5% de significância. CV (%) = 8,50. Os dados referem-se à média de 8 repetições.48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Bactérias simbiontes avaliadas com os seus respectivos nematoides entomopatogênicos.	28
Tabela 2. Mutantes de <i>Xenorhabdus szentirmaii</i> e <i>Xenorhabdus doucetiae</i> Δ hfq.	30
Tabela 3. Porcentagem de inibição do crescimento micelial de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> com filtrados de <i>Xenorhabdus szentirmaii</i> PAM 25, armazenados em diferentes temperaturas, por até 360 dias.	45
Tabela 4. Percentual de inibição do crescimento micelial de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> com a suspensão bacteriana de <i>Xenorhabdus szentirmaii</i> PAM 25 armazenada em diferentes temperaturas por até 360 dias.	46

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	14
2.1. Geral	14
2.2. Específicos	14
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3.1. Bactérias <i>Photorhabdus</i> e <i>Xenorhabdus</i>	15
3.2. Ciclo de vida do complexo nematoide entomopatogênico e bactéria simbiote	16
3.3. Metabólitos secundários das bactérias simbiotes de nematoides entomopatogênicos e mecanismo de produção.....	17
3.3.1. Alguns metabólitos secundários importantes produzidos pelas bactérias <i>Xenorhabdus</i> e <i>Photorhabdus</i>	19
3.4. Fungos fitopatogênicos	21
3.4.1. <i>Botrytis cinerea</i>	22
3.4.2. <i>Fusarium oxysporum</i>	23
3.4.3. <i>Macrophomina phaseolina</i> (Tassi) Goid.....	24
3.4.4. <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (Lib.) de Bary	25
4. MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1. Produção de inóculos dos fungos fitopatogênicos	27
4.2. Preparação dos filtrados livres de células das bactérias <i>Xenorhabdus</i> spp. e <i>Photorhabdus</i> sp.....	27
4.3. Inibição dos fungos fitopatogênicos com os filtrados livres de células de <i>Xenorhabdus</i> spp. e <i>Photorhabdus</i> sp.	28
4.4. Identificação dos compostos com atividade antifúngica pelo método easyPACId	29
4.5. Produção dos filtrados livres de células de <i>Xenorhabdus szentirmaii</i> com mutação no promotor em Δhfq e inibição dos fungos fitopatogênicos	31
4.6. Teste de patogenicidade do isolado de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> em soja	32
4.7. Obtenção dos metabólitos secundários de <i>Xenorhabdus szentirmaii</i> PAM 25	33
4.8. Avaliação da viabilidade da bactéria <i>Xenorhabdus szentirmaii</i> PAM 25 e de seus metabólitos secundários.....	33
4.9. Tratamento de sementes de soja com <i>Xenorhabdus szentirmaii</i> PAM25 e seus metabólitos secundários para o controle de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1. Inibição dos fungos fitopatogênicos com os filtrados livres de células de <i>Xenorhabdus</i> spp. e <i>Photorhabdus</i> sp.	35
5.2. Identificação do metabolito secundário produzido por <i>Xenorhabdus szentirmaii</i> Δhfq com ação antifúngica	40

5.3. Identificação do metabolito secundário produzido por <i>Xenorhabdus doucetiae</i> Δ hfq com ação antifúngica	41
5.4. Teste de patogenicidade de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	43
5.5. Viabilidade da bactéria <i>Xenorhabdus szentirmaii</i> PAM 25 e de seus metabolitos secundários.....	44
5.6. Tratamento de sementes de soja com <i>Xenorhabdus szentirmaii</i> PAM25 e seus metabólitos secundários visando o controle de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	48
6. CONCLUSÕES	50
7. REFERÊNCIAS	51

1. INTRODUÇÃO

Os compostos naturais ou metabolitos secundários são importantes no desenvolvimento de novos fármacos e o seu estudo permite o desenvolvimento de novas moléculas com estrutura única, alta atividade e seletividade (NEWMAN; CRAGG, 2012). As fontes mais importantes de compostos naturais na natureza são fungos (BRIAN; HEMMING, 1947; ZHANG et al., 2012), plantas (COWAN, 1999) e bactérias (KIRKUP, 2006; GILLOR; GHAZARYAN, 2007; NEWMANN; CRAGG, 2016).

Muitas espécies de bactérias e fungos produzem metabolitos secundários para competir com outros organismos no mesmo ambiente. Microrganismos que apresentam associação simbiótica possuem maior diversidade de metabolitos secundários e tem um amplo espectro de atividade biológica (PIEL, 2004).

As bactérias entomopatogênicas *Photorhabdus* e *Xenorhabdus* são fonte de novos compostos antimicrobianos. Essas bactérias codificam várias vias Biosintética para a produção de compostos naturais (BODE, 2009; CAI; ZHU; CHEN, 2017; SHI; BODE, 2018) das quais várias delas são conservadas evolutivamente, pois cumprem importantes funções no seu nicho ecológico (SHI et al., 2022).

As bactérias *Photorhabdus* e *Xenorhabdus* têm associação simbiótica com os nematoides entomopatogênicos (NEPs) *Heterorhabditis* e *Steinernema*, respectivamente (BOEMARE, 2002; HAZIR et al., 2004). Quando os nematoides penetram no inseto hospedeiro, liberam a bactéria simbiote na hemolinfa do inseto causando a morte de 24 até 72 horas, dependendo da espécie, pela produção de toxinas e enzimas (GULCU, et al., 2017; SHAPIRO-ILAN; HAZIR; GLASER, 2020).

Xenorhabdus e *Photorhabdus* produzem uma variedade de produtos naturais que tem atividade antimicrobiana para proteger o cadáver do nematoide infectado de microrganismos oportunistas (bactéria, fungos, protozoários e vírus) (CHASTON et al., 2011; GOODRICH-BLAIR; CLARKE, 2007; SHI; BODE, 2018).

Os microrganismos fitopatogênicos são aqueles que podem habitar o solo, sob os tecidos vegetais, no interior dos tecidos vegetais, ou nos restos vegetais. Os mecanismos de ação dos microrganismos fitopatogênicos funcionam de acordo com o estado fisiológico da planta, o estágio de interação com os hospedeiros e com as condições ambientais (CASELA; FERREIRA, 1998; STROBEL et al., 2004; SCHUMANN; D'ARCY, 2007). Os agentes

causadores de doença de origem fúngica secretam enzimas, toxinas e fitorreguladores, para assim poder absorber nutrientes das células da planta hospedeira, que contribuem ao seu crescimento e sobrevivência. Assim, com o aproveitamento desses nutrientes, a planta começa e exibir os sintomas típicos de colonização fúngica (CALIGIORNE et al., 2010).

Uma das principais ameaças à agricultura no mundo são os fungos fitopatogênicos, pois infectam tecidos de culturas e espécies de árvores economicamente importantes, causando perdas de 10% a 30% nas colheitas e mais de US\$ 1 bilhão em perdas econômicas no mundo a cada ano (STRANGE; SCOTT 2005; MARTINS et al. 2018). Portanto, a implementação de métodos de controle de doenças fúngicas eficientes faz-se necessário.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a inibição *in vitro* e *in vivo* de diferentes fungos fitopatogênicos pela ação de filtrados de bactérias simbiotes de NEPs e identificar compostos antifúngicos bioativos produzidos pela bactéria mais eficaz.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Avaliar a inibição *in vitro* de diferentes fungos fitopatogênicos pela ação de filtrados de bactérias simbiotes de nematoides entomopatogênicos e identificar compostos antifúngicos bioativos produzidos pela bactéria mais eficaz.

2.2. Específicos

Avaliar a atividade antifúngica *in vitro* de diferentes filtrados de *Xenorhabdus* spp. e *Photorhabdus* sp. contra vários isolados de fungos fitopatogênicos.

Identificar o(s) composto(s) antifúngico(s) bioativo(s) produzido(s) pela bactéria mais eficaz, pelo uso do método easyPACId (*easy Promoter Activated Compound Identification*).

Avaliar a viabilidade de *Xenorhabdus szentirmaii* e de seu filtrado, visando inibir o crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum*.

Avaliar o efeito de *X. szentirmaii* e de seu filtrado na germinação de sementes de soja, visando controlar a ação do fungo *S. sclerotiorum*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Bactérias *Photorhabdus* e *Xenorhabdus*

Photorhabdus e *Xenorhabdus* são bactérias simbiontes dos nematoides entomopatogênicos (NEPs) *Heterorhabditis* e *Steinernema*, respectivamente (BOEMARE, 2002). Até agora, não se encontraram formas de vida livre no solo, ou na água dessas bactérias (FORST et al., 1997). Os dois gêneros são bacilos Gram-negativos com flagelos peritricos e pertencem à família Morganellaceae (ADEOLU et al., 2016).

Xenorhabdus e *Photorhabdus* podem ser diferenciadas facilmente através do teste de catalase, pois *Xenorhabdus* é catalase negativo e *Photorhabdus* é positivo. Além disso, *Photorhabdus* é a única bactéria terrestre com bioluminescência (HYRŠL et al., 2004). A temperatura ótima de crescimento de *Photorhabdus* e *Xenorhabdus* é de 28 a 30°C (FORST et al., 1997), e podem ser facilmente cultivadas *in vitro* e *in vivo*, em laboratório (CLARKE, 2008).

Xenorhabdus e *Photorhabdus* são bactérias pleomórficas, ou seja, têm variação de fase, de fase primária (ativa) para fase secundária (inativa). As bactérias estão na fase primária quando isoladas dos juvenis infectantes. No entanto, observou-se que transitam para a fase secundária quando são cultivadas por muito tempo ou quando estão em ambientes inadequados para a reprodução e desenvolvimento (HAN; EHLERS, 2001; ECKSTEIN; HEERMANN, 2019).

Na fase primária, a bactéria apresenta flagelos peritricos, grandes inclusões paracristalinas no citoplasma, colônias que absorvem o corante Azul de Bromotimol e reduzem o Cloreto de Trifenil-tetrazolio em placas de meio NBTA (ENSIGN et al., 2002).

Na fase secundária, as bactérias não possuem flagelos e perdem a capacidade de absorver o corante no meio NBTA, produzir substâncias antimicrobianas e produzir exoenzimas, ou seja, enquanto os metabólitos primários continuam sendo produzidos, não há produção de metabólitos secundários (MS) (BOEMARE; AKHURST, 2006). Isso ocorre porque os metabólitos primários (proteínas, aminoácidos, enzimas etc.) estão diretamente relacionados ao crescimento, desenvolvimento e reprodução normais, enquanto os MS estão relacionados às funções ecológicas (DEMAIN; FANG, 2000).

O tempo da infecção até o NEP deixar o cadáver do inseto hospedeiro é de 7 a 14 dias. Neste período, a integridade do cadáver se mantém no solo, graças à ação protetora dos MS sintetizados pelas bactérias simbiontes e codificados por diversos clusters de genes. As

bactérias *Xenorhabdus* e *Photorhabdus*, protegem o hospedeiro da ação de outros organismos e microrganismos oportunistas como bactérias, fungos, protozoários e vírus (GOODRICH-BLAIR; CLARKE, 2007; BODE, 2009; CHASTON et al., 2011; SHI; BODE, 2018).

Alguns estudos demonstraram que as espécies *Photorhabdus* e *Xenorhabdus* diferem em termos dos metabólitos secundários que produzem, e mesmo cepas diferentes de uma mesma espécie, podem produzir substâncias diferentes umas das outras (TOBIAS et al., 2017).

Os MS produzidos pelas espécies *Photorhabdus* e *Xenorhabdus* podem ter ação antibacteriana (AKHURST, 1980, 1982; WEBSTER et al., 2002; FURGANI et al., 2008; DONMEZ-OZKAN et al., 2019), antifúngica (CHEN; DUNPHY; WEBSTER, 1994; WEBSTER et al., 2002; SHAPIRO-ILAN; BOCK; HOTCHKISS, 2014; FANG et al., 2014; HAZIR et al., 2016; CIMEN et al., 2021), inseticida (SERGEANT et al., 2006; MONA; ALY, 2009; HINCHLIFFE et al., 2010; VITTA et al., 2018) e antiprotozoária (GRUNDMANN et al. 2014; GULSEN et al., 2022).

3.2. Ciclo de vida do complexo nematoide entomopatogênico e bactéria simbiote

Sendo parasitas obrigatórios de insetos, os NEPs desenvolvem todo o seu ciclo de vida dentro do inseto hospedeiro, embora tenha o estágio juvenil, que apresenta a capacidade de sobreviver fora do inseto hospedeiro, denominado de Juvenil Infectante (JI). Os JIs são juvenis de terceiro estágio, muitas vezes ainda envolvidos pela cutícula do estágio anterior; fecham a cavidade bucal e o ânus, e saem do hospedeiro ao esgotar o alimento na procura de um novo inseto do solo. Neste estágio, levam, no seu interior, células da bactéria simbiote, formando assim o complexo NEP-Bactéria (ALVES, 1998).

Na associação, os NEPs não se alimentam e vivem de reservas lipídicas que armazenaram previamente, podendo sobreviver no solo por longos períodos se as condições não forem favoráveis (ISHIBASHI; KONDO, 1990), e oferecem proteção à bactéria fora do corpo do inseto (ALVES, 1998).

Os JIs carregam as células bacterianas no trato intestinal. *Xenorhabdus* se localiza na vesícula intestinal especializada, denominada receptáculo dos JI do gênero *Steinernema*, enquanto as células de *Photorhabdus* estão distribuídas ao longo do intestino de *Heterorhabditis* (MARTENS; GOODRICH-BLAIR, 2005; CICHE et al., 2008).

Os JIs entram no inseto hospedeiro através das aberturas naturais como boca, anus e espiráculos e penetram no hemocele por ação mecânica e libera as bactérias simbiotes (GARCIA, 2005). Adicionalmente, *Heterorhabditis* pode entrar diretamente nos insetos através do tegumento, pois possui um dente quitinoso que permite a perfuração do exoesqueleto do inseto hospedeiro (WANG; GAUGLER, 1998; FORST; CLARKE, 2002). *Xenorhabdus* é liberada através do anus do nematoide (WOUTS, 1991) e *Photorhabdus* pelo estoma (CICHE; ENSIGN, 2003).

Já no hemocele, a bactéria sintetiza metabólitos que suprimem as respostas imunes do inseto hospedeiro, proteínas inseticidas e compostos que inibem a putrefação ao inibir o crescimento de outros microrganismos (HERBERT; GOODRICH-BLAIR, 2007). O inseto morre em até 48 horas devido à intoxicação e septicemia (KAYA; GAUGLER, 1993; SHAPIRO-ILAN; HAZIR; GLASER, 2020).

O cadáver do inseto fornece nutrição para as bactérias simbiotes, que ao mesmo tempo disponibilizam o tecido digerido do inseto para a alimentação dos NEPs, permitindo o seu desenvolvimento e dando lugar a uma ou mais gerações, dependendo do tamanho do inseto (BODE, 2009; HINCHLIFFE et al., 2010).

Dependendo da espécie de NEP, o ciclo de vida pode ter duração de 6 a 18 dias, em temperaturas de 18°C a 28°C (POINAR, 1990). Cada espécie de NEP tem associação simbiótica com apenas uma espécie de bactéria, contudo uma espécie de *Photorhabdus* ou *Xenorhabdus* pode estar associada a várias espécies de *Heterorhabditis* ou *Steinernema*, respectivamente (BODE, 2009).

Estudos *in vivo* e *in vitro* demonstraram que a presença das bactérias é fundamental para a recuperação de uma quantidade considerável de JIs do cadáver do inseto, ou de meio de cultura (LUNAU et al., 1993; FORST et al., 1997; STRAUCH; EHLERS, 1998).

3.3. Metabólitos secundários das bactérias simbiotes de nematoides entomopatogênicos e mecanismo de produção

Os MS, também conhecidos como produtos naturais, são compostos orgânicos de baixo peso molecular que não estão diretamente relacionados à reprodução, desenvolvimento ou crescimento de um organismo (JOYCE; LANGO; CLARKE, 2011).

Em bactérias, pequenos RNAs não-codificantes (sRNAs) desempenham um papel na regulação pós-transcricional da tradução de proteínas, e estão envolvidos na produção de substâncias estruturadas em proteínas, aminoácidos, metabolismo de ferro e carbono, e virulência (MASSE; GOTTESMAN, 2002; ROMBY; VANDENESCH; WAGNER, 2006).

Os sRNAs podem ser controlados por mecanismos como a tradução de proteínas, a ativação da tradução e alterações na taxa de degradação da transcrição (GOTTESMAN; STORZ, 2011; BOBROVSKYY; VANDERPOOL, 2013). A Hfq (Host Factor I) é uma proteína chaperona de RNA, que auxilia nos mecanismos reguladores que ocorrem após a transcrição do RNA, mediando a interação entre o sRNA e o mRNA alvo (SILVA; LEAL; XAVIER, 2022).

A Hfq é uma proteína altamente conservada em patógenos bacterianos Gram-positivos e Gram-negativos. A ação da Hfq interfere nas respostas ao estresse, virulência e prejuízo no crescimento de diversas bactérias patogênicas (SILVA; LEAL; XAVIER, 2022).

A proteína Hfq além do seu papel no controle de processos celulares, pode se ligar a sRNA, tRNA, mRNA, proteínas e DNA (MOLLER et al., 2002; SOBRERO; VALVERDE, 2012). Se a região *hfq* não está ativa devido à mutação, há atenuação e diminuição da expressão de vários fatores de virulência, desaceleração do crescimento e diminuição da tolerância a condições adversas. (CHAO; VOGEL, 2010; SOBRERO; VALVERDE, 2012).

Os MS são produzidos por Clusters Gênicos Biosintéticos (BGC - *Biosynthetic Gene Clusters*), que são grupos que funcionam juntos para construir uma molécula. Duas das maiores classes de BGCs conhecidos são a policétido sintase (PKS - *Polyketide Synthetases*) e sintetases de peptídeos não ribossomais (NRPS - *Non-Ribosomal Peptide Synthetases*), pois interferem na produção dos antibióticos e antifúngicos mais conhecidos (CRAGG; NEWMAN, 2013; SHARRAR et al., 2020).

As enzimas especializadas NRPSs se caracterizam por possuir domínios de condensação (CD) e adenilação (AD), e as PKSs por conter domínios de cetossintase (KS) e uma variedade de outros domínios enzimáticos (FINKING; MARAHIEL, 2004; WONG; KHOSLA, 2012; SHARRAR et al., 2020). No caso de *Xenorhabdus* e *Photorhabdus*, os MS são sintetizados principalmente no citoplasma pelas PKS e NRPS. Os MS podem ser sintetizados via PKS (Ex. antraquinonas) ou via NRPS (Ex. xenematídeos), ou na presença das duas (xenocumacinas e fabclavinas) (CANE; WALSH, 1999; FUCHS et al., 2014).

A funcionalização das enzimas PKS, NRPS e Ácido Graxo Sintase (FAS - Fatty Acid Synthetase) se deve ao efeito catalítico de uma enzima denominada 4'-fosfopanteteinil transferase (PPTase – Phosphopantetheinyl Transferase) (BELD et al., 2014). A enzima PPTase desempenha um papel importante no metabolismo primário e secundário em eucariotas, procariotas e arqueias (LAMBALOT et al., 1996; BELD et al., 2014). A PPTase cumpre essa função, catalisando a transferência do grupo proteico 4'-fosfopanteteína (PPT) da coenzima A para um resíduo de serina conservado (LAMBALOT et al., 1996; BELD et al., 2014).

Estudos mostraram que devido à mutação na região do gene que codifica a PPTase, a produção de antibióticos em espécies de *P. luminescens* cessa e a relação mutualística entre seu nematoide hospedeiro é interrompida (CICHE et al., 2001).

Até o momento, foi isolada uma grande variedade de MS estruturalmente diferentes de *Xenorhabdus* e *Photorhabdus*, com efeitos antibacterianos, inseticidas, nematicidas, antifúngicos e citotóxicos. É mais fácil detectar novos compostos em espécies cujos genomas foram totalmente elucidados. Quando os genomas dessas espécies são estudados em detalhe, os agrupamentos de genes responsáveis pelos MS podem ser revelados.

3.3.1. Alguns metabólitos secundários importantes produzidos pelas bactérias *Xenorhabdus* e *Photorhabdus*

Nos últimos 30 anos, mais de 15 grupos de MS de estrutura e biodiversidade únicas foram isolados de *Photorhabdus* e *Xenorhabdus* (BRACHMANN; SCHWÄR; BODE, 2008). Os primeiros MS identificados foram 4 compostos do grupo estilbeno produzidos por *Photorhabdus*, também conhecidos por serem sintetizados por plantas (PAUL et al., 1981). Alguns estilbenos podem estar envolvidos na relação mutualística com os nematoides, ou ter efeito antibacteriano (JOYCE et al., 2008; JOYCE; LANGO; CLARKE., 2011).

Outro grupo de MS produzidos por *Photorhabdus* são as antraquinonas (RICHARDSON; SCHMIDT; NEALSON, 1988). Esta substância é geralmente produzida por plantas, porém *Photorhabdus* é o único gênero produtor de antraquinonas dentre as bactérias Gram-negativas. A função das antraquinonas na bactéria *Photorhabdus* ainda não foi totalmente esclarecida, tinha-se a hipótese do efeito repelente para pássaros e formigas por não se alimentarem de cadáveres infectados (FENTON et al., 2011), porém no estudo de Cimen (2023) foi avaliada uma cepa mutante superprodutora de antraquinona e demonstrou-se que esses organismos necrotróficos não são afetados por esse MS. Assim, é necessário o desenvolvimento de novos estudos para determinar a função dessa molécula no complexo NEP-bactéria.

No entanto, o ácido transcinâmico (TCA) (BOCK et al., 2014) e os derivados de estilbeno (JOYCE et al., 2008; SHI et al., 2017) sintetizados por *Photorhabdus* spp. apresentam altos efeitos antifúngicos.

O TCA é um ácido orgânico encontrado em plantas como canela, erva-doce e romã (CLIFFORD, 1999; GUZMAN, 2014). É um composto amplamente utilizado nas áreas de agricultura, alimentos e medicina, pois possui propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes, anticancerígenas, neuroprotetoras, antimicrobianas e antidiabéticas (CLIFFORD, 1999; GUZMAN, 2014; RUWIZHI; ADERIBIGBE, 2020). Além disso, as proteínas PirA e PirB (AHANTARIG et al., 2009) e do complexo de toxina a (tca) (BOWEN; ENSIGN, 1998), produzidas por *Photorhabdus* apresentam propriedades inseticidas (AHN et al., 2013).

Os MS identificados de espécies pertencentes ao gênero *Xenorhabdus* também apresentam uma ampla variedade. A benzilidenoacetona, isolada de *Xenorhabdus nematophila*, é uma substância pequena e resistente ao calor que tem sido usada como aditivo nas indústrias cosmética e de alimentos. Esta molécula foi reportada com bioatividade contra algumas bactérias fitopatogênicas Gram-negativas (JI et al., 2004). A nematofina, também produzida por *X. nematophila*, tem efeitos antibacterianos e antifúngicos, inclusive contra espécies de *Staphylococcus aureus* resistentes a antibióticos (LI; CHEN; WEBSTER, 1997a, 1997b).

Os derivados de indol e as xenorhabdinas são co-sintetizados por *X. bovienii* e *X. nematophila* (SUNDAR; CHANG, 1993). Os derivados de indol tem efeito antibacteriano e o seu mecanismo de ação é inibindo a síntese de RNA (SEO et al., 2012). Além disso, possuem bioatividade contra fungos patogênicos de importância na agricultura e na medicina (SUNDAR; CHANG, 1993; LI et al., 1995). No entanto, *X. bovienii* é conhecido por produzir xenoróxidos com atividade antifúngica, antibacteriana e inseticida (MCINERNEY et al., 1991a).

Outro MS produzido por *Xenorhabdus* são as fenetilamidas, coproduzidas por *X. nematophila* e *X. doucetiae* e reportadas por apresentarem atividade citotóxica contra linhagens de células cancerígenas humanas (PAIK et al., 2001). Essas duas espécies também produzem as xenocoumacinas, que são antibióticos de amplo espectro. Têm estudos reportando que os derivados da xenocoumacina 1 (Xne1) e da xenocoumacina 2 (Xne2) podem inibir muitas bactérias Gram-positivas e fungos (MCINERNEY et al., 1991b; YANG et al., 2011; GUO et al., 2017).

As fabclavinas, outro grupo importante de MS, foram isoladas e identificadas das espécies *X. budapestensis* e *X. szentirmaii* em 2014 por Fuchs et al. Ao mesmo tempo, o cluster

de genes de biossíntese de 50 kb responsável pela síntese deste grupo de MS, também foi identificado (FUCHS et al., 2014). As fabclavinas apresentam atividade de amplo espectro contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos e protozoários, por esse motivo foram desenvolvidos estudos intensivos com esta substância nos últimos anos (FUCHS et al., 2014; DONMEZ-OZKAN et al., 2019; CIMEN et al., 2021).

As fabclavinas são híbridos de hexapeptídeos-policetídeos sintetizados via NRPS e PKS, e conectados a uma porção poliamino incomum derivado de ácido graxo poli-insaturado sintase (PUFA) (FUCHS et al., 2014). Foram descritas fabclavinas longas e curtas. Nas fabclavinas curtas, a biossíntese começa diretamente com a segunda enzima NRPS, FeII, resultando em um dipeptídeo, em vez de um hexapeptídeo (WENSKI et al., 2019).

As fabclavinas são estruturalmente semelhantes às (pré) zeaminas produzidas pelas bactérias *Serratia plymuthica* e *Dickeya zea* (MASSCHELEIN et al., 2013; ZHOU et al., 2011). No entanto, análises de bioinformática nos genomas de *Xenorhabdus* e *Photorhabdus* revelaram que a produção de fabclavinas ou compostos semelhantes pode ser comum entre espécies desses gêneros (WENSKI et al., 2019; TOBIAS et al., 2017).

3.4. Fungos fitopatogênicos

Os microrganismos fitopatogênicos são aqueles que podem habitar o solo, sob os tecidos vegetais, no interior dos tecidos vegetais, ou nos restos vegetais. Os mecanismos de ação dos microrganismos fitopatogênicos funcionam de acordo com o estado fisiológico da planta, o estágio de interação com os hospedeiros e com as condições ambientais (CASELA; FERREIRA, 1998; STROBEL et al., 2004; SCHUMANN; D'ARCY, 2007).

Os agentes causadores de doenças de origem fúngica secretam enzimas, toxinas e fitorreguladores para poder absorber nutrientes das células da planta hospedeira que contribuem ao seu crescimento e sobrevivência. Assim, com o aproveitamento desses nutrientes, a planta começa a exibir os sintomas típicos de colonização fúngica (CALIGIORNE et al., 2010).

A maioria das mais de 100.000 espécies de fungos conhecidas são estritamente saprófitas, no entanto, mais de 10.000 espécies de fungos podem causar doenças nas plantas e são conhecidos como fungos fitopatogênicos. Alguns fungos conhecidos como parasitas obrigatórios ou biotróficos podem crescer e se multiplicar, permanecendo durante todo o seu ciclo de vida em associação com as plantas hospedeiras (AGRIOS, 2005).

Outros, conhecidos como parasitas não obrigatórios, requerem uma planta hospedeira durante parte do seu ciclo de vida, estes podem ser saprófitos facultativos ou parasitas facultativos, como é o caso da maioria dos fungos fitopatogênicos habitantes do solo (AGRIOS, 2005).

3.4.1. *Botrytis cinerea*

Botrytis cinerea é um fungo fitopatogênico pertencente ao Filo Ascomycota, Subfilo Pezizomycotina, Classe Leotiomycetes. É o agente causal do mofo cinzento e pode infectar uma grande variedade de hospedeiros, dentre frutas, vegetais e ornamentais (FILLINGER; ELAD, 2016; SAITO et al. 2016). Esse fungo caracteriza-se por ser necrotrófico, ou seja, pode desenvolver-se em restos culturais (VELOSO; VAN KAN, 2018).

O fungo *B. cinerea* pode ser encontrado no mundo inteiro e causa doenças em mais de 1000 espécies de plantas, incluindo culturas importantes, levando a danos econômicos que excedem 1 bilhão de euros por ano (VELOSO; VAN KAN, 2018). A idade e a aptidão da planta, bem como a umidade e a temperatura, desempenham papéis cruciais no desenvolvimento da doença (VELOSO; VAN KAN, 2018).

O ciclo de vida de *B. cinerea* inclui micélio vegetativo, macroconídios para dispersão, escleródios como estrutura de resistência, além disso, o teleomorfo *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) produz microconídios (gametas masculinos) e apotécios (corpos de frutificação) com ascósporos como estruturas sexuais (WILLIAMSON et al., 2007; SCHUMACHER, 2017).

Segundo Williamson et al., (2007), o mofo cinzento é difícil de controlar pois tem uma variedade de modos de ataque ao hospedeiro, diversos hospedeiros e pode sobreviver como micélio e/ou conídios ou em restos de cultura por longos períodos como escleródios. Portanto, faz-se necessária uma compreensão mais detalhada da interação patógeno hospedeiro, do microambiente do fungo, os outros fungos que habitam ele e a presença de outros fungos no ambiente (WILLIAMSON, et al. 2007).

Chen, Dunphy e Webster (1994) avaliaram a inibição *in vitro* de *B. cinerea* e outros fungos fitopatógenos, com os filtrados das bactérias simbiotes de nematoides *Xenorhabdus nematophila*, *Xenorhabdus bovienii* e *Photorhabdus luminescens*, e obtiveram 100% de inibição de todos os fungos avaliados.

Os autores Li et al. (1995) e Chen et al. (1996) testaram o filtrado de *X. bovienii* e observaram também que houve 100% de inibição do crescimento micelial, da germinação de conídios e do alongamento do tubo germinativo de *B. cinereae*.

3.4.2. *Fusarium oxysporum*

O fungo *Fusarium oxysporum* pertence ao Filo Ascomycota, Classe Sordariomycetes, Ordem Hypocreales e pode ser encontrado no solo cultivável e não cultivável de praticamente o mundo todo (SUAREZ, 2002; EDEL-HERMANN; LECOMTE, 2019).

O gênero *Fusarium* caracteriza-se por produzir dois tipos de conídios: macroconídio e microconídio. Os macroconídios são multicelulares, septados e em forma de meia-lua, ocorrendo em conidióforos simples ou em esporodóquios, às vezes embutidos em uma substância mucilaginosa. Os microconídios são geralmente unicelulares e podem estar dispostos em cabeças ou cadeias (MAYEA-SILVERIO; PADRON-SOROA, 1983).

A persistência de *F. oxysporum* no solo é resultado da formação de esporos de resistência, os clamidósporos que podem ocorrer em cadeia, terminais ou intercalados (MAYEA-SILVERIO; PADRON-SOROA, 1983).

O fungo *F. oxysporum* possui ampla gama de hospedeiros vegetais, sendo patogênico para plantas perenes e anuais, principalmente plantas terrestres, mas também aquáticas (por exemplo lotus). Esse fungo pode causar murcha ou apodrecimento de raízes e copas em culturas de campo, economicamente importantes como feijão, banana, palmeiras, algodão, soja, dentre outros; muitas hortaliças como melão, cebola e tomate; bem como culturas ornamentais como ciclame, gérbera e orquídeas; e até mesmo em plantas daninhas como vassoura e erva-de-bruxa (EDEL-HERMANN; LECOMTE, 2019). O que pode dificultar o seu controle através de práticas culturais como a rotação de culturas, pois além de sobreviver em outros hospedeiros, o fungo pode sobreviver em resíduos vegetais, como saprófito (VÁSQUEZ-RAMÍREZ; CASTAÑO-ZAPATA, 2017)

A fusariose é a doença causada por *F. oxysporum*, podendo causar na maioria dos casos murcha vascular, e, em alguns casos, podridão. O patógeno penetra nas raízes do hospedeiro até atingir o tecido vascular, subir pelo xilema, resultando no amarelamento progressivo e assim murchando a planta (OLIVAIN; ALABOUVETTE, 1999). Já na podridão, *F. oxysporum* avança nas raízes e nos tecidos corticais, sem atingir o sistema vascular, provocando necrose que culmina no apodrecimento da planta (JARVIS; SHOEMAKER, 1978).

O manejo efetivo da fusariose só se consegue através do estabelecimento de diferentes práticas de controle culturais, físicas, químicas e biológicas. Tem-se demonstrado que o controle mais efetivo da doença é através da aplicação de produtos químicos, que causam problemas de resistência no fungo, intoxicação nos trabalhadores e contaminação do meio ambiente. Portanto pesquisas de alternativas de controle, como o controle biológico são necessárias (VÁSQUEZ-RAMÍREZ; CASTAÑO-ZAPATA, 2017).

O estudo de Lalramchuani et al. (2020), avaliou a inibição de *F. oxysporum* com três espécies de bactérias simbiotes de NEPs, *X. vietnamensis*, *X. stockiae* e *P. luminescens akhurstii* e encontraram que as bactérias causaram de 50% a 76% de inibição do crescimento micelial após 48 horas.

Além disso, existem algumas pesquisas da inibição micelial total ou parcial de *F. oxysporum* com os isolados *Xenorhabdus* sp. RIO, *Xenorhabdus* sp. SEC 6, *X. szentirmaii*, *X. khoisanae*, *X. nematophila*, *X. kayaii*, *P. laumondi* e *P. luminescens* (ISAACSON; WEBSTER, 2002; VANITHA et al. 2010; HAZIR et al. 2017; CIMEN et al., 2021; ALFORJA et al. 2021).

3.4.3. *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid.

O fungo *Macrophomina phaseolina* é o agente causal da podridão de carvão ou podridão cinzenta do caule, uma doença que afeta principalmente as raízes e o caule (ALMEIDA et al., 2014). É um fungo muito comum em locais de clima quente como no México, Venezuela, Colômbia, Bolívia, Kenya, Sudan, Tanzânia, Zâmbia, Etiópia, Egito e Brasil (ABAWI; PASTOR-CORRALES, 1990).

O patógeno *M. phaseolina* é necrotrófico e pode infectar mais de 500 espécies vegetais (MIHAIL, 1989), como cana-de-açúcar (LEYVA-MIR et al., 2015), soja, milho, sorgo, amendoim, algodão, girassol, dentre outras (ALMEIDA et al., 2014).

M. phaseolina pertence ao Filo Ascomycota, Classe Coelomycetes, Ordem Sphaeropsidales, Família Botryosphaeriaceae (KHAN, 2007; MYCOBANK, 2023). Segundo Khan (2007), *M. phaseolina* pode ser encontrado comumente no solo, nas sementes e nos restos culturais, dificultando assim o seu controle, pois pode sobreviver e se disseminar através da produção de microescleródios que podem permanecer viáveis de 2 a 15 anos, dependendo das condições meio ambientais (BAIRD; WATSON; SCRUGGS, 2003; VASEBI; SAFAIE; ALIZADEH, 2013). Os microescleródios são constituídos a partir do micélio e a sua viabilidade no campo pode diminuir com baixa relação C:N, baixa densidade do solo e concentração de oxigênio menor que 16% (ALMEIDA et al. 2014).

No Brasil, tem registro de microescleródios de *M. phaseolina* na mata nativa, ou seja, o fungo faz parte do ecossistema (ALMEIDA et al. 2014). A podridão cinzenta do caule ocorre principalmente nas regiões Centro-oeste e Nordeste do País. Nesses locais, as lavouras são expostas a altas temperaturas e estresse hídrico, condições que favorecem a ocorrência da doença (CARDOSO, 1994; WENDLAND et al., 2018).

Em sementes de feijoeiro, o fungo pode causar damping-off de pré e pós-emergência. Em plântulas, o fungo causa cancras deprimidos e pretos, antes ou logo após a sua emergência. No caule e na base dos cotilédones, o fungo causa lesões pequenas, pretas, deprimidas, algumas vezes irregulares. Com o avanço da doença, a lesão expande para o hipocótilo e atinge o pecíolo das folhas primárias. O caule fica todo envolvido por lesões. Algumas vezes anéis concêntricos ocorrem dentro dos cancras. Isso acarreta o tombamento das plantas. Há formação de microescleródios negros nos tecidos doentes. Algumas vezes, o fungo produz grande quantidade de picnídios pretos nos caules infectados. O desenvolvimento da doença é frequente em um lado da planta, resultando na queda e morte da folha primária e no amarelamento da folha trifoliada correspondente ao lado afetado (ZAMBOLIM; CHAVES, 1978; SONGA et al., 1997; CARDOSO, 1994).

Por ser um fungo extremamente polífago, capaz de infectar mais de 500 espécies de plantas (BOLAND; HALL, 1994), e possuir capacidade de produzir microescleródios capazes de permanecer viáveis no solo por muitos anos, sua erradicação em áreas contaminadas torna-se praticamente impossível (DHINGRA; SINCLAIR, 1978).

Segundo Almeida et al. (2014), para o controle desse fungo recomenda-se o uso de cultivares com maior tolerância à seca e/ou altas temperaturas para assim manter a incidência e severidade da podridão de carvão em níveis baixos. O controle químico é o mais comumente empregado, porém há estudos de controle biológico com o fungo *Trichoderma* sp. e relatos de tratamento de sementes com as bactérias: *Bradyrhizobium japonicum* estirpe USDA 110, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus megaterium* var. *phosphaticum*, *Bacillus cereus*, *Azotobacter chroococcum* e *Azospirillum brasilense* (BAIRD et al. 2003; EL-BAROUGY et al. 2009). Porém não existem relatos do controle desse fungo com bactérias simbiotes de nematoides entomopatogênicos e/ou seus metabolitos secundários.

3.4.4. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary

O fungo *Sclerotinia sclerotiorum* pertence ao Filo Ascomycota, Classe Discomycetes, Ordem Helotiales, Família Sclerotiniaceae (AGRIOS 1997; HAWKSWORTH et al., 1995). *S.*

sclerotiorum é o agente etiológico da doença mofo branco na soja (BERUSKI, 2013), também conhecida como podridão branca da haste da soja, podridão da haste de esclerotinia ou podridão branca de esclerotinia (PURDY, 1979). Porém, *S. sclerotiorum* é patogênico a 78 famílias, 278 gêneros e 408 espécies de plantas, incluindo-se algumas de maior interesse econômico, como soja, feijão, algodão, girassol, tomate, batata e fumo, e plantas daninhas como picão, carrapicho, caruru, mentrasto e vassoura (BOLLAND; HALL, 1994).

Devido à ampla gama de hospedeiros (FERRAZ et al., 2003) e ao hábito necrotrófico (STEADMAN, 1983), que permite a supervivência em restos culturais, *S. sclerotiorum* é considerado como um dos patógenos de plantas mais bem sucedido dificultando assim o seu controle por rotação de culturas (FERRAZ et al., 2003). Além disso, *S. sclerotiorum* produz escleródios, que são estruturas de resistência compostas por uma massa de hifas, comumente arredondadas, e contêm substâncias de reserva que permitem ao fungo sobreviver por períodos de cinco até 11 anos, até que as condições ambientais sejam favoráveis à sua germinação, conservando intacto seu poder patogênico (STEADMAN, 1983; VENNETT, 1998; ROCHA, 2007).

A infecção de *S. sclerotiorum* no tecido da planta depende das condições ambientais como temperatura e umidade do solo, e da disponibilidade de nutrientes no escleródio. A germinação dos escleródios pode ser miceliogênica ou carpogênica (LE TOURNEAU, 1979).

A germinação miceliogênica de *S. sclerotiorum* é caracterizada pelo crescimento de hifas a partir dos escleródios, formados por reprodução assexuada (AGRIOS, 2005). E a germinação carpogênica é caracterizada pela formação de corpos de frutificação denominados de apotécios. A partir destas estruturas, são produzidos milhares de ascósporos, formados por reprodução sexuada, que são liberados para o ambiente, sendo disseminados pelo vento e infectando as plantas hospedeiras (WORKNEH; YANG, 2000; CLARKSON et al., 2003, SILVA, 2013).

O manejo do mofo branco deve ser realizado através da adoção de práticas de medidas de controle integradas, envolvendo o controle químico, biológico e diversas práticas culturais, visando à redução da taxa de progresso do inóculo (escleródios no solo), mantendo assim, um nível abaixo do limiar de dano econômico (GÖRGEN et al., 2009).

Chacon-Orozco et al. (2020), avaliou a inibição de *S. sclerotiorum* com vários isolados de bactérias simbiotes de NEPs, e os resultados mostraram que os filtrados de *X. szentirmaii* causaram inibição micelial de *S. sclerotiorum* >98% e inibição da produção de escleródios; os compostos voláteis causaram 100% de inibição micelial do fungo e germinação dos escleródios.

A cultura da bactéria diluída a 33% permitiu 78,3% da germinação das sementes infetadas com o fungo e 56,6% de desenvolvimento das plantas. Já no estudo de Cimen et al. (2021), onde foram avaliadas várias bactérias simbiotes de NEPs na inibição *in vitro* de vários fungos fitopatogênicos, *X. szentirmaii* e *P. laumondii* inibiram o crescimento micelial de *S. sclerotiorum* $\geq 83\%$.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram realizados nos laboratórios de Controle Biológico de Pragas e de Fitopatologia, ambos localizados no Centro Avançado de Pesquisas em Proteção Plantas e Saúde Animal do Instituto Biológico, em Campinas, São Paulo e no Laboratório de Animais Invertebrados da Universidade Adnan Menderes, na cidade de Aydin, Turquia.

4.1. Produção de inóculos dos fungos fitopatogênicos

Foram avaliados quatro isolados de fungos fitopatogênicos, habitantes do solo: *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* e *Macrophomina phaseolina* obtidos do Departamento de Proteção de Plantas, Faculdade de Agronomia da Universidade Aydin Adnan Menderes na Turquia, e *Sclerotinia sclerotiorum* obtido de soja cultivada em Pilar do Sul – São Paulo, Brasil. O isolado de *S. sclerotiorum* pertence à Coleção Micológica do Laboratório de Fitopatologia do Instituto Biológico, sendo fornecido pela pesquisadora Dra. Silvânia Helena Furlan.

Os fungos foram cultivados em placas de Petri contendo o meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar), mantidas em estufa tipo BOD, a 25°C, durante 7-14 dias, no escuro, até o seu uso. O fungo *S. sclerotiorum* foi cultivado no mesmo meio de cultura, mas mantido na temperatura de 22°C, durante 10 dias, no escuro, para obter inóculo micelial.

4.2. Preparação dos filtrados livres de células das bactérias *Xenorhabdus* spp. e *Photorhabdus* sp.

Para a preparação dos filtrados livres de células das cepas de *Xenorhabdus* e *Photorhabdus*, da coleção de microrganismos do Laboratório de Animais Invertebrados da Universidade Adnan Menderes (Tabela 1), foi repicada uma colônia em fase I de cada bactéria (Tabela 1) no meio de cultura ágar Luria Bertani [triptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L,

NaCl 5g/L, ágar 15 g/L – LB] e incubada em estufa BOD a 28°C por 24 horas. Posteriormente, uma colônia de cada bactéria foi transferida em um Erlenmeyer de 100 mL contendo 10 mL do meio líquido Trypticase de Soja [Caseína 17 g/L, peptona de soja 3 g/L, cloreto de sódio 5 g/L, fosfato de dipotássio 2,5 g/L, dextrose 2,5 g/L – TSB] e incubada a 30 °C, por 24 h, sob agitação constante de 150 rpm.

Após esse período, foi medida a concentração celular no espectrofotômetro ($DO_{600}=1$) e confirmada a fase I das bactérias através do isolamento no meio NBTA ou do teste da catalase. Após, 5 mL da cultura bacteriana foram transferidos para um Erlenmeyer de 1 L, contendo 500 mL do meio TSB (1 mL de cultura / 100 mL de meio), e incubado a 30°C, por 6 dias, sob agitação constante de 150 rpm.

A suspensão bacteriana foi centrifugada a 10000 rpm por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi filtrado em filtro Millipore® de 0,22 µm, para garantir a obtenção de metabólitos secundários livres de células bacterianas. Os filtrados livres de células bacterianas foram armazenados a 4°C por até 2 semanas, ou até o seu uso (CIMEN et al., 2021).

Tabela 1. Bactérias simbiotes avaliadas com os seus respectivos nematoides entomopatogênicos.

Bactéria simbiote	Nematoide	Cepa
<i>Xenorhabdus szentirmaii</i>	<i>Steinernema rarum</i>	(PAM 25 - Brasil)
<i>X. szentirmaii</i>	<i>S. rarum</i>	DSMZ 16338
<i>X. nematophila</i>	<i>S. carpocapsae</i>	ATCC 19061
<i>Xenorhabdus doucetiae</i>	<i>S. diaprepesi</i>	DSMZ 17909
<i>Photorhabdus kayaii</i>	<i>Heterorhabditis</i>	DSMZ 15194
	<i>bacteriophora</i>	

4.3. Inibição dos fungos fitopatogênicos com os filtrados livres de células de *Xenorhabdus* spp. e *Photorhabdus* sp.

Os filtrados bacterianos foram obtidos de acordo com o item 4.2. Os filtrados foram adicionados ao meio de cultura BDA autoclavado e com temperatura de 42-60°C (CHACON-OROZCO et al., 2020; CIMEN et al., 2021), nas concentrações de 5%, 10% e 20% v/v, e vertidos em placas de Petri. Após a solidificação, foi transferido ao meio de cada placa um disco

BDA contendo micélio de 5 mm de cada fungo e incubado a 25 °C no escuro (HAZIR et al., 2016).

Foram estabelecidas dez repetições para cada tratamento. Cada repetição foi representada por uma placa de Petri contendo o meio BDA + 5%, 10% ou 20% v/v dos filtrados de cada bactéria (tratamento) mais um disco de BDA de 5 mm de diâmetro contendo o micélio do fungo. O controle negativo foi representado pelo meio TSB com as mesmas concentrações dos filtrados, e como controle positivo foi o meio BDA mais o fungicida Maxim®XL (princípios ativos Metalaxil-M + Fludioxonil) (1 mL de fungicida / 100 mL de meio).

A medição do diâmetro da colônia foi realizada em dois sentidos perpendiculares, com ajuda de uma régua comum em centímetros. A avaliação foi realizada quando o tratamento controle (TSB) atingiu o diâmetro total da placa. Foi calculada a área da colônia (πr^2), sem incluir a área do disco de micélio. Os dados de área da colônia foram analisados estatisticamente, aplicando-se o teste de Tukey a 5% de probabilidade e foi calculado o percentual de inibição dos fungos restando o percentual de crescimento calculado com os dados de área da colônia. O programa estatístico utilizado foi o SPSS.

O experimento inteiro foi repetido duas vezes.

4.4. Identificação dos compostos com atividade antifúngica pelo método easyPACId

Foram identificados os compostos antifúngicos produzidos por *X. szentirmaii* e por *X. doucetiae* através da abordagem easyPACId (*easy Promoter Activated Compound Identification*), que consistiu na geração de um mutante Δ hfq mostrando quase nenhuma produção de metabólitos secundários (MS). Com base neste mutante, as regiões promotoras nativas de MS BGCs (*Biosynthesis Gene Clusters*) selecionadas foram substituídas pelo promotor pBAD quimicamente induzível através da integração do plasmídeo pCEP-KM (BODE et al. 2015, 2019).

A biossíntese do BGC selecionado pode ser ativada através da adição de L-arabinose, levando a uma (sobre) produção seletiva de uma única classe de MS, permitindo a análise direta da bioatividade do filtrado, correspondente a cada MS em vez da extração de cada composto.

A geração das cepas mutantes de *X. szentirmaii* Δ hfq, *X. szentirmaii* Δ hfq pCEP-KMxy e de *X. doucetiae* foi descrita detalhadamente por Tobias et al. (2017) e Bode et al. (2019), e são mostradas na Tabela 2 junto com o composto produzido por cada isolado.

Tabela 2. Mutantes de *Xenorhabdus szentirmaii* e *Xenorhabdus doucetiae* Δ hfq.

Cepa	Metabolito secundário
<i>X.szentirmaii</i> Δ hfq KS-16	GameXpeptid
<i>X.szentirmaii</i> Δ hfq KS-22	Pyrollizixenamida
<i>X.szentirmaii</i> Δ hfq LP-56	Fabclavine
<i>X.szentirmaii</i> Δ hfq SVS-204	Szentirazine
<i>X.szentirmaii</i> Δ hfq SVS-208	Szentiamida
<i>X.szentirmaii</i> Δ hfq SVS-212	Xenobactine
<i>X.szentirmaii</i> Δ hfq SVS-240	Rhabduscine
<i>X.szentirmaii</i> Δ hfq SVS-247	Rhabdopeptid
<i>X.szentirmaii</i> Δ hfq	-
<i>X.szentirmaii</i> Δ pptase	-
<i>X. doucetiae</i> Δ hfq HBLC-289	Xenorhabdin
<i>X. doucetiae</i> Δ hfq HBLC-290	Tryptamines
<i>X. doucetiae</i> Δ hfq HBLC-86	Xenocoumacin
<i>X. doucetiae</i> Δ hfq HBLC-107	Xenocoumacin

Para a geração das bactérias mutantes através do método easyPACId, foram criados os mutantes Δ hfq e Δ PPTase pela deleção das regiões dos genes Hfq e PPTase. Esses mutantes, que não possuem a região do gene Hfq, não produzem nenhum MS funcional (BODE et al., 2015, 2019; WENSKI et al., 2020). Em seguida, os promotores localizados na frente das regiões gênicas envolvidas na síntese de diferentes MS, foram alterados. O promotor pBAD, que pode ser induzido artificialmente com a substância L-arabinose, foi inserido entre a região promotora induzida naturalmente e o gene relevante. Assim, a produção da substância pela qual a região do gene relevante é responsável foi controlada.

No processo de troca do promotor natural, a primeira região de 300-600 pares de bases da região do gene desejado foi amplificada pelo método de reação em cadeia da polimerase (PCR) e inserida no plasmídeo pCEP. Depois que o plasmídeo foi transferido para a cepa *Escherichia coli* S17-1 2pir (F) pelo método de eletroporação, ele foi transferido para a bactéria

em que a mudança da região promotora era desejada por conjugação (BODE et al., 2015; TOBIAS et al., 2016). Graças ao gene de resistência à canamicina no plasmídeo PCEP, as bactérias que receberam o plasmídeo e, portanto, mudaram sua região promotora podem ser facilmente detectadas usando meios seletivos com antibiótico canamicina adicionado (BODE et al., 2015, 2019).

Como resultado de todos esses processos, a região do promotor natural na bactéria tornou-se disfuncional e um novo promotor, que poderia ser induzível quando preferido, foi adicionado em seu lugar. Durante a produção desse novo isolado de bactéria, ela pode ser ativada pela adição da substância indutora L-arabinose ao meio, e a produção do MS relacionado é maior que a do tipo selvagem (Wild Type). Na ausência de L-arabinose no ambiente, o promotor não funciona e o metabólito secundário pelo qual é responsável não é produzido (BODE et al., 2015). As cepas mutantes modificadas pelo promotor foram obtidas no Germany Mac Planck Institute/Marbug Laboratory.

4.5. Produção dos filtrados livres de células de *Xenorhabdus szentirmaii* e *X. doucetiae* com mutação no promotor em Δ hfq e inibição dos fungos fitopatogênicos

As cepas mutantes foram mantidas no, e desenvolvidas no Germany Mac Planck Institute/Marbug Laboratory. Foram avaliadas 10 cepas mutantes, o induzíveis com L-arabinose e os isolados *X.szentirmaii* Δ hfq e *X.szentirmaii* Δ pptase que não são induzíveis de *X. szentirmaii* Δ hfq pCEP-KM-xy (Tabela 2) que possuem promotores induzíveis para a produção quase exclusiva dos principais antibacterianos e antifúngicos.

Inicialmente, foram cultivadas as cepas mutantes em meio ágar LB suplementado com 50 μ g/ml de concentração final de Canamicina, e as cepas originais, Δ hfq e Δ PPTase, em meio LB sem Canamicina, e posteriormente incubadas a 30 °C por 48 h, pois essas cepas possuem um plasmídeo com o gene de resistência à Canamicina (CIMEN et al., 2021).

Para a pré-cultura foi transferida uma colônia das cepas em 10 mL de meio LB + Canamicina e incubadas a 30°C sob agitação constante de 150 rpm por 24 horas. Posteriormente, as pré-culturas foram inoculadas em 20 mL de meio LB com densidade ótica

(DO₆₀₀) ajustada a 0,1, sendo em seguida incubadas a 30 °C, por 1 hora. Após, as culturas foram induzidas com L-arabinose 0,2%, e incubadas por 72 horas, a 30 °C, sob agitação de 150 rpm (CIMEN et al., 2021).

Para avaliar a inibição dos fungos fitopatogênicos, os filtrados livres de células foram preparados e incorporados no meio BDA à concentração de 20%. O delineamento e repetição foram idênticos ao do item 4.3. Como controles foram avaliadas as cepas original e mutante Δhfq de *X. szentirmaii*, e o controle negativo foi o meio BDA sem adição de filtrado. Os dados da área de crescimento micelial foram analisados aplicando-se o teste de Tukey a 5% de probabilidade. O programa estatístico utilizado foi o SPSS.

4.6. Teste de patogenicidade do isolado de *Sclerotinia sclerotiorum* em soja

A patogenicidade do isolado de *S. sclerotiorum* foi verificada por meio de teste *in vivo* utilizando-se folhas destacadas de plantas de soja, cultivar BMX Potência – RR com 15 dias de plantio. Cada repetição foi representada por uma placa de Petri de plástico de 14 cm de diâmetro, contendo quatro folhas sobre dois discos de papel de filtro umedecidos com água destilada, sendo todo este material autoclavado previamente.

As folhas foram desinfestadas superficialmente por um minuto, em solução de hipoclorito de sódio a 1,5%, seguido de lavagem em água destilada autoclavada e depois secas em papel de filtro estéril. Em seguida, a superfície das folhas foi inoculada com um disco de meio de BDA (0,5 cm) contendo micélio de *S. sclerotiorum* (Item 4.1.). Foram estabelecidas seis repetições. As placas foram incubadas em estufa BOD, a 22 °C, por 8 dias, com fotoperíodo de 12 horas de luz. Foram estabelecidas oito repetições.

Avaliou-se a incidência e a severidade da doença, com auxílio de uma escala diagramática (Figura 1) descrita por Garcia e Juliatti (2012), modificada.

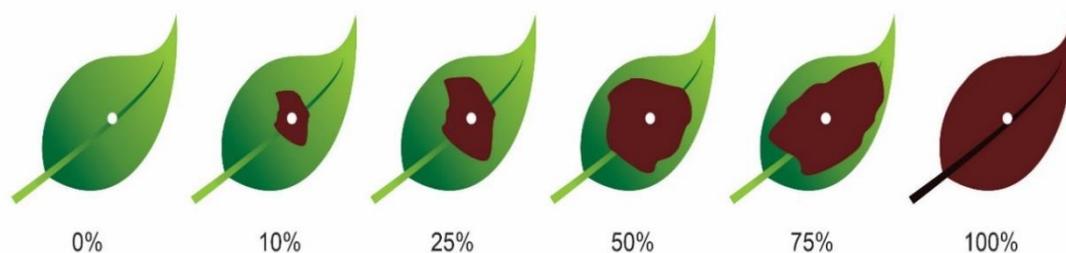


Figura 1. Escala diagramática (GARCIA; JULIATTI, 2012) modificada para avaliar a severidade da doença causada por *Sclerotinia sclerotiorum* em folhas de soja cultivar BMX Potência - RR.

O fungo causa podridão aquosa nas folhas e abundante produção de micélio e escleródios sobre a lesão.

Os escleródios produzidos na superfície das folhas nas diferentes repetições foram extraídos e desinfestados superficialmente, por 30 segundos em solução de álcool a 70%; 1 minuto em solução de hipoclorito de sódio a 1,5%; lavagens em água destilada autoclavada e secagem em papel de filtro estéril. Em seguida, os escleródios foram plaqueados em placas de Petri contendo meio BDA. As placas foram incubadas em estufa BOD, a 22°C, no escuro, até o desenvolvimento de colônias típicas do fungo.

O experimento inteiro foi repetido.

4.7. Obtenção dos metabólitos secundários de *Xenorhabdus szentirmaii* PAM 25

Foi selecionado o isolado brasileiro *X. szentirmaii* PAM 25. Os metabólitos secundários (MS), da bactéria simbiote *X. szentirmaii* PAM 25 foram obtidos de uma colônia em fase I em meio NBTA, multiplicada em frasco Erlenmeyer de 250 mL, contendo o meio TSB, incubado a 27±1°C, por 6 dias, sob agitação de 150 rpm.

Após esse período, a suspensão bacteriana foi transferida para tubos Falcon® de 15 cm³ e centrifugada a 3800 rpm por 2 horas. O sobrenadante foi filtrado em filtro de celulose de 0,22 µm (HAZIR et al., 2016).

4.8. Avaliação da viabilidade da bactéria *Xenorhabdus szentirmaii* PAM 25 e de seus metabólitos secundários

A cultura bacteriana e seus MS foram obtidos de acordo com o item 4.7. Uma alíquota de 25 mL tanto da cultura quanto do MS foi colocada em frascos Schott de 100 mL e

armazenados em três diferentes temperaturas (5°C, 25°C e 35°C). Foi preparado um frasco para cada temperatura e tempo de armazenamento. O conteúdo do frasco foi avaliado nos seguintes tempos: 0, 7, 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 330 e 360 dias.

Em cada tempo, foram avaliados os seguintes tratamentos: 1) BDA + 10% da suspensão bacteriana a 5°C; 2) BDA + 10% da suspensão bacteriana a 25°C; 3) BDA + 10% da suspensão bacteriana a 35°C; 4) BDA + 10% dos MS a 5°C; 5) BDA + 10% dos MS a 25°C; 6) BDA + 10% dos MS a 35°C; 7) BDA + 10% de TSB e 8) BDA. Foram estabelecidas 16 repetições para cada tratamento. Cada repetição foi representada por uma placa de Petri contendo o meio BDA + 10% do tratamento, mais um disco de BDA de 0,5 cm de diâmetro contendo o micélio de *S. sclerotiorum* (item 4.1).

A inibição do fungo pelos tratamentos foi avaliada pela medição do diâmetro da colônia (cm) desenvolvida no meio até o tratamento controle (BDA) atingir o diâmetro a placa. O armazenamento dos frascos foi encerrado quando a colônia do fungo apresentou porcentagem de inibição $\leq 50\%$.

O percentual de inibição do desenvolvimento micelial de *S. sclerotiorum*, de cada tratamento, foi comparado em relação ao tratamento controle, aplicando a seguinte fórmula:

Fórmula: $\frac{D_c - D_t}{D_c} \times 100\%$, sendo D_c e D_t o diâmetro da colônia do tratamento controle e diâmetro da colônia do tratamento, respectivamente (ZHANG et al., 2019).

O teste estatístico para comparar a média dos tratamentos foi o Tukey a 5% de significância. O programa estatístico utilizado foi o SISVAR 5.6.

4.9. Tratamento de sementes de soja com *Xenorhabdus szentirmaii* PAM25 e seus metabólitos secundários para o controle de *Sclerotinia sclerotiorum*

O isolado bacteriano *X. szentirmaii* foi cultivado em Erlenmeyer contendo 300 mL do meio TSB e mantido a 27°C por 6 dias, sob agitação constante de 150 rpm.

A suspensão bacteriana foi centrifugada a 3800 rpm por 2h e filtrada como descrito no item 4.7. Os filtrados e a suspensão bacteriana foram diluídos em água destilada autoclavada até obter uma concentração de 10%, adicionando-se 1% de goma xantana, posteriormente, para revestir as sementes de soja (cultivar BMX Potência - Embrapa). Como controles, foi adicionado 1% de Goma xantana em água destilada autoclavada e no meio TSB, e como controles positivos foi utilizado o fungicida CERTEZA® (56,2 uL/28,1 g de sementes) e o biofungicida TrichoTurbo® (4 ml/Kg de semente).

As sementes revestidas foram colocadas em placas de Petri contendo papel filtro umedecido com água destilada autoclavada. Para os tratamentos na presença do fungo fitopatogênico, no mesmo dia foi colocado em contato com as sementes revestidas um disco de BDA contendo o micélio do fungo *S. sclerotiorum* (com 10 dias de crescimento a 25°C na ausência da luz). As placas foram seladas com filme PVC e mantidas a 25°C, no escuro, durante 7 a 14 dias. Para cada tratamento foram estabelecidas quatro repetições.

A avaliação do ensaio consistiu na contagem do número de sementes germinadas 10 dias após a montagem do experimento. Os dados foram expressos em porcentagem de sementes germinadas.

Os dados de porcentagem de inibição foram transformados em $\arcsen \sqrt{x/100}$, sendo x a porcentagem da repetição de cada tratamento. O teste estatístico para comparar a média dos tratamentos foi o Tukey a 5% de significância. O programa estatístico utilizado foi o SISVAR DEX/UFLA, versão 5.6.

O experimento inteiro foi repetido.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Inibição dos fungos fitopatogênicos com os filtrados livres de células de *Xenorhabdus* spp. e *Photorhabdus* sp.

Os filtrados dos cinco isolados das bactérias simbiotes (Figura 2) apresentaram grandes variações nas porcentagens de inibição do crescimento micelial dos fungos, tendo os filtrados de *X. szentirmaii* PAM 25, *X. szentirmaii* DSMZ 16338 e *X. doucetiae* a 20% proporcionado percentuais de inibição dos fungos acima de 85% e diferindo dos filtrados dos outros isolados (Figura 2).

Nos estudos de Hazir et al. (2016), Chacon-Orozco et al. (2020), Cimen et al. (2021) e Otoyá-Martínez et al. (2023) também foi avaliada *in vitro* a inibição de fungos fitopatogênicos *Fusicladium carpophilum*, *F. effusum*, *Monilinia fructicola*, *Glomerella cingulata*, *Armillaria tabescens*, *Cryphonectria parasitica*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Neofusicoccum parvum*, usando filtrados livres de células de diferentes espécies de *Xenorhabdus* spp. e *Photorhabdus* spp., e constataram que isolados do gênero *Xenorhabdus* exibiram alta taxa de inibição do micélio vegetativo dos fungos, comparado aos isolados de *Photorhabdus* spp.

Os filtrados das bactérias avaliadas e o fungicida (Metalaxil-M + Fludioxonil) inibiram o crescimento micelial de *S. sclerotiorum* (Fig. 2A) após quatro dias de crescimento. Na concentração de 20%, não houve diferenças nas porcentagens de inibição do fungo entre filtrados das bactérias *X. szentirmaii* DSMZ 16338 (89%), *X. szentirmaii* PAM 25 (87%) e *X. doucetiae* (91,08%) ($F = 559.14$; $df = 6, 133$; $P < 0.0001$).

Os filtrados de *Photorhabdus kayaii* e *X. nematophila* inibiram o crescimento de *S. sclerotiorum* abaixo de 30% e não diferiram entre si, mas diferiram dos demais tratamentos. Já à 10% de concentração, os tratamentos exibiram diferenças entre eles ($F = 429.56$; $df = 6, 133$; $P < 0.0001$) e os filtrados dos isolados *X. szentirmaii* DSMZ 16338 e *X. szentirmaii* PAM 25 proporcionaram maior inibição do crescimento de *S. sclerotiorum*, com percentuais de controle de 72,60% e 83,87%, respectivamente. Sendo melhor o isolado *X. szentirmaii* PAM 25 seguido de *X. szentirmaii* DSMZ 16338.

Na concentração de 5%, nenhum dos filtrados inibiu o crescimento do patógeno acima de 30,54%, porém houve variação entre alguns isolados ($F = 317.62$; $df = 6, 133$; $P < 0.0001$) (Fig. 2A).

Os resultados do presente estudo são coerentes com os obtidos por Chacon-Orozco et al. (2020), onde foi avaliada a inibição de *S. sclerotiorum* com vários isolados de bactérias simbiontes de NEPs. Chacon-Orozco et al. (2020) demonstraram que os filtrados de *X. szentirmaii* causaram a maior inibição micelial de *S. sclerotiorum* (83%), destacando-se *X. szentirmaii* PAM 25 assim como no presente estudo. No estudo de Cimen et al. (2021), onde foi avaliada a inibição *in vitro* de vários fungos fitopatogênicos, incluindo *S. sclerotiorum*, com filtrados de diferentes espécies de *Xenorhabdus* spp. e de *Photorhabdus* sp., os autores constataram que a espécie *X. szentirmaii* inibiu o crescimento micelial de *S. sclerotiorum* com percentual $\geq 83\%$.

A espécie *X. szentirmaii* fica evidente como uma excelente opção para o controle do fungo *S. sclerotiorum*.

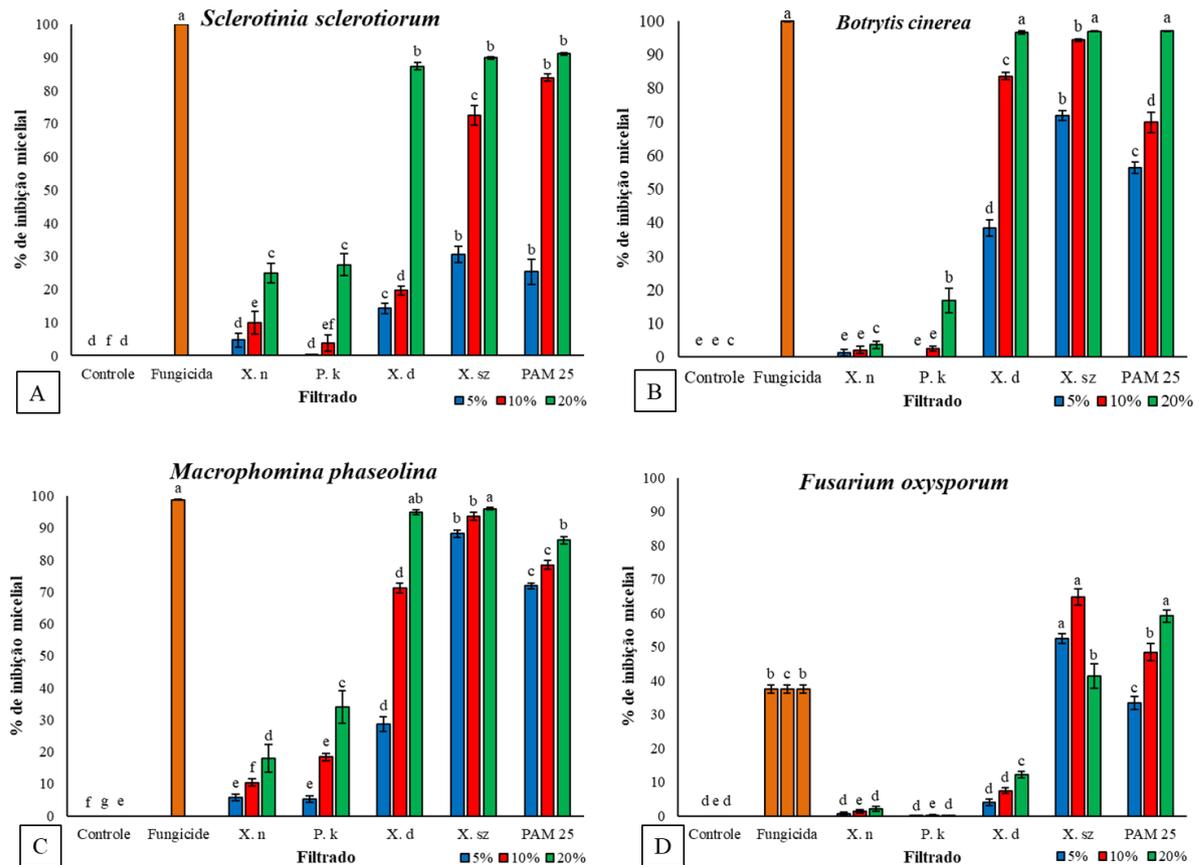


Figura 2. Atividade dos filtrados livre de células das bactérias simbiotes de nematoide entomopatogênico nas concentrações 5%, 10% e 20%, sobre fungos fitopatogênicos. A. *Sclerotinia sclerotiorum*. B. *Botrytis cinerea*. C. *Macrophomina phaseolina*. D. *Fusarium oxysporum*. X. n: *Xenorhabdus nematophila*. P. k: *Photorhabdus kayaii*. X. d: *Xenorhabdus doucetiae*. X. sz: *Xenorhabdus szentirmaii* DSMZ 16338. PAM 25: *Xenorhabdus szentirmaii* PAM 25.

B. cinerea tem demonstrado ser altamente suscetível aos metabólitos secundários das bactérias simbiotes de NEPs, pois vários estudos demonstraram que os filtrados livres de células *Xenorhabdus* spp. inibiram o crescimento micelial desse fungo, acima de 90% adicionando os filtrados a 10% de concentração (CHEN; DUNPHY; WEBSTER, 1994; CHEN et al., 1996; ISAACSON; WEBSTER, 2002; FANG et al., 2011; FANG et al., 2014).

No presente estudo, os filtrados das bactérias *X. szentirmaii* PAM 25, *X. szentirmaii* DSMZ 16338 e *X. doucetiae* com 20% de concentração inibiram o crescimento micelial de *B. cinerea* acima de 96%, não mostrando diferenças entre si ($F = 1123.13$; $df = 6, 133$; $P < 0.0001$) (Fig. 2B), assim como nas pesquisas realizadas *in vitro* com outras espécies de *Xenorhabdus*.

Os filtrados de *P. kayaii* e *X. nematophila* a 20% apresentaram porcentagens de inibição do crescimento de *B. cinerea* de 16,82% e 3,63%, respectivamente, diferente do reportado por Fang et al. (2014), onde foi avaliada a inibição *in vitro* de *B. cinerea* e *Phytophthora capsici*, pelo filtrado de *X. nematophila* a 10% de concentração, e obtiveram percentuais de inibição >90%. Essa diferença pode ser atribuída ao fato de serem isolados diferentes do fungo bem como diferentes concentrações de metabólitos secundários antifúngicos presentes no filtrado.

Na concentração de 10%, a maior inibição do fungo, foi obtida com o filtrado de *X. szentirmaii* DSMZ 16338 com percentual de 94,32%, sendo diferente dos demais tratamentos ($F = 1227.48$; $df = 6, 133$; $P < 0.0001$) (Fig. 2B).

Os filtrados das bactérias *X. doucetiae* e *X. szentirmaii* DSMZ 16338 na concentração de 20%, foram os tratamentos que apresentaram o melhor percentual de inibição micelial de *M. phaseolina*, sendo esse percentual $\geq 94,0\%$ (Fig. 2C). Estes tratamentos não apresentaram diferenças entre si e com o fungicida Metalaxil-M + Fludioxonil, e todos diferiram dos demais tratamentos ($F = 269.75$; $df = 6, 133$; $P < 0.0001$). O fungo *M. phaseolina* pertence à Família Botryosphaeriaceae (KHAN, 2007). No estudo de Otoyá-Martínez et al. (2023) também foi verificada a inibição *in vitro* de várias bactérias simbiotes de NEPs contra o fungo *N. parvum*, que também faz parte da Família Botryosphaeriaceae. O micélio do fungo *N. parvum* foi afetado com os filtrados dos isolados de *X. szentirmaii* PAM 11 avaliados a 10% e 33%, apresentando inibição do crescimento micelial de 78% e 90,9%, respectivamente (OTOYÁ-MARTÍNEZ et al., 2023).

Os filtrados de *X. szentirmaii* DSMZ 16338 também demonstraram porcentagens de inibição do fungo acima de 70% quando adicionados nas concentrações de 5% e 10%, não diferindo de *X. szentirmaii* PAM 25 na concentração de 20%, mas diferindo dos outros filtrados (5%: $F = 1245.23$; $df = 6, 133$; $P < 0.0001$; 10%: $F = 1368.95$; $df = 6, 133$; $P < 0.0001$).

Os filtrados com menor efeito sobre *M. phaseolina* foram de *X. nematophila* e de *P. kayaii*, na concentração de 5%. O percentual de controle micelial do fungo para esses filtrados foi $< 5,6\%$ ($F = 1123.13$; $df = 6, 133$; $P < 0.0001$). Pelo contrário, na pesquisa de Otoyá-Martínez et al. (2023), *N. parvum* foi inibido >70% pelos metabólitos de *X. nematophila*, o que pode ser porque embora sejam da mesma Família, esses fungos são de gêneros diferentes. Além disso, os isolados de *N. nematophila* avaliados nestes dois estudos são diferentes o foram avaliados a diferentes concentrações, assim podem produzir diferentes concentrações de metabólitos antifúngicos.

A espécie *X. szentirmaii* também demonstrou ser uma excelente opção para o controle dos fungos *B. cinerea* e *M. phaseolina*.

O fungo *F. oxysporum* demonstrou ser mais resistente aos filtrados das bactérias simbiotes de nematoide entomopatogênico e ao fungicida (Fig. 2D). Avaliados a 20%, os filtrados do isolado *X. szentirmaii* PAM 25 evidenciou maior porcentagem de inibição do fungo (59,14%), diferindo dos demais tratamentos na mesma concentração ($F = 204.07$; $df = 6, 133$; $P < 0.0001$). Nas concentrações de 10% e 5%, o isolado de *X. szentirmaii* DSMZ 16338 exibiu maior inibição de *F. oxysporum*, com percentuais de 64,66% e 52,44%, respectivamente, e diferindo dos demais isolados (10%: $F = 346.32$; $df = 6, 133$; $P < 0.0001$; 5%: $F = 429.50$; $df = 6, 133$; $P < 0.0001$).

Nas concentrações de 10% e 20%, os isolados de *X. szentirmaii* proporcionaram maior inibição do fungo que o fungicida avaliado como controle positivo (Fig. 2D). Os filtrados de *P. kayaii* e *X. nematophila* proporcionaram pouca ou nenhuma inibição micelial de *F. oxysporum* nas concentrações avaliadas, com percentuais $\leq 2,0\%$ (Fig. 2D). Assim como no presente estudo, as pesquisas desenvolvidas por Vanitha et al. (2010) e Lalramchuan et al. (2020), avaliando a inibição de *F. oxysporum* por bactérias simbiotes de NEPs, principalmente do gênero *Xenorhabdus*, evidenciaram porcentagens de inibição de 49% a 70%.

F. oxysporum, ao ser um patógeno habitante do solo, tem a capacidade de persistir por longos períodos no solo, fazendo com que seja mais resistente às condições adversas e a antifúngicos. Contudo, destaca-se a capacidade dos isolados de *X. szentirmaii* no seu controle pelo fato de terem inibido mais do que o fungicida. Isso demonstra a capacidade de inibição dos metabólitos antifúngicos produzidos por esses isolados de bactéria, que podem ter potencial para o controle e prevenção de doenças causadas por esse patógeno, que é um fungo habitante do solo, ou seja, de difícil controle. Atualmente o manejo de *F. oxysporum* é realizado principalmente com fungicidas, assim é importante o desenvolvimento e o estudo de alternativas sustentáveis e amigáveis com o meio ambiente, como poderiam ser as bactérias simbiotes de nematóides entomopatogênicos, nesse caso *X. szentirmaii*.

De acordo com os dados obtidos, as bactérias *X. szentirmaii* DSMZ 16338 e *X. doucetiae* foram selecionadas para avaliar os compostos com atividade antifúngica, produzidos através do uso de cepas com mutação no promotor em Δhfq .

5.2. Identificação do metabolito secundário produzido por *Xenorhabdus szentirmaii* Δ hfq com ação antifúngica

O MS que proporcionou maior inibição nos quatro fungos foi o grupo das fabclavinas (Fig. 3), inibindo com porcentagens acima de 90%, exceto para *F. oxysporum* cujo composto apresentou percentual de inibição de 75,6%. O controle positivo não diferiu do MS Fabclavina quanto ao percentual de controle somente para os fungos *S. sclerotiorum* ($F = 463,86$; $df = 13, 279$; $P < 0.0001$) e *B. cinerea* ($F = 216,37$; $df = 13, 279$; $P < 0.0001$).

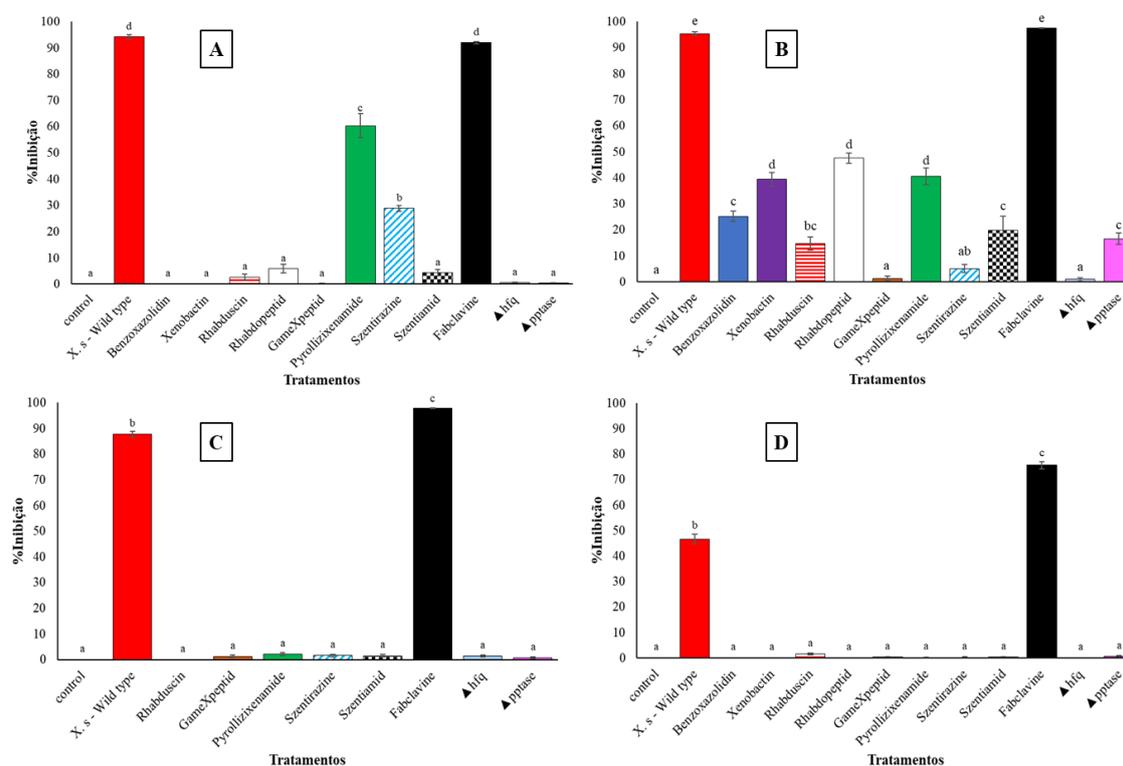


Figura 3. Atividade dos filtrados livres de células de cada metabolito secundário produzido pela cepa *Xenorhabdus szentirmaii* Δ hfq, sobre fungos fitopatogênicos. A. *Sclerotinia sclerotiorum*; B. *Botrytis cinerea*; C. *Macrophomina phaseolina*; D. *Fusarium oxysporum*. Controle positivo: isolado *X. szentirmaii* DSMZ 16338 (Wild Type).

As fabclavinas são híbridos hexapeptídicos/policetídeos derivados de peptídeos sintetases não ribossômicas (NRPS) e de uma policetídeo sintase (PKS), que estão conectados a uma poliamina incomum derivada de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) sintases (FUCHS et al. 2014).

Existe uma grande diversidade química das fabclavinas produzidas pelas espécies do gênero *Xenorhabdus*, sendo o principal composto na inibição geral de bactérias Gram positivas

e Gram negativas (WENSKI et al., 2020). Esses compostos são termoestáveis e altamente tóxicos, exibindo bioatividades de amplo espectro oferecendo fatores de proteção contra bactérias, fungos e outros concorrentes eucarióticos em cadáveres infectados por NEPs (FUCHS et al. 2014; TOBIAS et al. 2017; BODE et al. 2019; WENSKI et al. 2019, 2020; CIMEN et al., 2022).

Para o fungo *S. sclerotiorum*, além das fabclavinas, os compostos pyrollizixenamida e szentirazina inibiram diferentemente o fungo com percentuais de 60,3% e 28,8%, respectivamente (Fig. 3A) ($F = 463,86$; $df = 13, 279$; $P < 0.0001$). Para *B. cinerea*, os compostos que inibiram o fungo, além das fabclavinas, foram Rhabdopeptid, Pyrollizixenamida e Xenobactin, com percentuais $\leq 50\%$. Esses compostos não diferiram entre si, mas diferiram dos demais compostos ($F = 216,37$; $df = 13, 279$; $P < 0.0001$). Para os demais fungos, os compostos não propiciaram percentual de controle dos fungos com níveis satisfatórios, exceto o controle positivo e os MS do grupo das Fabclavinas (Fig. 3B).

A fabclavina foi o único metabólito que inibiu o desenvolvimento de *M. phaseolina* (Fig. 3C) e de *F. oxysporum* (Fig. 3D), com maior porcentagem ($>70,0\%$) e diferindo do controle positivo (*X. szentirmaii* DSMZ 16338) ($F = 5354,25$; $df = 10, 219$; $P < 0.0001$).

Fica aqui mais do que evidente o papel da espécie *X. szentirmaii* e de seu composto fabclavina no controle dos fungos estudados. Esse conhecimento é muito relevante, se tratando da capacidade de controle de fungos habitantes do solo, que são de difícil controle graças à produção de estruturas de resistência que permitem a sua sobrevivência por vários anos causando perdas em muitas culturas e inviabilizando o pleno aproveitamento de algumas áreas agrícolas (AMBRÓSIO et al., 2009).

5.3. Identificação do metabólito secundário produzido por *Xenorhabdus doucetiae* Δ hfq com ação antifúngica

O isolado da bactéria *X. doucetiae* avaliado produz dois tipos de xenocoumacinas. Uma dessas xenocoumacinas foi o MS que mais inibiu os fungos *S. sclerotiorum* ($F = 173.988$; $df = 5, 119$; $P < 0.0001$) e *M. phaseolina* ($F = 740.804$; $df = 5, 119$; $P < 0.0001$), diferindo dos demais compostos avaliados, mas não do controle positivo que foi o isolado de *X. doucetiae* (wyld tipe) (Figura 4A e 4C).

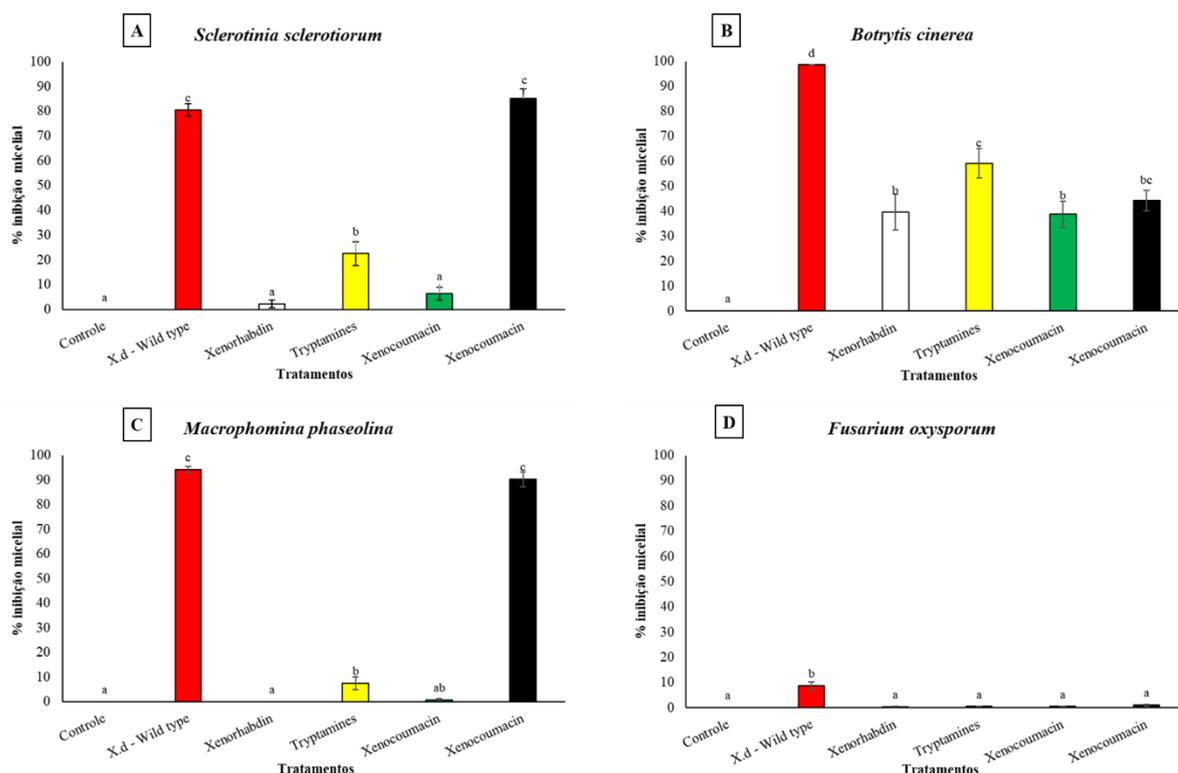


Figura 4. Atividade dos filtrados livres de células de cada metabolito secundário produzido pela cepa *Xenorhabdus doucetiae* Δ hfq, sobre fungos fitopatogênicos. A. *Sclerotinia sclerotiorum*; B. *Botrytis cinerea*; C. *Macrophomina phaseolina*; D. *Fusarium oxysporum*. Controle positivo: isolado *X. doucetiae* (Wild Type).

As xenocoumacinas, que podem apresentar-se em duas formas, xenocoumacina 1 (Xcn1) e xenocoumacina 2 (Xcn2), são compostos peptídicos sintetizados por NRPS e PKS solúveis em água com atividades antibacterianas e antifúngicas (CIMEN et al., 2022). Esse grupo de compostos peptídicos tem sido altamente estudados em *X. nematophila*, mas não em *X. doucetiae*. A bactéria *X. nematophila* converte a Xcn1, que só tem efeitos antifúngicos, em Xcn2, um antibiótico menos potente, no final da fase de crescimento (CIMEN et al., 2022).

A xenocoumacina que propiciou maior inibição dos fungos *S. sclerotiorum* e *M. phaseolina*, provavelmente seja a Xcn1, composto que já foi reportado como antifúngico em vários estudos (YANG et al., 2011; GUO et al., 2017).

Sharma et al. (2016), avaliaram a atividade antifúngica do extrato de acetato de etila do filtrado de *Xenorhabdus* sp. no fungo *M. phaseolina*, obtendo a inibição desse fungo e detectando xenocoumacin, xenorhabdin e nematophina como os três grupos de compostos presentes nesse extrato. Comparando esses resultados, com o obtido no presente estudo onde

os compostos foram avaliados separadamente, é provável que o composto com maior atividade antifúngica também seja a xenocoumacina.

O fungo *B. cinereae*, foi inibido de 38,7% a 59,1% pelos MS produzidos por *X. doucetiae* Δ hfq, diferindo do isolado *X. doucetiae* – wild type (F = 46.956; df =5, 119; P < 0.0001) que inibiu o micélio desse fungo fitopatogênico 98,5% (Figura 2B). Isso pode se dever à sinergia, pois no filtrado de *X. doucetiae* encontram-se todos os MS agindo em conjunto e potenciando a ação antifúngica.

Guo e colaboradores (2017) avaliaram a atividade antimicrobiana Xcn1 e da nematofina, e observaram que houve uma alta atividade antimicrobiana graças à sinergia desses dois compostos agindo juntos. Assim, os compostos produzidos por *X. doucetiae* potencializam à sua atividade antifúngica contra *B. cinereae* quando agem em conjunto, ou outro composto não avaliado pode ser o responsável pela inibição desse fungo.

O fungo *F. oxysporum*, pelo contrário, praticamente não foi inibido pelos compostos avaliados (0,19% a 0,38%) e pelo isolado *X. doucetiae* – Wild type foi inibido apenas 8,7%, diferindo dos isolados Δ hfq (F = 27.555; df =5, 119; P < 0.0001). *F. oxysporum* tem demonstrado ser o fungo mais resistente no presente estudo, porém o resultado obtido com a fabclavine e os isolados de *X. szentirmaii* é relevante e pode ser o início de futuros estudos em casa de vegetação ou no campo, para o controle desse fungo habitante do solo.

5.4. Teste de patogenicidade de *Sclerotinia sclerotiorum*

O fungo *S. sclerotiorum* incidiu 100% nas folhas de soja de todas as repetições e causou 80% de severidade da doença. O sintoma e sinais da doença nas folhas foram lesão aquosa e produção de micélio e escleródios (Figura 5). O fungo foi re-isolado das folhas inoculadas com percentual de 93%, completando assim os postulados de Koch.

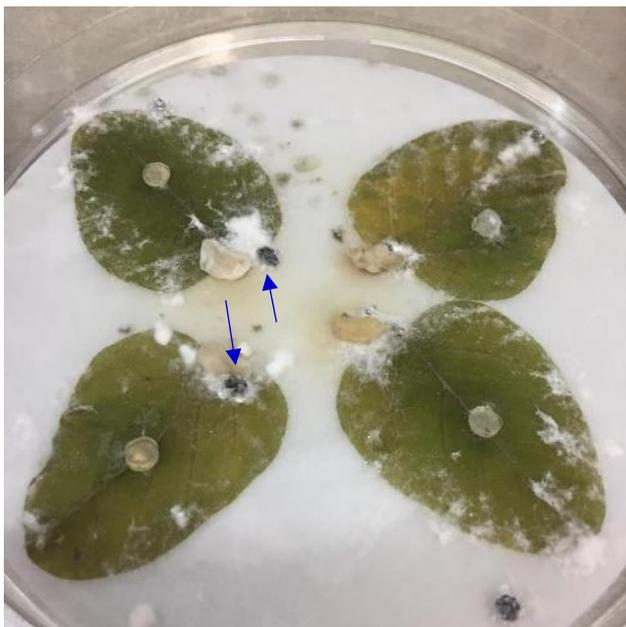


Figura 5. Folhas de soja apresentando lesão aquosa causada por *Sclerotinia sclerotiorum*, e presença abundante de micélio e escleródios do fungo (setas).

O isolado foi preservado nos métodos Castelani e em óleo mineral, sendo ambos os frascos conservados em temperatura de refrigeração (4°C). Os escleródios desinfestados também foram acondicionados em tubos Eppendorf e armazenados em temperatura de refrigeração.

A patogenicidade do fungo foi necessária para verificar o papel da suspensão da bactéria *X. szentirmaii* e de seus metabólitos armazenados ao longo de um ano no seu controle, bem como no tratamento de semente visando o controle do fungo.

5.5. Viabilidade da bactéria *Xenorhabdus szentirmaii* PAM 25 e de seus metabólitos secundários

Os filtrados de *X. szentirmaii* PAM 25 apresentaram percentuais de inibição micelial de *S. sclerotiorum* acima de 80%, durante o tempo de armazenamento nas diferentes temperaturas (Figura 6; Tabela 3).

Tabela 3. Porcentagem de inibição do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* com filtrados de *Xenorhabdus szentirmaii* PAM 25, armazenados em diferentes temperaturas, por até 360 dias.

Tempo (dias)	Temperatura								
	5°C		25°C		35°C				
0	99,30	a ¹	A ²	99,30	a	A	99,30	a	A
7	97,89	ab	C	98,95	a	AB	99,34	a	A
15	94,84	cd	B	96,68	b	A	94,77	cd	B
30	95,94	c	A	94,77	c	AB	93,90	d	C
60	98,32	a	A	98,55	ab	A	96,13	bc	B
90	97,77	ab	A	98,13	ab	A	94,84	cd	B
120	99,18	a	A	93,40	c	B	93,36	d	B
150	92,58	e	B	94,45	c	A	86,68	f	C
210	98,55	a	A	94,83	c	B	93,67	d	B
240	93,91	de	A	83,59	d	C	89,90	e	B
270	94,42	cde	A	0,00 ³			95,27	bcd	A
300	97,97	a	A	0,00			94,69	cd	B
330	97,85	ab	A	0,00			96,76	b	A
360	96,13	bc	A	0,00			95,08	bcd	A

1. Letras minúsculas representam as comparações entre os dias de armazenamento em cada temperatura, segundo o teste de Tukey a 5% de significância;
2. Letras maiúsculas comparam as temperaturas em cada tempo de armazenamento, segundo o teste de Tukey a 5% de significância.
3. O valor 0,00 na temperatura de 25°C corresponde à inexistência do dado, pois o filtrado foi contaminado (devido à contaminação do filtrado).

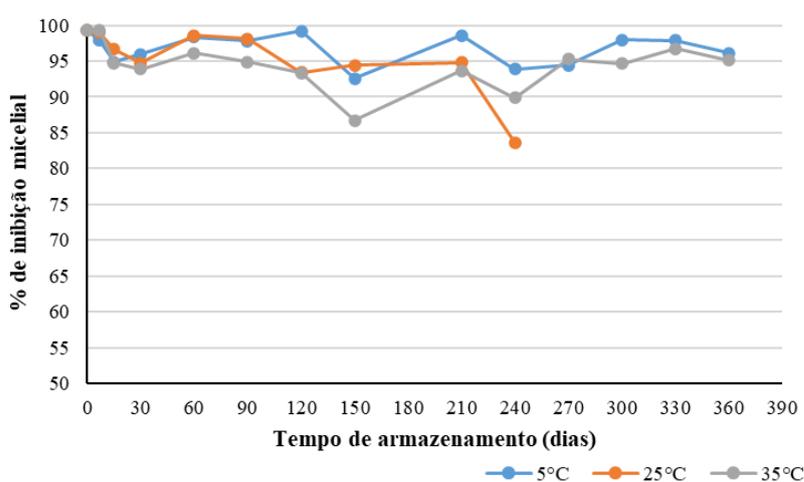


Figura 6. Comportamento do percentual de inibição do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* em meio BDA com metabólitos secundários da bactéria *Xenorhabdus szentirmaii* PAM 25 armazenados em diferentes temperaturas, por até 360 dias. A linha de tendência de

cada temperatura está representada por uma cor diferente. CV (%) = 6,90. Os dados referem-se à média de 16 repetições.

Com um ano de armazenamento, os filtrados de *X. szentirmaii* PAM 25 mantidos nas temperaturas de 5°C e 35°C, apresentaram inibição significativamente iguais do fungo, com percentuais de controle de 96,1% e 95,0%, respectivamente (Tabela 3).

Os filtrados da bactéria armazenados na temperatura de 25°C apresentaram contaminação bacteriana após 9 meses (270 dias), inviabilizando o seu uso e, conseqüentemente, o controle do fungo (Tabela 3). No estudo de Hazir et al. (2018), também foi determinado o tempo de prateleira do filtrado de *X. szentirmaii* e da cultura bacteriana autoclavada, pois a autoclavagem não tem impacto na atividade antifúngica dos metabólitos secundários graças à sua termoestabilidade. No entanto, após 9 meses de teste, a atividade antifúngica sobre o patógeno *Monilinia fructicola* de ambos os tipos de extrato não diminuiu quando armazenados 20°C, diferente do filtrado bacteriano armazenado a temperatura ambiente na atual pesquisa. Contudo, o filtrado manteve a atividade antifúngica por até um ano quando conservado a 5°C, concordando com o reportado por Hazir et al. (2018) na temperatura de 4°C.

De acordo com os dados da tabela 4, a suspensão da bactéria de *X. szentirmaii* PAM 25 foi conservada melhor nas temperaturas de 5°C e 25°C, pois o percentual de inibição micelial de *S. sclerotiorum* manteve-se $\geq 98\%$. Na temperatura de 35°C, observou-se bastante variação a partir dos 15 dias e com 330 dias de armazenamento, o percentual de controle do fungo foi de apenas 37% (Tabela 4, figura 7).

Tabela 4. Percentual de inibição do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* com a suspensão bacteriana de *Xenorhabdus szentirmaii* PAM 25 armazenada em diferentes temperaturas por até 360 dias.

Tempo (dias)	Temperatura								
	5°C			25°C			35°C		
0	99,45	a ¹	A ²	99,45	ab	A	99,45	a	A
7	99,49	a	A	97,19	b	B	98,59	a	AB
15	89,77	c	AB	91,45	c	A	89,67	c	B
30	98,32	ab	A	98,55	ab	A	96,13	b	B
60	99,34	a	A	97,15	b	B	70,35	e	C
90	99,84	a	A	99,18	ab	A	63,40	f	B
120	99,88	a	A	99,84	a	A	86,52	c	B
180	99,26	a	A	99,34	ab	A	39,38	h	B

210	100,00	a	A	100,00	a	A	78,98	d	B
240	98,09	ab	B	100,00	a	A	78,40	d	C
270	99,88	a	A	100,00	a	A	51,37	g	B
300	96,33	b	B	100,00	a	A	36,99	h	C
330	97,89	ab	B	100,00	a	A	37,45	h	C
360	98,63	ab	A	89,88	c	B	0,00		

1. Letras minúsculas representam as comparações entre os dias de armazenamento em cada temperatura, segundo o teste de Tukey a 5% de significância;
2. Letras maiúsculas compara as temperaturas em cada tempo de armazenamento, segundo o teste de Tukey a 5% de significância.

A 5°C, a suspensão bacteriana de *X. szentirmaii* PAM 25 apresentou percentuais de controle do fungo durante o tempo de armazenamento, sem diferenças entre si, mantendo assim percentual de inibição do fungo ($\geq 90\%$) estável ao longo dos 360 dias (Tabela 4 e Figura 7). Na temperatura de 25°C, a suspensão bacteriana de *X. szentirmaii* PAM 25 manteve-se estável até 330 dias de armazenamento e com percentual de controle do fungo $\geq 99\%$ (Tabela 4 e Figura 7).

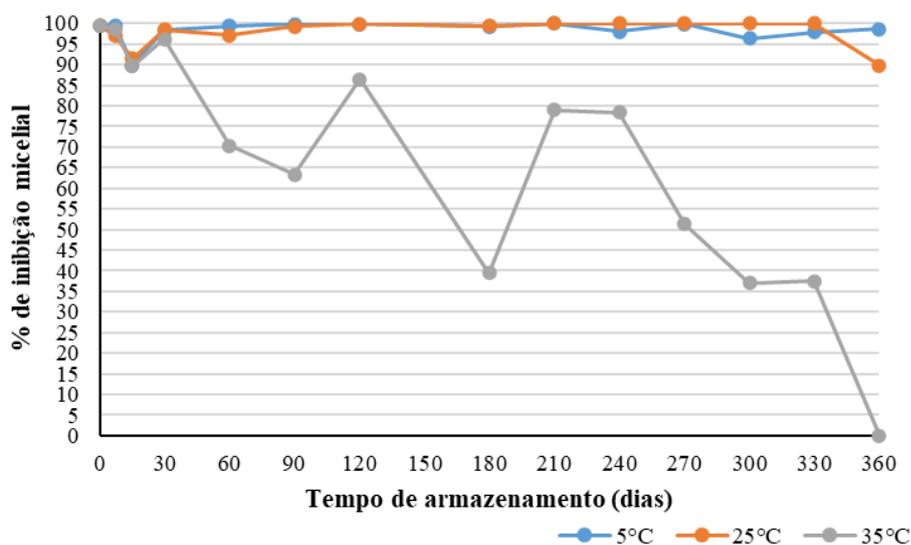


Figura 7. Percentual de inibição do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* em meio BDA com a suspensão bacteriana de *Xenorhabdus szentirmaii* PAM 25 armazenada em diferentes temperaturas por até 360 dias. A linha de tendência de cada temperatura está representada por uma cor diferente. CV (%) = 8,21. Os dados referem-se à média de 16 repetições.

Armazenada a 35°C, a suspensão bacteriana mostrou instabilidade (Figura 7), e perda da viabilidade. Isso pode ser porque essa temperatura é ótima para o crescimento bacteriano,

assim a bactéria conseguiu continuar com o seu ciclo de vida chegando à fase estacionária. Além disso, não se pode conhecer com precisão o comportamento da bactéria nessas condições.

Com 360 dias de armazenamento, a suspensão da bactéria apresentou diferentes percentuais de controle do fungo, nas temperaturas de 5°C e 25°C. A 5°C, o percentual médio de controle do fungo foi de 98% e de 89% na temperatura de 25°C (Tabela 4 e Figura 7).

Assim, a temperatura de 5°C mostrou-se ser ideal para armazenar tanto os filtrados quanto a suspensão da bactéria *X. szentirmaii* PAM 25, por até um ano na prateleira, controlando com percentual satisfatório o fungo *S. sclerotiorum*.

5.6. Tratamento de sementes de soja com *Xenorhabdus szentirmaii* PAM25 e seus metabólitos secundários visando o controle de *Sclerotinia sclerotiorum*

Os filtrados de *X. szentirmaii* PAM 25 diluídos a 10% e não diluídos e a cultura da bactéria diluída a 10% e sem diluição demonstraram serem eficientes no controle de *S. sclerotiorum*, propiciando porcentagens de germinação de semente $\geq 80\%$ (Fig. 8) e não diferindo do tratamento com o fungicida (tiofanato metílico + fluazinam). Pode-se ressaltar que os filtrados da bactéria diluídos a 10% torna-se vantajoso, pelo fato de ter um controle igual ao fungicida e ao filtrado sem diluição.

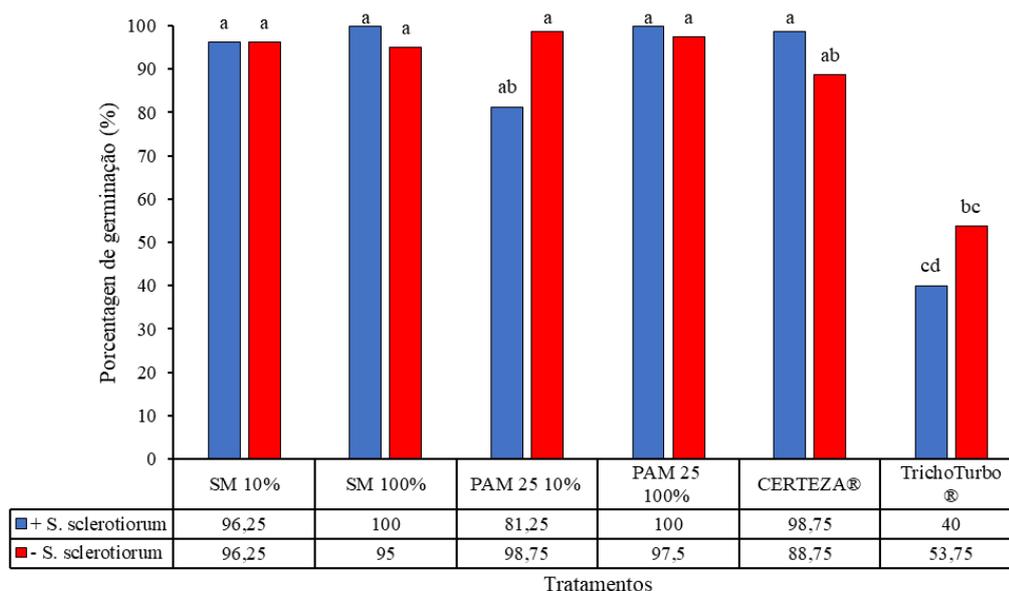


Figura 8. Percentual de germinação de sementes de soja tratadas com filtrados de *Xenorhabdus szentirmaii* PAM 25 e com a suspensão da bactéria diluídos ou não a 10%, seguido de inoculação ou não do fungo *Sclerotinia sclerotiorum*. MS: metabólitos secundários. Letras

minúsculas fazem referência às comparações entre os tratamentos, através do teste de Tukey a 5% de significância. CV (%) = 8,50. Os dados referem-se à média de 8 repetições.

Chacon-Orozco et al. (2020) realizaram o mesmo estudo, e, na presença de *S. sclerotiorum*, a suspensão bacteriana propiciou maior manejo do fungo, porém com percentuais de germinação de 46% e 47%, nas concentrações de 10% e 100%, respectivamente. Já com o filtrado diluído a 10% não houve controle do fungo, e sem diluir, houve germinação de 17% das sementes (CHACON-OROZCO et al., 2020). Diferente do presente estudo, onde os tratamentos avaliados demonstraram serem eficientes no controle de *S. sclerotiorum*, propiciando porcentagens de germinação de semente $\geq 80\%$. Esse comportamento, pode-se dever ao fato de se trabalhar com organismos vivos, à viabilidade das sementes ou a diminuição da patogenicidade de *S. sclerotiorum*. Portanto, recomenda-se a repetição desse experimento e o desenvolvimento com sementes de soja já infectadas pelo patógeno.

As sementes de soja tratadas com *T. asperellum* BV 10 (TrichoTurbo®) apresentaram percentual de 40% de germinação, demonstrando assim baixa eficiência de controle do fungo. Esse mesmo tratamento não propiciou eficiência no aumento da germinação da semente sem a presença do fungo (54%). Ambos os tratamentos diferiram dos demais tratamentos ($F = 4.486$; $df = 7, 56$; $P < 0.0005$). Ressalta-se que o baixo controle de *T. asperellum* BV 10 sobre o fungo pode ser aumentado com o tempo, dando tempo para o antagonista controlar o fungo e suas estruturas pelo parasitismo. O agente de controle biológico não tem uma ação tão rápida como os fungicidas.

Fungos habitantes do solo, como *S. sclerotiorum*, *B. cinerea*, *M. phaseolina* e *F. oxysporum* são de difícil controle ao contaminarem plantas, sementes, restos culturais ou o solo. São produtores de estruturas de resistência, como escleródios ou clamidósporos, que conferem sua viabilidade por muitos anos, em condições adversas.

Os resultados obtidos neste trabalho proporcionam mais um método sustentável e alternativo de controle, que pode ser adicionado ao manejo integrado desses patógenos, como visto, o tratamento de sementes de soja, em contato direto com *S. sclerotiorum*.

Os conhecimentos obtidos neste trabalho evidenciam a importância da sua continuidade, em ensaios com plantas, em condições de casa de vegetação e de campo.

6. CONCLUSÕES

Com base nos dados obtidos, pode-se concluir que:

Os filtrados dos isolados das bactérias entomopatogênicas *Xenorhabdus szentirmaii* e *X. doucetiae*, principalmente de *X. szentirmaii*, na concentração de 20%, inibem, com alto percentual de controle ($\geq 85,0\%$), o crescimento micelial dos fungos fitopatogênicos, habitantes do solo, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Macrophomina phaseolina* e *Fusarium oxysporum*, e de *Botrytis cinerea*.

A fabclavinas é o principal composto antifúngico produzido por *X. szentirmaii* e tem alta eficiência no controle micelial dos fungos *B. cinerea*, *S. sclerotiorum*, *M. phaseolina* e *F. oxysporum* ($>70,0\%$).

A xenocoumacina produzida por *X. doucetiae* têm atividade antifúngica, pois inibiu o crescimento micelial dos fungos *S. sclerotiorum* e *M. phaseolina* ($>85,0\%$), e de *B. cinereae* (44%).

A suspensão de *X. szentirmaii* PAM 25 e seus metabólitos secundários mantêm-se eficientes e viáveis no controle micelial de *S. sclerotiorum* ($\geq 96,0\%$), quando armazenados na temperatura de 5°C.

A suspensão de *X. szentirmaii* PAM 25 e seus metabólitos secundários diluídos a 10% controlam eficientemente o desenvolvimento de *S. sclerotiorum* em sementes de soja ($>80,0\%$).

7. REFERÊNCIAS

- ABAWI, G. S.; PASTOR-CORRALES, M.A. Root rots of beans in Latin America and Africa: Diagnosis, research methodologies, and management strategies. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, CO. 114 p. (CIAT publication no. 35) 1990.
- ADEOLU, M. Genome-based phylogeny and taxonomy of the ‘Enterobacteriales’: proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, p. 5575-5599, 2016.
- AGRIOS, G. **Plant Pathology**. San Diego: Academic Press. 4 ed. p. 635. 1997.
- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. San Diego: Academic Press, p. 386-387, 992, 2005.
- AHANTARIG, A., et al. PirAB toxin from *Photorhabdus asymbiotica* as a larvicide against dengue vectors. **Appl Environ Microbiol**, v. 75, n. 13, p. 4627–4629, 2009.
- AHN, J.Y. et al. Mosquitocidal activity of anthraquinones isolated from symbiotic bacteria *Photorhabdus* of entomopathogenic nematode. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 16, p. 317-320, 2013.
- AKHURST, R. J. Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabdus* spp. bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes *Neoaplectana* and *Heterorhabditis*. **J. Gen. Microbiol.**, v. 121, p. 303–309, 1980.
- AKHURST, R. J. Antibiotic activity of *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with insect pathogenic nematodes of the families Heterorhabditidae and Steinernematidae. **J. Gen. Microbiol.**, v. 128, n. 12, p. 3061–3065, 1982.
- ALFORJA, S.I.R. et al. Two Philippine *Photorhabdus luminescens* strains inhibit the *in vitro* growth of *Lasiodiplodia theobromae*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, and *Colletotrichum* spp. **Egypt J Biol Pest Control**, v. 31, n.108, 2021
- ALMEIDA, A.M.R. et al. *Macrophomina phaseolina* em soja. 2014. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/104251/1/Doc.-346-OL.pdf>. Acesso em: 11 abr. 2023.
- ALVES, S. B. (Ed.). Controle Microbiano de Insetos. 2. ed. rev. e atual. Piracicaba: FEALQ, 1998. 549 p.
- AMBRÓSIO, M.M.Q. et al. Sobrevivência de fungos fitopatogênicos habitantes do solo, em microcosmo, simulando solarização com prévia incorporação de materiais orgânicos. **Summa phytopathol.**, v. 35, v. 1, 2009.

BAIRD, R.E.; WATSON, C.E.; SCRUGGS, M. Relative Longevity of *Macrophomina phaseolina* and Associated Mycobiota on Residual Soybean Roots in Soil. **Plant Disease**, v. 87, n. 5, p. 563-566, 2003.

BELD, J. et al. The phosphopantetheinyl transferases: catalysis of a post-translational modification crucial for life. **Nat Prod Rep.**, v. 31, n. 1, p. 61-108, 2014.

BERUSKI, G.C. Incidência e severidade de mofo-branco em soja cultivada sob diferentes densidades populacionais e espaçamentos. 2013. 121 f. Dissertação (Mestrado em Agricultura) - UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA, Ponta Grossa, 2013.

BOBROVSKYY, M.; VANDERPOOL, C.K. Regulation of bacterial metabolism by small RNAs using diverse mechanisms. **Annu Rev Genet.**, v. 47, p. 209-32, 2013.

BOCK, C. H. et al. Identification of the antifungal compound, trans-cinnamic acid, produced by *Photorhabdus luminescens*, a potential biopesticide against pecan scab. **Journal of Pest Science**, v. 87, n. 1, p. 155-162, 2014.

BODE, H. B. Entomopathogenic bacteria as a source of secondary metabolites. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 13, p. 224-230, 2009.

BODE, E., et al. Simple “on-demand” production of bioactive natural products. **ChemBioChem**, v. 16, p. 1115–1119, 2015.

BODE, E., et al. Promoter activation in Δ hfq mutants as an efficient tool for specialized metabolite production enabling direct bioactivity testing. **Angew Chem Int Ed**, v. 131, p. 19133–19139, 2019.

BOEMARE, N. E. Biology, Taxonomy and Systematics of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. In *Entomopathogenic Nematology* (ed. Gaugler, R.) 35–56 (CABI Publishing, 2002).

BOEMARE, N., AKHURST, R., The Genera *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H., Stackebrandt, E., (Eds.), *The Prokaryotes: Volume 6: Proteobacteria: Gamma Subclass*, Springer, New York, USA, pp. 451–494. 2006.

BOLLAND, G.J.; HALL, R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal Plant Pathology**. v.16, p. 93–108, 1994.

BOWEN, D.J.; ENSIGN, J.C. Purification and characterization of a high-molecular-weight insecticidal protein complex produced by the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens*. **Appl Environ Microbiol**, v. 64 n. 8, p. 3029–3035, 1998.

BRACHMANN, A.O.; SCHWÄR, G.; BODE, H. *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*: potent secondary metabolite producers. **Insect Pathogens and Insect Parasitic Nematodes - IOBC/wprs Bulletin**, v. 31, p. 151-156, 2008.

BRIAN, P. W.; HEMMING, H. G. Production of antifungal and antibacterial substances by fungi; preliminary examination of 166 strains of fungi imperfecti. **Microbiol.**, v. 1, n. 2, p. 158-167, 1947.

FILLINGER, S.; ELAD, Y. **Botrytis-the fungus, the pathogen and its management in agricultural systems**. Springer, 2016.

CAI, D.; ZHU, C.; CHEN, S. Microbial production of nattokinase: current progress, challenge and prospect. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 33, n. 5, p. 84, 2017.

CALIGIORNE, R.B. et al. Fungos dematiáceos. **Rev Biotec Ciên e Desenvolvimento**, v. 11, p. 22-25, 2010.

CANE, D.E.; WALSH, C.T. The parallel and convergent universes of polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases. **Chem Biol.**, v. 6, n. 12, p. R319-25, 1999.

CARDOSO, J. E. Podridão cinzenta do caule. In: SORTORATO, A.; RAVA, C. A. (Eds.). Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle. Brasília: EMBRAPA-SPI (EMBRAPA-CNPAC. Documentos, 50), 1994. p. 300.

CASELA, C.R.; FERREIRA, A.S. 1998. Antracnose do sorgo (*Colletotrichum graminicola*). Sete Lagoas: EMBRAPA_CNPMS. Circular técnica, 28. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/479090>. Acesso em: 11 abr. 2023.

CHACON-OROZCO, J.G., et al. Antifungal activity of *Xenorhabdus* spp. and *Photorhabdus* spp. against the soybean pathogenic *Sclerotinia sclerotiorum*. **Sci Rep**, v. 10, n. 20649, 2020.

CHAO, Y.; VOGEL, J. The role of Hfq in bacterial pathogens. **Curr Opin Microbiol.**, v.13, n.1, p. 24-33, 2010.

CHASTON, J.M., et al. The entomopathogenic bacterial endosymbionts *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*: Convergent lifestyles from divergent genomes. **PLoS ONE**, v. 6, n. 11, p. e27909, 2011.

CHEN, G.; DUNPHY, G. B.; WEBSTER, J. M. Antifungal activity of two *Xenorhabdus* species and *Photorhabdus luminiscens*, bacteria associated with the nematodes *Steinernema* species and *Heterorhabditis megidis*. **Biological Control**, v. 4, n. 2, p. 157-162, 1994.

CHEN, G. et al. Chitinase activity of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* species bacterial associates of entomopathogenic nematodes. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 68, n. 2, p. 101-108, 1996.

CICHE, T.A., et al. A Phosphopantetheinyl transferase homolog is essential for *Photorhabdus luminescens* to support growth and reproduction of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora*. **J Bacteriol**, v. 183, p. 3117– 3126, 2001.

CICHE, T. A.; ENSIGN, J. C. For the insect pathogen *Photorhabdus luminescens* which end of a nematode is out? **Applied Environmental Microbiology**, v. 69, p. 1890-1897, 2003.

CICHE, T.A. et al. Cell Invasion and Matricide during *Photorhabdus luminescens* Transmission by *Heterorhabditis bacteriophora* Nematodes. **Appl Environ Microbiol.**, v. 74, n.8, p. 2275-87, 2008.

CIMEN, H. The role of *Photorhabdus*-induced bioluminescence and red cadaver coloration on the deterrence of insect scavengers from entomopathogenic nematode-infected cadavers. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 196, p. 107871, 2023.

CIMEN, H. et al. Natural products from *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*: mechanisms and impacts. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 106, p. 4387–4399, 2022.

CIMEN, H., et al. Antifungal activity of different *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* species against various fungal phytopathogens and identification of the antifungal compounds from *X. szentirmaii*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 105, p. 5517–5528, 2021.

CLARKE, D. J. *Photorhabdus*: a model for the analysis of pathogenicity and mutualism. **Cellular Microbiology**, v. 10, p. 2159–2167, 2008.

CLARKSON, J. P. et al. Ascospore release and survival in *Sclerotinia sclerotiorum*. **Mycological Research**, Philadelphia, v.107, n. 2, p. 213-222, 2003.

CLIFFORD, M.N. Chlorogenic acids and other cinnamates—nature, occurrence and dietary burden. **J Sci Food Agric**, v. 79, n. 3, p. 362–372, 1999.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 12, n. 4, p. 564–582, 1999.

CRAGG, G.M., NEWMAN, D.J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochim Biophys Acta**, v. 1830, n. 6, pp. 3670-95, 2013.

DEMAIN, A. L.; FANG, A. The Natural Functions of Secondary Metabolites. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 69, p. 1–39, 2000. http://dx.doi.org/10.1007/3-540-44964-7_1

DHINGRA, O.D.; CHAGAS, D. Effect of soil temperature, moisture, and nitrogen on competitive saprophytic ability of *Macrophomina phaseolina*. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 77, n. 1, p. 15–20, 1981.

DHINGRA, O.D.; SINCLAIR, J.B. Biology and pathology of *Macrophomina phaseolina*. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 1978. 166 p.

DÖNMEZ-ÖZKAN, H. et al. Nematode-associated bacteria: Production of antimicrobial agent as a presumptive nominee for curing endodontic infections caused by *Enterococcus faecalis*. **Front. Microbiol.**, v. 10, p. 2672, 2019.

EDEL-HERMANN, V.; LECOMTE, C. Current Status of *Fusarium oxysporum* Formae Speciales and Races. **Phytopathology**, v. 109, p. 512-530, 2019.

ECKSTEIN, S.; HEERMANN, R. Regulation of Phenotypic Switching and Heterogeneity in *Photorhabdus luminescens* Cell Populations. **JMB Journal of Molecular Biology**, v. 431, n. 23, p. 4559-4568, 2019.

EL-BAROUGY et al. Antagonistic activity of selected strains of rhizobacteria against *Macrophomina phaseolina* of soybean plants. **American-Eurasian Journal of Agriculture and Environment Science**, v. 5, p. 337-347, 2009.

ENSIGN, J. C. et al. Proteins from the Genus *Xenorhabdus* are Toxic to Insects on Oral Exposure. 2002. **US Patent**, No. 0147148 A1.

FANG, X. L. et al. *In vitro* and *in vivo* antimicrobial activity of *Xenorhabdus bovienii* YL002 against *Phytophthora capsici* and *Botrytis cinerea*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, p. 145-154, 2011.

FANG, X. et al. Inhibitory effect of *Xenorhabdus nematophila* TB on plant pathogens *Phytophthora capsici* and *Botrytis cinerea* *in vitro* and *in planta*. **Sci. Rep.**, v. 4, p. 4300, 2014.

FENTON, A. et al. Parasite-induced warning coloration: a novel form of host manipulation **Anim. Behav.**, n. 81, p. 417-422, 2011.

FERRAZ, L.C.L. et al. Viabilidade de *Sclerotinia sclerotiorum* após a solarização do solo na presença de cobertura morta. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 17-26, 2003.

FINKING, R., MARAHIEL, M.A. Biosynthesis of nonribosomal peptides¹. **Annu Rev Microbiol.**, v. 58, pp. 453-88, 2004.

FORST, S.; et al. *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp.: bugs that kill bugs. **Annu Rev Microbiol.**, v. 51, p. 47-72, 1997.

FORST, S.W.; CLARKE, D. Bacteria-nematode symbiosis. In GAUGLER, R. (Ed.). Entomopathogenic nematology, London: CABI International. 2002, p. 57-77.

FUCHS, S.W. et al. Fabclavines: Bioactive Peptide–Polyketide–Polyamino Hybrids from *Xenorhabdus*. **ChemBioChem**, v. 15, pp. 512-516, 2014.

FURGANI, G. et al. *Xenorhabdus* antibiotics: A comparative analysis and potential utility for controlling mastitis caused by bacteria. **J. Appl. Microbiol.**, v. 104, p. 745–758, 2008.

GARCÍA, F. Los Nemátodos Entomopatógenos Agentes de Control de Plagas. In: JACAS, J.; CABALLERO, P.; AVILLA, J. El CONTROL biológico de plagas y enfermedades. La sostenibilidad de la agricultura mediterránea. Barcelona: editorial Universitat Jaume I, 2005. 87p. Cp. 2.

GARCIA, R.A.; JULIATTI, F.C. Avaliação de Resistencia de soja a *Sclerotinia sclerotiorum* em diferentes estádios fenológicos e períodos de exposição ao inóculo. **Tropical Plant Pathology**, v. 37, n. 3, p. 196-203, 2012.

GILLOR, O.; GHAZARYAN, L. Recent advances in bacteriocin application as antimicrobials. **Recent Pat. Antiinfect. Drug Discov.**, n. 2, p. 115–122, 2007.

GOODRICH-BLAIR, H.; CLARKE, D.J. Mutualism and pathogenesis in *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*: two roads to the same destination. **Mol. Microbiol.**, v. 64, n. 2, p. 260–268, 2007.

GÖRGEN, C. A. et al. Controle do mofo branco com palhada e *Trichoderma harzianum* 1306 em soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, p. 1583-1590, 2009.

GOTTESMAN, S.; STORZ, G. Bacterial small RNA regulators: versatile roles and rapidly evolving variations. **Cold Spring Harb Perspect Biol.**, v. 3, n. 12, 2011.

GRUNDMANN, F. et al. Antiparasitic chaitophumines from entomopathogenic *Xenorhabdus* sp. PB61.4. **J. Nat. Prod.**, v. 77, n.4, p. 779–783, 2014.

GULCU, B. et al. Entomopathogenic nematodes and their mutualistic bacteria: Their ecology and application as microbial control agents. **Biopestic. Int.**; v. 13, p. 79–112; 2017.

GULSEN, S.H. et al. Antiprotozoal activity of different *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* bacterial secondary metabolites and identification of bioactive compounds using the easyPACId approach. **Scientific Reports**, v. 12, p. 10779, 2022.

GUO, S. et al. Regulation of antimicrobial activity and xenocoumacins biosynthesis by pH in *Xenorhabdus nematophila*. **Microb Cell Factories**, v. 16, n. 1, p. 1–14, 2017.

GUZMAN, J.D. Natural cinnamic acids, synthetic derivatives and hybrids with antimicrobial activity. **Molecules**, v. 19, n. 12, p. 19292–19349, 2014.

HERBERT, E.E.; GOODRICH-BLAIR, H. Friend and foe: the two faces of *Xenorhabdus nematophila*. **Nat. Rev. Microbiol**, v. 5, p. 634–646, 2007.

HAN, R.; EHLERS, R.U. Effect of *Photorhabdus luminescens* phase variants on the in vivo and in vitro development and reproduction of the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae*. **FEMS Microbiology Ecology**, V. 35, n. 3, p. 239-247, 2001.

HAWKSWORTH, D.L. et al. Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi. Wallingford: CAB international, 8. Ed, 1995.

HAZIR, S. et al. Two new subspecies of *Photorhabdus luminescens*, isolated from *Heterorhabditis bacteriophora* (Nematoda: Heterorhabditidae): *Photorhabdus luminescens* subsp. *kayaii* subsp. Nov. and *Photorhabdus luminescens* subsp. *thraciaensis* subsp. nov. **Syst. Appl. Microbiol.**, v. 27, p. 36–42, 2004.

HAZIR, S. et al. Relative potency of culture supernatants of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp. on growth of some fungal phytopathogens. **European Journal of Plant Pathology**, v. 146, p. 369-381, 2016.

HAZIR, S. et al. Trans-cinnamic acid and *Xenorhabdus szentirmaii* metabolites synergize the potency of some commercial fungicides. **J Invertebr Pathol**, v. 145, p. 1–8, 2017.

HAZIR, S. et al. Thermo-stability, dose effects and shelf-life of antifungal metabolite-containing supernatants produced by *Xenorhabdus szentirmaii*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 150, p. 297–306, 2018.

HINCHLIFFE, S.J. et al. Insecticidal Toxins from the *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* Bacteria. **The Open Toxinology Journal**, v. 3, p. 83-100, 2010.

HYRŠL, P. et al. Silkworm (*Bombyx mori*) hemocytes do not produce reactive oxygen metabolites as a part of defense mechanisms. **Folia Microbiol**, v. 49, p. 315–319, 2004.

ISAACSON, P.J.; WEBSTER, J.M. Antimicrobial activity of *Xenorhabdus* sp. RIO (Enterobacteriaceae), symbiont of the entomopathogenic nematode, *Steinernema riobrave* (Rhabditida: Steinernematidae). **J Invertebr Pathol.**, v. 79, n. 3, p. 146-53, 2002.

ISHIBASHI, N.; KONDO, E. Behavior of infective juveniles. In: Gaugier, R.; Kaya, H. K. (Eds). Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. CRC Press, Boca Raton, FL.1990, p.139-152.

JARVIS, W.R.; SHOEMAKER, R.A. Taxonomic status of *Fusarium oxysporum* causing foot and root rot of tomato. **Phytopathology**, v. 68, p. 1679-1680, 1978.

JI, D. et al. Identification of an antibacterial compound, benzylideneacetone, from *Xenorhabdus nematophila* against major plant-pathogenic bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 239, n. 2, p. 241-248, 2004.

JOYCE, S.A. et al. Bacterial Biosynthesis of a Multipotent Stilbene. **Angewandte Chemie**, v. 47, n. 10, 2008.

JOYCE, S.A.; LANGO, L.; CLARKE, D.J. The regulation of secondary metabolism and mutualism in the insect pathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens*. **Advances in Applied Microbiology**, v. 76, p. 1-25, 2011.

KAYA, H, K.; GAUGLER, R. Entomopathogenic nematodes. **Annual Review of Entomology**. v. 38, p. 181-206, 1993.

KHAN, S.N. *Macrophomina phaseolina* as causal agent for charcoal rot of sunflower. **Mycopath**, v. 5, n. 2, p. 111-118, 2007.

KIRKUP, B. C. Jr. Bacteriocins as oral and gastrointestinal antibiotics: Theoretical considerations, applied research, and practical applications. **Curr. Med. Chem.**, v. 13, n. 27, p. 3335–3350, 2006.

LALRAMCHUANI, M. et al. Characterization and screening of antifungal activity of bacteria associated with entomopathogenic nematodes from Mizoram, North-Eastern India. **Journal of Environmental Biology**, v. 41, p. 942-950, 2020.

LAMBALOT, R.H. et al. A new enzyme superfamily - the phosphopantetheinyl transferases. **Chem Biol.**, v. 3, n. 11, p. 923-36, 1996.

LE TOURNEAU, D. Morphology, cytology, and physiology of *Sclerotinia* species in culture. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 69, p. 887-890, 1979.

LEYVA-MIR, S.G. et al. Caracterización morfológica y molecular de aislados de *Macrophomina phaseolina* asociados a caña de azúcar en México. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 47, n. 2, p. 143-147, 2015.

LI, J. et al. Antimicrobial metabolites from a bacterial symbiont. **J. Nat. Prod.**, v. 58, p. 1081-1085, 1995.

LI, J.; CHEN, G.; WEBSTER, J. M. Nematophin, a novel antimicrobial substance produced by *Xenorhabdus nematophilus* (Enterobacteriaceae). **Can. J. Microbiol.**, v. 43, p.770–773, 1997a.

LI, J., CHEN, G., WEBSTER, J. M. Synthesis and antistaphylococcal activity of nematophin and its analogs. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 7, p. 1349–1352, 1997b.

LUNAU, S. et al. Establishment of Monoxenic Inocula for Scaling Up *in vitro* Cultures of the Entomopathogenic Nematodes *Steinernema* spp. and *Heterorhabditis* spp. **Nematologica**, v. 39, p. 385-399, 1993.

MARTENS, E.C.; GOODRICH-BLAIR, H. The *Steinernema carpocapsae* intestinal vesicle contains a subcellular structure with which *Xenorhabdus nematophila* associates during colonization initiation. **Cell Microbiol.**, v. 7, n. 12, p. 1723-35, 2005.

MARTINS, P. et al. Persistence in phytopathogenic bacteria: Do we know enough? **Front Microbiol**, v. 9, n.1099, 2018.

MASSCHELEIN, J. et al. A PKS/NRPS/FAS hybrid gene cluster from *Serratia plymuthica* RVH1 encoding the biosynthesis of three broad spectrum, Zeamine-related antibiotics. **PLOS ONE**, v. 8, n. 1, p. e54143, 2013.

MASSÉ, E.; GOTTESMAN, S. A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v.99, n. 7, p. 4620-5, 2002.

MAYEA-SILVERIO, S., PADRON-SOROA, J. Bacterias y Hongos Fitopatógenos. Editorial Pueblo y Educación. La Habana, Cuba. P, 54, 1983.

MCINERNEY, B.V. et al. Biologically Active Metabolites from *Xenorhabdus* spp., Part 1. Dithiolopyrrolone Derivatives with Antibiotic Activity. **J. Nat. Prod.**, v. 54, n. 3, p. 774–784, 1991a.

MCINERNEY, B.V. et al. Biologically active metabolites from *Xenorhabdus* spp. Part 2. Benzopyran-1-one derivatives with gastroprotective activity. **J Nat Prod**, v. 54, p. 785–795, 1991b.

MIHAIL, J.D. *Macrophomina phaseolina*: Spatio-Temporal Dynamics of Inoculum and of Disease in a Highly Susceptible Crop. **Phytopathology**, v. 79, n. 8, p. 848-855, 1989.

MØLLER, T. et al. Hfq: a bacterial Sm-like protein that mediates RNA-RNA interaction. **Mol Cell.**, v. 9, n. 1, p. 23-30, 2002.

MONA, H. A.; ALY, N. A. H. Insecticidal activity and genetic characterization of four bacterial isolates of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* associated with entomopathogenic nematodes. **Pest Technol.**, v. 3, n. 1, p. 50–57, 2009.

MYCOBANK. *Macrophomina phaseolina*. Disponível em: <https://www.mycobank.org/page/Name%20details%20page/name/macrophomina%20phaseolina>. Acesso em: 11 abr. 2023.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **J. Nat. Prod.**, v. 75, p. 311–335, 2012.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **J. Nat. Prod.**, n. 79, p.629-661, 2016.

OLIVAIN, C.; ALABOUVETTE, C. Process of tomato root colonization by a pathogenic strain of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in comparison with a non-pathogenic strain. **New Phytol.**, v. 141, p. 497-510, 1999.

OTOYA-MARTINEZ, N. et al. Disease caused by *Neofusicoccum parvum* in pruning wounds of grapevine shoots and its control by *Trichoderma* spp. and *Xenorhabdus szentirmaii*. **Fungal Biology**, v. 127, n. 1-2, p. 865-871, 2023.

PAIK, S. et al. Unusual cytotoxic phenethylamides from *Xenorhabdus nematophilus*. **Bull. Korean Chem. Soc.**, v. 22, p. 372–374, 2001.

PAUL, V.J. et al. Antibiotics in microbial ecology. **J Chem Ecol**, v. 7, p. 589–597, 1981.

PIEL, J. Metabolites from symbiotic bacteria. **Nat. Prod. Rep.**, v. 21, p. 519-538, 2004.

POINAR JR., G. O. Biology and taxonomy of Steinernematidae and Heterorhabditidae. In: GAUGLER, R.; KAYA, H. K. **Entomopathogenic Nematodes in Biological Control**, Boston: CRC Press. 25. 1990, p.23-62.

PURDY, L.H. *Sclerotinia sclerotiorum*: history, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution, and impact. **Phytopathology**, Lancaster, v. 69, p. 875- 880. 1979.

RICHARDSON, W.H.; SCHMIDT, T.M.; NEALSON, K.H. Identification of an anthraquinone pigment and a hydroxystilbene antibiotic from *Xenorhabdus luminescens*. **Appl Environ Microbiol.**, v. 54, n. 6, p. 1602-5, 1988.

ROCHA, R. P. **Manejo da podridão de *Sclerotinia* e míldio (*Bremia lavytae*) na cultura de alface**. 2007. 95 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2007.

ROMBY, P.; VANDENESCH, F.; WAGNER, E.G.H. The role of RNAs in the regulation of virulence-gene expression. **Curr Opin Microbiol**, v. 9, p. 229–236, 2006.

RUWIZHI, N.; ADERIBIGBE, B.A. Cinnamic acid derivatives and their biological efficacy. **Int J Mol Sci**, v. 21, n. 16, p. 5712, 2020.

SAITO, S. et al. *Botrytis californica*, a new cryptic species in the *B. cinerea* species complex causing gray mold in blueberries and table grapes. **Mycologia**, v. 108, n. 2, p. 330-343, 2016.

SCHUMACHER, J. How light affects the life of *Botrytis*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 106, p. 26-41, 2017.

SCHUMANN, G.L.; D'ARCY, C.J. Essential Plant Pathology. The American Phytopathological Society: Saint Paul, 2007. 338 p.

SEO, S. et al. Phospholipase A2 inhibitors synthesized by two entomopathogenic bacteria, *Xenorhabdus nematophila* and *Photorhabdus temperate* subsp. *temperata*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 78, p. 3816–3823, 2012.

SERGEANT, M. et al. Identification, typing, and insecticidal activity of *Xenorhabdus* isolates from entomopathogenic nematodes in United Kingdom soil and characterization of the xpt toxin loci. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 72, p. 5895–5907, 2006.

SHAPIRO-ILAN, D. I.; HAZIR, S.; GLASER, I. Advances in Use of Entomopathogenic Nematodes in Integrated Pest Management. In Integrated Management of Insect Pests: Current and Future Developments (eds Kogan, M. & Heinrichs, E. A.) 91–105 (Burleigh Dodds Science Publishing, 2020).

SHARMA, K. et al. Analytical Characterization of Secondary Metabolites from Indian *Xenorhabdus* Species the Symbiotic Bacteria of Entomopathogenic Nematode (*Steinernema* spp.) as Antifungal Agent. **Natl. Acad. Sci. Lett.**, v. 39, p. 175–180, 2016.

SHARRAR, A.M. et al. Bacterial Secondary Metabolite Biosynthetic Potential in Soil Varies with Phylum, Depth, and Vegetation Type. **ASM Journals mBIO**, v. 11, n. 3, 2020.

SHI, Y.M.; BODE, H.B. Chemical language and warfare of bacterial natural products in bacteria-nematode-insect interactions. **Nat. Prod. Rep.**, v. 35, n. 4, p. 309–335, 2018.

SHI, Y. M. et al. Global analysis of biosynthetic gene clusters reveals conserved and unique natural products in entomopathogenic nematode-symbiotic bacteria. **Nat. Chem.**, v. 14, p. 701-712, 2022.

SHAPIRO-ILAN, D.I.; BOCK, C.H.; HOTCHKISS, M.W. Suppression of pecan and peach pathogens on different substrates using *Xenorhabdus bovienii* and *Photorhabdus luminescens*. **Biological Control**, v. 77, p. 1-6, 2014.

SHI, D. et al. Stilbene derivatives from *Photorhabdus temperata* SN259 and their antifungal activities against phytopathogenic fungi. **J Agric Food Chem**, v. 65, n. 1, p. 60–65, 2017.

SILVA, L. C. A.; LEAL, N. C.; XAVIER, D. E. An update on the role of Hfq RNA Chaperone in resistance and virulence of *Acinetobacter baumannii*. **Revista Prevenção De Infecção E Saúde**, v. 8, n. 1, 2022.

SILVA, P. H. da. **Reação de linhagens de feijão comum e agressividade de isolados de *Sclerotinia sclerotiorum*. 2013. 60f.** Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

SOBRERO, P.; VALVERDE, C. The bacterial protein Hfq: much more than a mere RNA-binding factor. **Crit Rev Microbiol.**, v. 38, n. 4, p. 276-299, 2012.

SONGA, W. et al. Screening common bean accessions for resistance to charcoal rot (*Macrophomina phaseolina*) in Eastern Kenya. **Experimental Agriculture**, v. 33, p. 459-468, 1997.

STEADMAN, J.R. White mold - a serious yield-limiting disease of bean. **Plant Disease**. v. 67, p. 346-350, 1983.

STRANGE, R.N.; SCOTT, P.R. Plant disease: a threat to global food security. **Annu Rev Phytopathol**, v. 43, n. 1, p. 83-116, 2005.

STRAUCH, O.; EHLERS, R.U. Food signal production of *Photorhabdus luminescens* inducing the recovery of entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis* spp. in liquid culture. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 50, p. 369-374, 1998.

STROBEL, G. et al. Natural Products from Endiohytic Microorganisms. **Journal of Natural Products**, v. 67, pp. 257-268, 2004.

SUÁREZ, F. Persistencia y capacidad infectiva del hongo *Fusarium oxysporum* f.sp *melonis* en residuos vegetales de melón. 2002. Tese (Doutorado em Microbiología). Facultad de Ciencias, UNIVERSIDAD DE ALMERÍA, España, 2002.

SUNDAR, L.; CHANG, F. N. Antimicrobial activity and biosynthesis of indole antibiotics produced by *Xenorhabdus nematophilus*. **J. Gen. Microbiol.**, v. 139, p. 3139-3148, 1993.

TOBIAS, N.J., et al. *Photorhabdus*-nematode symbiosis is dependent on hfq-mediated regulation of secondary metabolites. **Environ Microbiol**, v. 19, p. 119-129, 2017.

VANITHA, L. et al. Symbiotic bacteria, *Xenorhabdus* spp. of entomopathogenic nematodes: source of antifungal compounds Against four plant pathogens. **Asian Journal of Bio Science**, v. 5, n. 2, p. 174-177, 2010.

VASEBI, Y.; SAFAIE, N.; ALIZADEH, A. Biological control of soybean charcoal root rot disease using bacterial and fungal antagonists *In Vitro* and greenhouse condition. **Journal of Crop Protection**, v. 2, n. 2, p. 139-150, 2013.

- VÁSQUEZ-RAMÍREZ, L.M.; CASTAÑO-ZAPATA, J. Manejo integrado de la marchitez vascular del tomate. **Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient.**, V. 20, n. 2, p. 363-374, 2017.
- VELOSO, J.; VAN KAN, J.K.L. Many Shades of Grey in Botrytis–Host Plant Interactions. **Trends in Plant Science**, v. 23, n. 7, p. 613-622, 2018.
- VENNETT, J, R. Proceedings of the *Sclerotinia* workshop. Minnesota: Fargo, 354 p. 1998.
- VITTA, A. et al. Larvicidal activity of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* bacteria against *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. **Asian Pac. J. Trop. Biomed.**, v. 8, p. 31–36, 2018.
- WANG, Y.; GAUGLER, H. Host and penetration site location by entomopathogenic nematodes against Japanese beetle larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 72, p. 313-318, 1998.
- WEBSTER, N. S. et al. A spongin-boring alpha-proteobacterium is the etiological agent of disease in the Great Barrier Reef sponge *Rhopaloeides odorabile*. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, v. 232, p. 305–309, 2002.
- WENDLAND, A.; LOBO JÚNIOR, M.; FARIA, J.C. Manual de identificação das principais doenças do feijoeiro-comum. Brasília: Embrapa, 2018, 49p.
- WENSKI, S.L. et al. Fabclavine biosynthesis in *X. szentirmaii*: shortened derivatives and characterization of the thioester reductase FclG and the condensation domain-like protein FclL. **J Ind Microbiol Biotech**, v. 46, n. 3–4, p. 565–72, 2019.
- WENSKI, S.L. et al. Fabclavine diversity in *Xenorhabdus* bacteria. **Beilstein J. Org. Chem.**, v. 16, p. 956-965, 2020.
- WILLIAMSON, B., et al. Botrytis cinerea: the cause of grey mould disease. **Mol. Plant Pathol.**, v. 8, p. 561-580, 2007.
- WONG, F.T., KHOSLA, C. Combinatorial biosynthesis of polyketides--a perspective. **Curr Opin Chem Biol.**, v. 16, n. 1-2, pp. 117-23, 2012.
- WORKNEH, F.; YANG, X. B. Prevalence of Sclerotinia stem rot of soybeans in the North-Central United States in relation to tillage, climate, and latitudinal positions. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 90, n. 12, p. 1375-1382, 2000.
- WOUTS, W.M. *Steinernema* (Neoaplectana) and *Heterorhabditis* species. In: NICKLE, W.R. (ed.). Manual of agricultural nematology. New Yourk: Marcel Dekker, 855-97p., 1991.

YANG, X. et al. Antifungal activity of xenocoumacin 1 from *Xenorhabdus nematophilus* var. *pekingensis* against *Phytophthora infestans*. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 27, n. 3, p. 523–528, 2011.

ZAMBOLIM, L.; CHAVES, G.M. Doenças do feijoeiro e seu controle. **Informe Agropecuário**, v. 4, n. 46, p. 50-63, 1978.

ZHANG, S. et al. Nematophin, an antimicrobial dipeptide compound from *Xenorhabdus nematophila* YL001 as a potent biopesticide for *Rhizoctonia solani* control. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. article 1765, 2019.

ZHANG, X. Y. et al. Diversity and antimicrobial activity of culturable fungi isolated from six species of the South China Sea gorgonians. **Microb. Ecol.**, v. 64, p. 617–627, 2012.

ZHOU, T. et al. Global transcriptional responses of *Bacillus subtilis* to xenocoumacin 1. **J. Appl. Microbiol.**, v. 111, p. 652–662, 2011.