



**AVALIAÇÃO DE BACTÉRIAS SIMBIONTES DE  
NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS E SEUS FILTRADOS  
NO MANEJO DE *Sclerotinia sclerotiorum* DE SOJA**

**JULIE GIOVANNA CHACON OROZCO**

**Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo**  
**Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios**  
**Instituto Biológico**  
**Programa de Pós-Graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e**  
**Ambiental no Agronegócio**

**AVALIAÇÃO DE BACTÉRIAS SIMBIONTES DE NEMATÓIDES**  
**ENTOMOPATOGÊNICOS E SEUS FILTRADOS NO MANEJO DE**  
*Sclerotinia sclerotiorum* **DE SOJA**

**JULIE GIOVANNA CHACON OROZCO**

Tese apresentada ao Instituto Biológico, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, para defesa de Doutorado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

**SÃO PAULO**  
**2018**

**JULIE GIOVANNA CHACON OROZCO**

**AVALIAÇÃO DE BACTÉRIAS SIMBIONTES DE NEMATOIDES  
ENTOMOPATOGÊNICOS E SEUS FILTRADOS NO MANEJO DE  
*Sclerotinia sclerotiorum* DE SOJA**

Tese apresentada ao Instituto Biológico, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, para defesa de Doutorado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.

Orientador:  
Professor Dr. Ricardo Harakava

Co-orientador:  
Professor Dr. Luis G. Leite

**SÃO PAULO**

**2018**

Eu **Julie Giovanna Chacon Orozco**, 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**

---

Chacon-Orozco, Julie Giovanna.

Avaliação de bactérias simbiotas de nematoides entomopatogênicos e seus filtrados no manejo de *Sclerotinia sclerotiorum* de soja. / Julie Giovanna Chacon Orozco. - São Paulo, 2018.

82 p.

doi: 10.31368/PGSSAAA.2018T.JC018

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

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.

Linha de pesquisa: Manejo integrado de pragas e doenças em ambientes rurais e urbanos.

Orientador: Ricardo Harakava.

Versão do título para o inglês: Evaluation of the symbiotic bacteria of entomopathogenic nematodes and their cell-free filtrates for the control of *Sclerotinia sclerotiorum* in soy seeds.

1. Mofo branco 2. *Steinernema* 3. *Xenorhabdus* 4. *Heterorhabditis* 5. *Photorhabdus* I. Chacon-Orozco, Julie Giovanna II. Harakava, Ricardo III. Instituto Biológico (São Paulo) IV. Título.

*IB/Bibl./2018/018*

---



SECRETARIA DE AGRICULTURA E  
ABASTECIMENTO  
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS  
AGRONEGÓCIOS  
INSTITUTO BIOLÓGICO



Pós-Graduação  
Av. Cons. Rodrigues Alves 1252 Caixa Postal 12898  
CEP 04010-970 São Paulo – SP  
pg@biologico.sp.gov.br

Curso reconhecido de acordo com o disposto na Portaria MEC Nº612- D.O.U.2 5/06/2007

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Julie Giovanna Chacon Orozco

**Título: Avaliação de bactérias simbiotes de nematoides entomopatogênicos e seus  
filtrados no manejo de *Sclerotinia sclerotiorum* de soja**

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Harakava

Tese apresentada 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.

Aprovada em 14 de dezembro de 2018

Banca Examinadora

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr.: Ricardo Harakava  
Instituição: Instituto Biológico

Assinatura: \_\_\_\_\_

Profa. Dra.: Suzete A. Destefano  
Instituição: Instituto Biológico

Assinatura: \_\_\_\_\_

Profa. Dra.: Margarida F. Ito  
Instituição: Instituto Agronomico de Campinas

Assinatura: \_\_\_\_\_

Dr: Mariana Ferreira Tonin  
Instituição: Instituto Biológico

Assinatura: \_\_\_\_\_

Dra.: Silvania Furlan  
Instituição: Instituto Biológico

## AGRADECIMENTOS

Ao meus orientadores o *Prof. Dr. Ricardo Harakava* (IB-São Paulo), por acreditar no meu trabalho;

Ao *Prof. Dr. Luís Garrigós Leite* (IB-Campinas), pela dedicação, amizade, apoio e guia no desenvolvimento do trabalho e a redação da tese;

Ao *Prof. Dr. Cesar Junior Bueno* (IB-Campinas), pelos ensinamentos, as correções e apoio nas técnicas de fitopatologia;

Aos colegas e amigos do Laboratório de Controle biológico, do IB - Campinas: *Nathalie, Lizandra e Raphael*, que me ajudaram no laboratório e me permitiram fazer parte de suas vidas, pois formam parte da minha família no Brasil;

A meus *Pais e familiares* que fizeram de mim a pessoa que sou hoje, e devo tudo a eles e seus ensinamentos, e independente da distância sempre me incentivaram;

Agradeço ao *Fernando Berton Baldo*, parceiro de vida, por todo o carinho e apoio incondicional. É um prazer poder estar juntos e trilhar nossos caminhos com a nossa filha, repassando todo nosso amor e conhecimento;

Por último, um agradecimento à minha bebê *Sara Chacon Baldo*, a quem dedico em especial este trabalho, pelo privilégio da maternidade e que deu um sentido especial a minha vida e embora pequena em idade foi grande em pensamento, pois é minha inspiração para continuar lutando dia a dia pelo que eu quero, e finalizar o doutorado sem nenhum contratempo.

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

Obrigada!

## RESUMO

CHACÓN-OROZCO, Julie. **Avaliação de bactérias simbiotes de nematoides entomopatogênicos e seus filtrados no manejo de *Sclerotinia sclerotiorum* de soja.** 2018. 82 p. 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, São Paulo, 2018.

A soja é o principal produto agrícola de exportação do Brasil. O potencial de rendimento da soja pode ser afetado por doenças como mofo branco, causado pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, podendo acarretar perdas de até 70%. Em virtude do difícil controle por fungicidas, os agentes biológicos podem ser um método alternativo para seu controle. As bactérias *Xenorhabdus* e *Photorhabdus* caracterizam-se pela produção de compostos antimicrobianos, que podem servir como fonte potencial de novos controladores biológicos de doenças em plantas. O presente trabalho teve como objetivo avaliar bactérias simbiotes de nematoides entomopatogênicos e seus filtrados, visando inibir o crescimento de *S. sclerotiorum* em meio de cultura e em sementes de soja. Foram avaliados *in vitro* critérios de inibição do crescimento micelial e da germinação miceliogênica, causada por contato direto dos filtrados e os compostos orgânicos voláteis (COVs) produzidos pelas bactérias. Foram realizados também testes *in vivo* avaliando o efeito da cultura da bactéria, seus filtrados e os COVs sobre a germinação de sementes de soja, com ou sem a inoculação de *S. sclerotiorum*, além de testes de penetração endofítica e sistêmica da bactéria e seus metabólitos secundários em plantas de soja. Os filtrados da bactéria *X. szentirmaii* PAM 25 mostraram ação fungicida sobre o micélio e os escleródios de *S. sclerotiorum*. Compostos voláteis e não voláteis, produzidos pela bactéria, causaram a esterilização do micélio do fungo e quando avaliados *in vivo* não causaram danos ao processo de germinação da semente, nem ao desenvolvimento da planta. Tanto as bactérias simbiotes, como seus metabólitos secundários, não conseguiram penetrar na planta. Estes resultados evidenciam a ação da cultura da bactéria, assim como dos seus metabólitos líquidos e voláteis na inibição das estruturas do fungo *S. sclerotiorum*, bem como na proteção de sementes, o que sugere a possibilidade de uso dessa bactéria como agente biológico potencial no manejo do mofo branco em soja.

**PALAVRAS-CHAVE:** Mofo branco, *Steinernema*, *Xenorhabdus*, *Heterorhabditis*, *Photorhabdus*, *Glycine max*, controle biológico.

## ABSTRACT

CHACÓN-OROZCO, Julie. **Evaluation of the symbiotic bacteria of entomopathogenic nematodes and their cell-free filtrates for the control of *Sclerotinia sclerotiorum* in soy seeds.** 2018. 82 p. Dissertation (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, São Paulo, 2018.

Soybeans are Brazil's main export agricultural product. The yield potential of soybeans can be affected by diseases such as white mold caused by the fungus *Sclerotinia sclerotiorum*, which can lead to losses of up to 70%. Due to the difficult control by fungicides, biological agents may be an alternative method for their control. The bacteria *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* are characterized by the production of antimicrobial compounds, which can serve as potential sources of new biological controllers of plant diseases. The present work had as objective to evaluate the symbiotic bacteria of entomopathogenic nematodes and their filtrates, aiming to inhibit the growth of *S. sclerotiorum* in culture medium and in soybean seeds. Criteria for inhibition of mycelial growth and myceliogenic germination were evaluated in vitro, caused by direct contact of the filtrates and the volatile organic compounds (VOCs) produced by the bacteria. In vivo tests were also carried out to evaluate the effect of bacterial culture, its filtrates and VOCs on the germination of soybean seeds, with or without inoculation of *S. sclerotiorum*, as well as tests of endophytic and systemic penetration of the bacteria and their metabolites in soybean plants. The filtrates of the bacterium *X. szentirmaii* PAM 25 showed fungicidal action on the mycelium and the sclerotia of *S. sclerotiorum*. Volatile and non-volatile compounds, produced by the bacterium, caused sterilization of the mycelium of the fungus and when evaluated in vivo did not cause damage to the germination process of the seed, nor to the development of the plant. Both symbiotic bacteria and their secondary metabolites failed to penetrate the plant. These results show the action of bacterial culture, as well as its liquid and volatile metabolites in inhibiting *S. sclerotiorum* fungus structures, as well as in seed protection, which suggests the possibility of using this bacterium as a potential biological agent in the management of white mold on soybeans.

**KEYWORDS:** White mold, *Steinernema*, *Xenorhabdus*, *Heterorhabditis*, *Photorhabdus*, *Glycine max*, biological control.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de infecção de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> na cultura de soja.....	6
Figura 2. Formação de escleródios em caule de soja por <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> . .....	7
Figura 3. Bactérias colonizando diferentes lugares no intestino do nematoide hospedeiro. ....	13
Figura 4. Ciclo de vida dos nematoides entomopatogênicos.....	15
Figura 5. Estrutura de vários antibióticos produzidos pelas bactérias <i>Xenorhabdus</i> spp. e <i>Photorhabdus</i> spp. ....	19
Figura 6. Estrutura de vários antibióticos produzidos pelas <i>Xenorhabdus</i> spp.....	20
Figura 7. Estrutura de vários antibióticos produzidos pelas bactérias <i>Photorhabdus</i> spp. ....	22
Figura 8. Procedimento para isolamento de bactérias simbiotes de NEPs.....	27
Figura 9. Obtenção dos filtrados produzidos pelas bactérias simbiotes de NEPs .....	28
Figura 10. Seleção do melhor isolado de bactéria simbiote de NEPs para controle do crescimento micelial de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> . .....	29
Figura 11. Avaliação da inibição do crescimento micelial e da germinação miceliogênica dos escleródios de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> . .....	31
Figura 12. Avaliação do efeito <i>in vitro</i> dos compostos orgânicos voláteis de <i>Xenorhabdus szentirmaii</i> PAM25 no micélio e nos escleródios de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> . .....	33
Figura 13. Avaliação do efeito dos compostos orgânicos voláteis de <i>Xenorhabdus szentirmaii</i> PAM25 nas sementes de soja com e sem presença de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> . .....	35
Figura 14. Avaliação do efeito dos filtrados de <i>Xenorhabdus szentirmaii</i> PAM25 revestidos em sementes de soja inoculadas com <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> sobre a sua germinação. ....	36
Figura 15. Avaliação do efeito da bactéria <i>Xenorhabdus szentirmaii</i> PAM25 revestida em sementes de soja inoculadas com <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> sobre a sua germinação .....	37
Figura 16. Avaliação da capacidade de penetração endofítica da bactéria <i>Xenorhabdus szentirmaii</i> PAM25 em plantas de soja .....	38
Figura 17. Avaliação do efeito inibitório do crescimento micelial de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , a partir de exsudados de plantas de soja regadas com filtrados (MS) da bactéria <i>Xenorhabdus szentirmaii</i> PAM 25.....	39
Figura 18. Porcentagem de inibição <i>in vitro</i> do crescimento micelial de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , de filtrados de bactérias simbiotes de nematoides entomopatogênicos em relação ao tratamento controle. ....	40

Figura 19. Porcentagem de inibição do crescimento micelial (A) e e da inibição da germinação miceliogênica de escleródios (B) de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> em meios de cultura contendo diferentes tempos de produção de filtrados da bactéria (MS) <i>Xenorhabdus szentirmaii</i> PAM 25 bem como diferentes concentrações destes metabólitos incorporados ao meio. ....	42
Figura 20. Porcentagem de inibição do crescimento micelial (após 4 dias de crescimento (A) e da inibição da germinação miceliogênica de escleródio (após 6 dias de crescimento) (B), expostos durante 14 dias aos compostos orgânicos voláteis (COVs) de <i>Xenorhabdus szentirmaii</i> PAM 25. ....	45
Figura 21. Porcentagem de germinação das sementes de soja sem e com inoculação do fungo <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , que ficaram expostas por 14 dias aos compostos orgânicos voláteis (COVs) da bactéria <i>Xenorhabdus szentirmaii</i> PAM 25.....	49
Figura 22. A) Sementes de soja com <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , e B) Sementes de soja sem <i>S. sclerotiorum</i> , expostas por 14 dias aos COVs produzidos pela bactéria <i>Xenorhabdus szentirmaii</i> PAM25.....	49
Figura 23. Porcentagem de germinação de sementes de soja revestidas com filtrados (MS) da bactéria <i>X. szentirmaii</i> PAM 25 e inoculadas ou não com o fungo <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (Ss).....	50
Figura 24. Comparação da germinação das sementes de soja revestidas com 10%, 33% e 100% com filtrados (MS) da bactéria <i>Xenorhabdus szentirmaii</i> e inoculadas ou não com o fungo <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (Ss) e os controles (meio TSB e H <sub>2</sub> O). ....	51
Figura 25. Porcentagem de germinação de sementes sem a presença de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> e com a presença do fungo (aos 7 dias) (A) e plantas saudias desenvolvidas (aos 14 dias) (B). ....	53
Figura 26. Tamanho (cm) das plantas de soja (A) e sua biomassa fresca (g) (B) (21 dias após tratamento com suspensão de bactéria). ....	54
Figura 27. Comparação de crescimento das plântulas nos diferentes tratamentos, após 21 dias de desenvolvimento. Inoculadas com <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (Esquerda) e sem Ss (Direita). A); Sementes tratadas com 10% bactéria; B) tratamento com 33% bactéria; C) tratamento com 100% bactéria; D) tratamento controle H <sub>2</sub> O; E) tratamento controle TSB e F) tratamento com fungicida. ....	55
Figura 28. Crescimento micelial de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> em meio de cultura BDA com partes da planta e seus exsudados. (a) raiz, (b) caule e (c) folha. ....	56

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Espécies da bactéria <i>Xenorhabdus</i> identificadas até 2018, os nematoides do gênero <i>Steinernema</i> dos quais foram isoladas e sua origem geográfica.....	17
Tabela 2. Espécies da bactéria <i>Photorhabdus</i> identificadas até 2018, os nematoides do gênero <i>Heterorhabditis</i> dos quais foram isoladas e sua origem geográfica. ....	18
Tabela 3. Identificação e procedência dos isolados de nematoides entomopatogênicos (NEPs) e suas bactérias simbiontes. ....	26
Tabela 4, Número e diâmetro de escleródios produzidos após 20 dias de crescimento micelial de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> no meio de cultura BDA com diferentes tempos de produção e concentrações de metabólitos secundários da bactéria <i>Xenorhabdus szentirmaii</i> PAM 25 ....	43
Tabela 5. Escleródios produzidos após 20 dias de crescimento micelial de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> no meio de cultura BDA com diferentes concentrações de compostos orgânicos voláteis (COVs) da bactéria <i>Xenorhabdus szentirmaii</i> PAM 25 .....	45

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AN</b>	Ágar nutriente
<b>°C</b>	Graus Celsius
<b>BDA</b>	Meio batata dextrose ágar
<b>COVs</b>	Compostos Orgânicos Voláteis
<b>H</b>	Horas
<b>JI</b>	Juvenil infetivo
<b>L</b>	Litro
<b>LB</b>	Meio Luria-Bertani
<b>NEPs</b>	Nematoides Entomopatogênicos
<b>mL</b>	Mililitros
<b>min</b>	Minutos
<b>MB</b>	Mofa branco
<b>MS</b>	Metabólitos secundários
<b>NBTA</b>	Meio Azul de Bromotimol
<b>UFC</b>	Unidades Formadoras de Colônias
<b>Rpm</b>	Rotações por minuto
<b>TSB</b>	Caldo Triptona Soja
<b>µL</b>	Micro litro

## SUMÁRIO

RESUMO .....	x
ABSTRACT .....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS .....	4
2.1. Geral.....	4
2.2. Específicos .....	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	5
3.1. Soja .....	5
3.2. Mofo branco e ciclo da doença .....	5
3.3. Sintomas do mofo branco .....	7
3.4. Mofo branco no Brasil .....	7
3.5. Manejo do mofo branco .....	8
3.6. Controle químico do mofo branco em soja.....	8
3.7. Controle cultural da doença mofo branco em soja.....	9
3.8. Controle Biológico da doença mofo branco em soja.....	10
3.9. Antibiose.....	11
3.10. Bactérias Simbiontes de nematoides entomopatogênicos (NEPs).....	12
3.11. Ciclo de vida do complexo NEP-Bactéria .....	13
3.12. Diversidade das bactérias simbiontes .....	16
3.13. Metabólitos secundários produzidos pelas bactérias simbiontes .....	18
3.14. As bactérias simbiontes e seus metabólitos secundários no controle biológico de doenças .....	22
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1. Local do experimento .....	25
4.2. Isolado de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	25
4.3. Isolamento das bactérias simbiontes de nematoides entomopatogênicos.....	25

4.4.	Obtenção dos filtrados produzidos pelas bactérias simbiotes de NEPs.....	27
4.5.	Seleção do melhor isolado de bactéria simbiote de NEPs para controle do crescimento micelial de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	28
4.6.	Inibição <i>in vitro</i> do crescimento do micélio e da germinação miceliogênica de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , em meio de cultura contendo filtrados de <i>Xenorhabdus szentirmaii</i> PAM25 .....	29
4.7.	Ação <i>in vitro</i> dos compostos orgânicos voláteis de <i>Xenorhabdus szentirmaii</i> PAM25, sobre o crescimento micelial e a produção de escleródios de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	32
4.8.	Efeito dos compostos orgânicos voláteis, produzidos pela bactéria <i>Xenorhabdus szentirmaii</i> PAM 25, na germinação de sementes de soja com e sem presença de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	34
4.9.	Efeito dos filtrados de <i>Xenorhabdus szentirmaii</i> PAM25 revestidos em sementes de soja, infestadas com o fungo <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , sobre a sua germinação .....	35
4.10.	Ação da bactéria <i>Xenorhabdus szentirmaii</i> PAM25 revestida em sementes de soja contendo o fungo <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> sobre a sua germinação.....	36
4.11.	Capacidade endofítica ou sistêmica de <i>Xenorhabdus szentirmaii</i> PAM 25 e seus metabólitos secundários em plantas de soja. ....	37
4.12.	Análise estatística .....	39
5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	40
5.1.	Seleção de filtrados produzidos pelos isolados de bactérias simbiotes de NEPs contra o crescimento micelial de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	40
5.2.	Inibição <i>in vitro</i> do crescimento micelial e da germinação dos escleródios de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , pelos filtrados de <i>Xenorhabdus szentirmaii</i> PAM25.....	41
5.3.	Efeito <i>in vitro</i> dos compostos orgânicos voláteis de <i>Xenorhabdus szentirmaii</i> PAM 25 no micélio e nos escleródios de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	45
5.4.	Efeito dos compostos orgânicos voláteis, produzidos pela bactéria <i>Xenorhabdus szentirmaii</i> PAM 25, na germinação de sementes de soja, com e sem presença de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	48
5.5.	Efeito dos filtrados da bactéria <i>Xenorhabdus szentirmaii</i> PAM25, revestidos em sementes de soja, contendo ou não o fungo <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	49

5.6. Efeito da bactéria <i>Xenorhabdus szentirmaii</i> PAM25 revestida em sementes de soja contendo o fungo <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> sobre a sua germinação.....	52
5.7. Capacidade endofítica e sistêmica de <i>Xenorhabdus szentirmaii</i> PAM 25 e seus metabólitos secundários em plantas de soja .....	55
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	57
7. CONCLUSÕES.....	58
8. BIBLIOGRAFIA.....	59
ANEXO A.....	77
ANEXO B.....	78
ANEXO C.....	79
ANEXO D.....	80
ANEXO E.....	81
ANEXO F.....	82

## 1. INTRODUÇÃO

O Agronegócio no Brasil tem uma expressiva participação na economia do país, representando cerca de 23,5% do produto interno bruto (PIB) em 2017 (IBGE, 2017). Aproximadamente 30% da população depende direta ou indiretamente da agricultura.

Estados Unidos da América e o Brasil são os principais produtores de soja do mundo. No Brasil, a safra 2017/2018, a cultura ocupou uma área plantada de 35,100 milhões de hectares, totalizando uma produção de 116,996 milhões de toneladas, com uma produtividade de 3.333 kg por hectare (CONAB, 2018). Segundo os dados divulgados pela Secretaria de Comércio Exterior, China (19.213,4 milhões de toneladas), Espanha (989,8 milhões de toneladas) e Tailândia (541,6 milhões de toneladas) foram os principais países importadores de soja em grão do Brasil em 2017 (SECEX, 2017).

A soja no Brasil é cultivada especialmente nas regiões Centro-Oeste e Sul. O grão é componente essencial na produção de farelo para rações animais (peixes e gado para o abate), uso na alimentação humana (leite de soja, molho de soja e tofu), e uso na indústria farmacêutica e siderúrgica (SBARDELOTTO; VILLAR, 2008). As áreas de cultivo e a produtividade da soja vêm crescendo ano após ano, graças ao apoio do governo, dos avanços tecnológicos, ao manejo e à eficiência dos produtores, e, também, ao forte aumento da demanda do grão como fonte barata de proteína e calorias para produção de ração animal (World Wide Fund for Nature - WWF, 2016).

Um dos problemas da expansão, sem controle da cultura de soja e, o desmatamento da maior parte do ecossistema, além de problemas sociais e ambientais como o declínio da fertilidade do solo, intoxicação de pessoas e animais por produtos tóxicos, expulsão de pequenos agricultores de suas terras, contaminação do solo e da água, erosão ou assoreamento dos rios, redução da biodiversidade e contribuição para a modificação do clima regional (PENGUE, 2004; GELDER; DROS, 2005; SCHLESINGER; NORONHA, 2006; SCHLESINGER et al., 2006).

Para manter o ritmo e a qualidade na produção, os desafios para sustentar este crescimento são tão grandes quanto à importância e a força da cultura para a balança comercial. O sistema de produção da soja tem pontos de perdas, devido a diferentes fatores em cada uma das etapas, seja por fatores incontrolláveis como condições climáticas e oscilações da economia mundial, assim como fatores controláveis, que vão desde as políticas de incentivo e infraestrutura de âmbito macropolítico, passando pelas questões de tecnologia, manejo,



aparecimento de novas pragas e doenças e investimentos na produção e na propriedade (IEAg/ABAG, 2016).

Entre as doenças que prejudicam a cultura da soja, destaca-se o mofo branco, cujo agente etiológico é o fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary (sin. *Whetzelinia sclerotiorum* (Lib.)), polífago (BOLAND; HALL, 1994), atacando cerca de 500 espécies, dentre elas a cultura do feijão, algodão, girassol, tomate, ervilha e alface. Em nível mundial (PURDY, 1979; BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006; SAHARAN; MEHTA, 2008) e nacional está entre os patógenos de maior importância econômica.

O controle do mofo branco deve ser realizado através da adoção de várias práticas que compõem o manejo integrado de doenças que, quando combinadas, ajudam a reduzir a taxa de progresso do inóculo (escleródios no solo), permitindo o aumento da produtividade e viabilizando a atividade agrícola em áreas com histórico da doença, mantendo assim, um nível abaixo do dano econômico (GÖRGEN et al., 2009). Como o mofo branco é uma doença que incide sobre várias outras culturas, é de fundamental importância a rotação e/ou sucessão de culturas em áreas infestadas com o fungo, intercalando-se culturas não hospedeiras como estratégia para reduzir o inóculo do patógeno. Outras medidas de manejo do mofo branco também devem ser adotadas de forma integrada, tais como a utilização de sementes certificadas, tratamento de sementes com fungicida, cobertura uniforme do solo com palhada, maior espaçamento entre linhas em áreas com histórico da doença, revolvimento do solo, controle de plantas daninhas, limpeza de implementos e colhedoras, e emprego de controle químico, por meio de pulverizações foliares, principalmente no período de maior suscetibilidade da planta de soja, ou seja, início da floração até início da formação de vagens (MEYER et al., 2014).

Atualmente não há cultivares de soja resistentes ao patógeno causador de mofo branco, que seria a medida mais viável economicamente para o controle do mesmo. Portanto, a Embrapa Soja e outras instituições vêm realizando pesquisas para descobrir fontes de genes de resistência e desenvolver variedades de soja geneticamente modificadas que permitam resistir ao ataque de *S. sclerotiorum*, além de estudos de microrganismos capazes de parasitar ou inibir os escleródios (ANDRADE et al., 2016).

Pesquisas realizadas nos últimos anos permitiram descobrir que muitos organismos bacterianos agem como agentes de controle biológico eficientes, com mínimo impacto sobre o meio ambiente e perigo aos consumidores (DILDEY et al., 2014). Esses microrganismos e seus metabólitos secundários (exoenzimas e/ou toxinas) têm grande potencial para o sistema agrícola e no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, biocontroladores e protetores de plantas (ZHOU et al., 2008; NEWMAN; CRAGG, 2012) e devem ser incluídos naqueles que são

aceitáveis como um produto orgânico. Portanto, tem aumentado o interesse pelo uso de microrganismos como agentes biológicos para proteger as culturas contra pragas e doenças.

As bactérias dos gêneros *Xenorhabdus* e *Photorhabdus* são Gram-negativas, simbiontes dos nematoides entomopatogênicos dos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis*, respectivamente. Essas bactérias caracterizam-se por produzir uma série de enzimas extracelulares, incluindo proteases, lipases, fosfolipases e DNases, que estão envolvidas no fornecimento de nutrientes para os nematoides entomopatogênicos e para as próprias bactérias (FORST; NEALSON, 1996). Estes compostos estruturalmente diversos têm potencial na atividade antimicrobiana, no desenvolvimento de novos agentes de controle biológico, além da vantagem de ser facilmente cultiváveis *in vitro*.

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a ação das bactérias simbiontes de nematoides entomopatogênicos e seus filtrados sobre o micélio e escleródios de *S. sclerotiorum* de soja, como uma alternativa no manejo sustentável do mofo branco.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Geral

Avaliar a inibição *in vitro* e *in vivo* do fungo *S. sclerotiorum* pela ação das bactérias simbiontes de nematoides entomopatogênicos e seus filtrados.

### 2.2. Específicos

- Comparar a ação inibitória *in vitro* dos filtrados produzidos pelas bactérias *Xenorhabdus* spp. e *Photorhabdus* spp.;
- Avaliar a ação inibitória *in vitro* dos filtrados e compostos voláteis produzidos pela bactéria *X. szentirmaii*, no micélio e nos escleródios de *S. sclerotiorum*;
- Avaliar o efeito dos compostos orgânicos voláteis de *X. szentirmaii* na germinação de sementes de soja contendo ou não micélio de *S. sclerotiorum*;
- Avaliar o efeito de *X. szentirmaii* e seus filtrados revestidas em sementes de soja, sobre sua germinação e ação contra o fungo *S. sclerotiorum*;
- Avaliar a capacidade de penetração endofítica e sistêmica da bactéria *X. szentirmaii* e seus metabólitos secundários em plantas de soja.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Soja

A soja (*Glicine max* (L.) Merrill) é uma espécie da família das leguminosas (Fabacea) de ciclo anual de 90 a 160 dias, cuja origem é do extremo Oriente e é considerada um dos produtos agrícolas de maior importância ao nível mundial. A planta é de porte ereto, que alcança entre 0,50 e 1,5 metros de altura. Quanto às folhas, são grandes e trifoliadas. As flores localizam-se nas axilas das folhas, são pequenas, podem apresentar coloração branca, púrpura diluída ou roxa e encontram-se agrupadas em inflorescências. A planta de soja possui vagens curtas, que contém no seu interior entre um a quatro grãos oleaginosos, com 20% de óleo (RIDNER, 2006).

#### 3.2. Mofo branco e ciclo da doença

Entre as doenças que incidem sobre a soja, o mofo branco, também conhecido como podridão branca da haste, ou podridão de esclerotínia, destaca-se como uma das mais importantes atualmente. A doença é causada pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary, pertencente ao Filo *Ascomycota*, Classe *Discomycetes*, Ordem *Helotiales* e família *Sclerotiniaceae*.

Este patógeno ataca cerca de 500 espécies de plantas, incluindo as de importância econômica como alface, algodão, batata, soja, canola, crotalária, ervilha, feijão, girassol, repolho, soja, tomate dentre outras (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006).

O fungo *S. sclerotiorum*, consegue permanecer no solo durante a entressafra na ausência de plantas hospedeiras, através de estruturas de resistência denominadas de escleródios. Estas estruturas estão compostas por uma massa de hifas, comumente arredondadas, e contêm substâncias de reserva que permitem ao fungo sobreviver por muito tempo, até que as condições ambientais sejam favoráveis à sua germinação, podendo ser por um período de 5 até 11 anos, conservando intacto seu poder patogênico (ROCHA, 2007).

O início do ciclo do mofo branco (Figura 1) pode depender das condições ambientais como temperatura e umidade do solo e da quantidade de nutrientes disponíveis no escleródio. A germinação dos escleródios pode ocorrer de duas maneiras: germinação miceliogênica ou germinação carpogênica (LE TOURNEAU, 1979).

A germinação miceliogênica é caracterizada pelo crescimento de hifas a partir dos escleródios, formados por reprodução assexuada. Estas hifas vigorosas colonizam a matéria

orgânica morta, até encontrar uma planta hospedeira, sendo que o micélio coloniza as partes saudias, causando a murcha e posteriormente a morte da planta (AGRIOS, 2005).

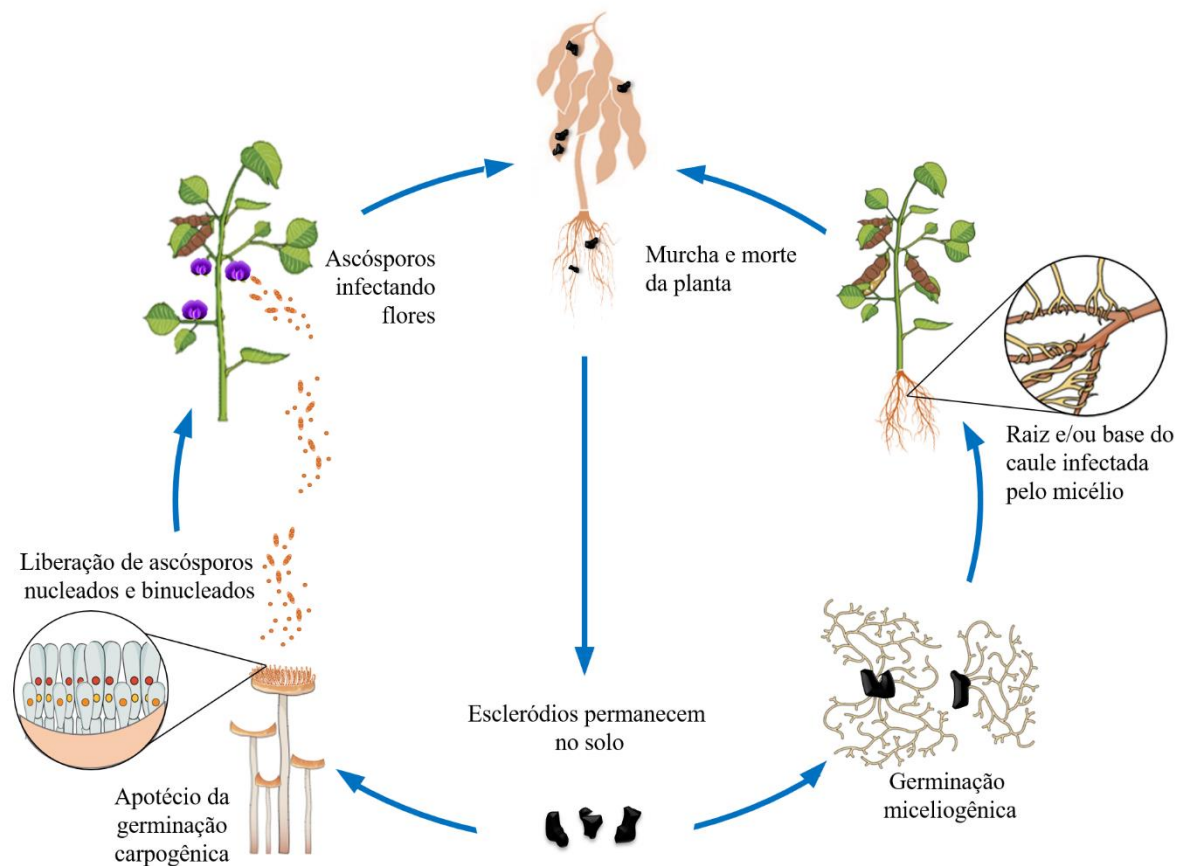


Figura 1. Ciclo de infecção de *Sclerotinia sclerotiorum* na cultura de soja.

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), especialmente as flores senescentes ou tecidos mortos para depois penetrar em tecidos saudáveis (HEGEDUS; RIMMER, 2005) como as vagens, folhas, caules e hastes, formando uma massa de micélio que transforma-se novamente em escleródios, que caem sobre o solo com a colheita. Os escleródios podem permanecer viáveis por vários anos, tornando-se fonte de inóculo para culturas hospedeiras subsequentes, onde novos apotécios são formados, dando início a um novo ciclo de infecção do patógeno.

### 3.3. Sintomas do mofo branco

Os primeiros sintomas da doença são lesões aquosas, que desenvolvem uma abundante formação de micélios brancos e densos que se espalham sobre a superfície dos tecidos aéreos infectados (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006). As lesões desenvolvem-se afetando a haste principal ou os ramos laterais, podendo causar murchamento e sintomas secundários como branqueamento em caules, folhas, pecíolos e órgãos reprodutivos, que podem levar a planta à morte (ALMEIDA et al., 1997). Em poucos dias, as lesões aquosas tornam-se secas, e os micélios formam aglomerados que, ao amadurecerem originam os escleródios (Figura 2) de tamanho e forma irregular (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006). O período crítico da doença na cultura da soja vai do florescimento até a formação e o enchimento das vagens (BOLAND; HALL, 1994).



Figura 2. Formação de escleródios em caule de soja por *Sclerotinia sclerotiorum*.  
Fonte: MEYER et al. (2016)

### 3.4. Mofo branco no Brasil

A preocupação com a doença vem crescendo a cada ano. No Brasil, segundo os resultados dos ensaios cooperativos de controle químico das últimas seis safras, o mofo branco causa reduções médias de 21% na produtividade da soja, e pode chegar até 70% em algumas lavouras isoladas (MEYER et al., 2014; MEYER et al., 2015). Na safra 2015/16 estimou-se que a área de produção de soja infestada pelo fungo *S. sclerotiorum* foi de aproximadamente 7,7 milhões de hectares (CONAB, 2016). Os estados mais atingidos pelo mofo branco foram Goiás (com mais de 2,0 milhões de hectares infestados), Bahia, Mato Grosso e Paraná (de 1,0 a 2,0 milhões de hectares infestados), Minas Gerais (com 0,5 a 1,0 milhão de hectares infestados) e

Mato Grosso do Sul, São Paulo, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (com menos de 0,5 milhão de hectares infestados) (MEYER et al., 2016; MEYER; GODOY, 2016).

A doença tem um rápido crescimento e dispersão, acredita-se que a transmissão através de sementes seja o principal veículo de disseminação do fungo e pode ocorrer tanto por meio do micélio dormente (interno no endosperma) quanto de escleródios misturados às sementes. Uma vez introduzido na área, o patógeno é de difícil erradicação (TU, 1989). O progresso da doença é extremamente dependente de condições ambientais favoráveis e seus danos manifestam-se com maior severidade em áreas acima de 600 metros de altitude, em safras com clima chuvoso e temperatura amena (MEYER; CAMPOS, 2009; JULIATTI; JULIATTI, 2010; MACHADO; CASSETARI NETO, 2010).

### **3.5. Manejo do mofo branco**

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).

Para um manejo efetivo é necessário reunir fatores epidemiológicos do fitopatógeno na cultura da soja, associados a conceitos básicos da tecnologia de aplicação dos produtos antifúngicos.

### **3.6. Controle químico do mofo branco em soja**

Os fungicidas químicos são usados com maior frequência no controle do mofo branco, mas apesar do seu uso expansivo no campo, o seu uso isolado pode não ser um controle efetivo. Os produtos são normalmente caros e não são seguros ao meio ambiente. Este método de controle requer muita atenção do produtor, principalmente em relação à época de aplicação do produto, bem como as técnicas de aplicação (COSTA; COSTA, 2004).

Na maioria dos casos, os fungicidas usados no campo não têm a mesma eficiência como quando testados no laboratório, devido ao contato inadequado do fungicida com os escleródios, havendo a necessidade de altas dosagens dos fungicidas para inviabilizá-los (COLEY-SMITH; COOKE, 1971), levando a problemas ambientais e à rápida evolução da resistência, como demonstrado por Mueller, Derkson e Okzan (2002), onde 91 isolados de *S. sclerotiorum* indicaram potencial para resistência a tiofanato metílico.

Os resultados de eficiência do controle químico variam conforme o ingrediente ativo, época e número de aplicações. Além disso, a variabilidade da eficiência está também atribuída à evolução da resistência do patógeno aos produtos. No entanto, de acordo com TU (1989), vários fungicidas são considerados eficazes no controle do mofo branco e são recomendados para aplicação durante a floração (fase mais vulnerável ao ataque do fungo).

Atualmente, existem poucos (38) fungicidas registrados no Brasil para controle do mofo branco na soja, limitando-se a 11 grupos químicos, com 13 ingredientes ativos: grupo fenilpiridinilamina (fluazinam), grupo dicarboximida (procimidona), grupo benzimidazol (tiofanato-metílico e carbendazim), grupo anilino pirimidina (ciprodinil), grupo fenilpirrol (fludioxonil), grupo estrobilurina (picoxistrobina e dimoxistrobin), grupo dicarboximida (iprodiona), grupo carboxanilida (carboxina), grupo dimetilditiocarbamato (tiram), grupo anilida (boscalida) e grupo amônio quaternário (cloreto de benzalcônico) (Agrofit, 2018). Recomenda-se a aplicação somente de produtos registrados no Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa) para o controle da doença.

### **3.7. Controle cultural da doença mofo branco em soja**

A rotação de culturas é o método mais empregado no controle cultural do mofo branco, mas devido à versatilidade ecológica e sobrevivência de escleródios de *S. sclerotiorum* no solo por vários anos, nem todas as rotações são eficientes. O principal problema do patógeno é a capacidade de infectar muitas espécies de plantas (400 espécies aproximadamente). A rotação com plantas não hospedeiras, como algumas gramíneas, por no mínimo dois a três anos pode reduzir o número de escleródios no solo (GRACIA-GARZA et al., 2002; ROUSSEAU; RIOUX; DOSTALER, 2007).

Outro método de controle é a eliminação de plantas daninhas hospedeiras de *S. sclerotiorum*, pois podem promover um microclima favorável (mais úmido) para o desenvolvimento da doença (PYNENBURG et al., 2011) e aumentar o número de escleródios no solo. Recomenda-se também o uso de sementes de boa qualidade (sadias e com certificado fitossanitário), tratadas com fungicidas (MEYER et al., 2017).

A formação de palhada homogênea no solo, além de proporcionar uma boa cobertura do solo, promove a degradação natural dos escleródios. Entre as plantas mais utilizadas para este tipo de manejo, destacam-se as braquiárias, milheto, milho doce, aveia, arroz e trigo (TIMOSSI; DURIGAN; LEITE, 2007; TRECENTI, 2012).



Recomenda-se também maior espaçamento entre as linhas de semeadura, permitindo assim maior aeração das plantas, reduzindo o possível contato entre plantas e evitando-se a rápida disseminação do fungo das plantas atacadas para as plantas adjacentes.

### 3.8. Controle Biológico da doença mofo branco em soja

Atualmente existem mais de 30 espécies de fungos e bactérias descritas como antagonistas ou micoparasitas de *S. sclerotiorum*. Embora existam diversos estudos de agentes biológicos promissores e produtos biológicos comerciais no exterior, como fungos (*Clonostachys rosea*, *Coniothyrium minitans*, *Ulocladium oudemansii* e *Trichoderma* spp.) e bactérias (*Bacillus* spp. e *Streptomyces* spp.) (BETTIOL et al., 2012), atualmente, no Brasil, existem dois fungos registrados para controle em soja, *Trichoderma asperellum* e *Trichoderma harzianum* (Agrofit, 2018). O modo de ação do *Trichoderma* é a colonização do escleródio, impedindo a formação do apotécio ou germinação miceliogênica de *S. sclerotiorum*. Os produtos à base de *Trichoderma* têm como vantagens: a fácil aplicação, a boa eficiência e o baixo custo, quando comparado com os fungicidas tradicionais (MORANDI; BETTIOL; GHINI, 2005). Além dos fungos como agentes de controle biológico, existe o uso da bactéria *Bacillus subtilis* QST713 no produto SERENADE® (Agrofit, 2017). Os lipopeptídeos produzidos pela bactéria presentes na formulação atuam na membrana celular das estruturas reprodutivas do fungo, provocando sua deformação e produzindo rupturas.

O momento ideal para a aplicação do agente biológico é no estágio de sobrevivência do fungo, ou seja, quando o escleródio se encontra em repouso na superfície do solo, com pouca mobilidade ou no estágio de germinação (TU, 1997).

Além do uso do antagonista no controle da doença, também pode-se utilizar os seus metabólitos secundários (compostos químicos). Em um estudo realizado por Kang e colaboradores (2004), encontrou-se o composto 2-Hidroximetil - chromen- 4ona produzido por *Burkholderia* sp. com atividade inibitória contra *S. sclerotiorum*. Fernando e colaboradores (2005) demonstraram que alguns compostos voláteis (Benzotiazole, Ciclohexanol, n-decanal, dimetiltrisulfato e 2-etil 1-hexanol) produzidos por *Pseudomonas* spp. causam a inibição da germinação dos ascósporos e do crescimento micelial de *S. sclerotiorum*.

Atualmente, existe uma busca de novos microrganismos e novos compostos naturais (metabólitos secundários e extrato de plantas) que têm potencial para controlar fitopatógenos causadores de doenças. Pode-se citar as bactérias simbiotes dos nematoides entomopatogênicos, como potencial uso na agricultura, pois têm a capacidade de produzir

agentes antimicrobianos como xenocoumarins, xenorhabdin (AKHURST, 1982; MCINERNEY et al., 1991) e bacteriocinas (BOEMARE et al., 1992), que inibem o crescimento de outros organismos, incluindo bactérias, leveduras, nematoides e fungos (KOPPENHÖFER, 2007).

### 3.9. Antibiose

A antibiose é uma relação ecológica natural entre organismos, onde uma espécie prejudica o desenvolvimento da outra, através da liberação de substâncias no ambiente. Também se refere à produção de metabólitos secundários, substâncias orgânicas, por um microorganismo inibindo o crescimento de outros microrganismos (COOK; BAKER, 1983), podendo ser específicos, ou de amplo espectro de ação (BAKER; COOK, 1974). Estes compostos podem ser de natureza volátil ou não, sendo que os compostos voláteis têm a vantagem de apresentarem maior facilidade de difusão no ambiente, pelos poros do solo e filmes de água (LOBO; ABREU, 2000). Ambos compostos são de importância econômica, pois podem ser utilizados no controle de pragas e doenças e nas indústrias farmacêuticas e veterinárias.

A antibiose entre os microorganismos pode ser usada para avaliar o potencial de ação das bactérias contra agentes patogênicos, principalmente fungos. Metabólitos antifúngicos, muitas vezes, são produzidos por microrganismos do solo, principalmente fungos, bactérias e actinomicetos (MELO, 1991). Os métodos mais usados para avaliar a inibição *in vitro* são: confronto de dois microrganismos crescendo na mesma placa com meio de cultivo (RANA et al., 2011); inibição da germinação de conídios e incorporação do filtrado (metabólitos secundários) do meio líquido onde cresceu a bactéria, no meio de cultura onde crescerá o patógeno (LEE et al., 1995).

Alguns dos efeitos provocados pelos filtrados podem ser a redução ou paralização do crescimento e esporulação, redução na germinação de esporos, além de distorções na hifa e endólise (CAMPBELL, 1989, LOBO; ABREU 2000).

Avaliações da atividade antimicrobianas são determinadas por ensaios *in vitro*, as quais podem dar uma resposta do potencial dos compostos contra o patógeno, rapidamente. Resultados de ensaios *in vivo*, porém, indicam com precisão a resposta do patógeno e a planta aos compostos (filtrados bacterianos) aplicados, por isto é necessário um trabalho adicional de aplicação em campo, assim como também são necessárias pesquisas para identificação e a purificação dos compostos antibióticos produzidos pelas bactérias, seu modo de ação, estabilidade e persistência na rizosfera, influência nos organismos não-alvo, fitotoxicidade e

dosagem necessária para um controle suficiente em níveis aceitáveis, desde o ponto de vista econômico, além do desenvolvimento de técnicas de formulação adequada, a fim de desenvolver este agente de biocontrole para uso comercial. Além disto, pode ser feita a identificação dos genes que regulam a expressão dos compostos antibióticos (HAAS; KEEL, 2003).

O sucesso do uso destes compostos na agricultura depende das condições ambientais e os resultados podem variar de acordo com o conteúdo mineral do solo, tensão de oxigênio, condições osmóticas, fontes de carbono (HAAS; KEEL, 2003), tipo de plantas e condições climáticas (umidade e temperatura).

### 3.10. Bactérias Simbiontes de nematoides entomopatogênicos (NEPs)

*Xenorhabdus* e *Photorhabdus* são bacilos Gram negativos, Gamma-Proteobacteria, da família Enterobacteriaceae. Estas bactérias têm uma associação simbiote com nematoides entomopatogênicos (NEPs) dos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis*, respectivamente, e são transportadas no intestino do estágio juvenil infeccioso (JI) dos NEPs. Os JIs penetram no inseto hospedeiro e liberam a bactéria no hemocele do inseto. As bactérias simbiontes se multiplicam e colonizam o hospedeiro rapidamente com a produção de metabólitos secundários, causando a morte do inseto em 24 a 72 h (Poinar, 1990).

*Xenorhabdus* e *Photorhabdus* são bactérias pleomórficas, ou seja, têm formas diferentes da colônia e variação de fase, de FI (forma primária ou ativa) para FII (forma secundária ou inativa). As duas fases variantes podem ser diferenciadas em vários aspectos, incluindo a virulência contra insetos ou na associação com os NEPs. De modo geral, as propriedades da FI estão muito acentuadas, ou ausentes da FII (GIVAUDAN; LANOIS, 2000).

A bactéria em FI apresenta as seguintes características: flagelos peritricos; possui grandes inclusões para-cristalinas no seu citoplasma; forma colônias pequenas que absorvem o corante Azul de Bromotimol e reduzem o Cloreto de Trifenil-tetrazolio em placas de NBTA. Tanto *in vivo* (dentro do inseto), como *in vitro*, as bactérias produzem exo-enzimas, tais como lipases (THALER; BAGHDIGUIAN; BOEMARE, 1995), quitinases (CHEN et al., 1996), proteases (BOWEN et al., 2000) e fosfolipases (FORST; NEALSON, 1996).

Na fase II, a bactéria não tem flagelos e pode se manter facilmente em cultivos *in vitro* prolongados. Tem ação inseticida, mas é menos efetiva (BOEMARE; AKHURST, 1988), é igualmente produtora de antibióticos, não forma inclusões para-cristalinas, forma colônias grandes; não adsorve o Azul de Bromotimol, e adquire uma cor vermelha ao degradar o cloreto de trifenil-tetrazolio em placas de NBTA (ENSIGN et al., 2002).

### 3.11. Ciclo de vida do complexo NEP-Bactéria

A fase juvenil infectante (JI) é a única forma do nematoide que vive fora do inseto (vida livre) e levam no seu interior células das bactérias simbiotes, formando o que se conhece como complexo NEPs-Bactéria. Nessa fase, os NEPs não se alimentam e vivem de reservas lipídicas que armazenaram previamente, sobrevivendo por longos períodos se as condições forem favoráveis (ISHIBASHI; KONDO, 1990).

Os JIs carregam as células das bactérias em seu trato intestinal (Figura 3), sendo que o gênero *Steinernema* leva as células na vesícula intestinal especializada (BIRD; AKHURST, 1983) denominada de receptáculo (SNYDER et al., 2007), enquanto que no gênero *Heterorhabditis*, as células bacterianas estão distribuídas ao longo do intestino, muitas vezes rodeadas por uma membrana de origem desconhecida (CICHE; ENSIGN, 2003).

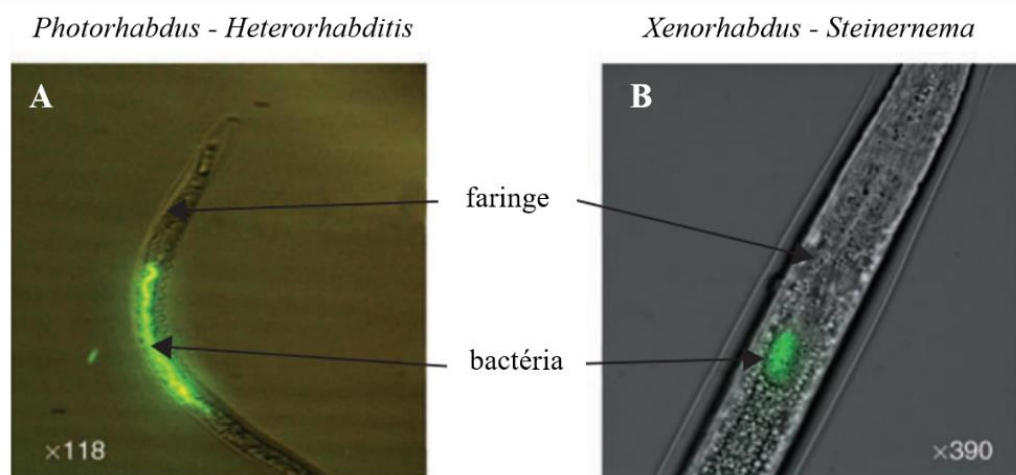


Figura 3. Bactérias colonizadas em diferentes pontos no intestino do nematoide hospedeiro.  
A) *Photorhabdus* sp. e B) *Xenorhabdus* sp.  
Fonte: GOODRICH-BLAIR; CLARKE (2007).

Os JIs procuram (Figura 4) ou esperam insetos hospedeiros suscetíveis para entrar e invadir o hemocele, através de aberturas naturais como boca, ânus e espiráculos. No caso de *Heterorhabditis*, pode também entrar diretamente através do tegumento dos insetos (WANG; GAUGLER, 1998). Assim que alcançar o hemocele, os JIs libertam as bactérias simbiotes. *Xenorhabdus* é liberado através da defecação (WOUTS, 1991), enquanto *Photorhabdus* através do estoma (CICHE; ENSIGN, 2003).

As bactérias simbiotes se multiplicam e colonizam o hospedeiro rapidamente, com a produção de metabólitos secundários (substâncias antibióticas, exo-enzimas e toxinas),

causando septicemia e morte do inseto em 24 a 72 h (POINAR, 1990). Por sua vez os NEPs também produzem substâncias tóxicas contra o inseto, independentemente das bactérias.

As toxinas produzidas pelas bactérias induzem a apoptose (morte celular programada) dos granulócitos, ou hemócitos granulares tipo I, células essenciais do sistema imunológico do inseto, encontradas em praticamente todos os tecidos do corpo, que se constituem na primeira linha de defesa celular (GÖTZ; AHRNÉ; LINDBERG, 1981).

As bactérias entomopatogênicas possuem um extenso repertório de genes, envolvidos na produção de toxinas e metabólitos secundários. Acredita-se que estas moléculas sejam responsáveis por garantir tanto o processo de patogenicidade para o inseto, quanto a manutenção da simbiose com o nematoide (CLARKE, 2008).

As bactérias permitem o crescimento e a reprodução dos NEPs ao disponibilizar alimento (tecido digerido do inseto), pois produzem agentes antimicrobianos como xenocoumarins, xenorhabdin (AKHURST, 1982; MCINERNEY et al., 1991) e bacteriocinas (BOEMARE et al., 1992), que inibem o crescimento de outros organismos, incluindo bactérias, leveduras, nematoides, fungos e também elementos que protegem os NEPs de insetos saprófagos (KOPPENHÖFER, 2007). Entretanto, alguns microrganismos saprófitos do solo e as bactérias aderidas ao intestino do inseto, ou à cutícula dos NEPs representam uma fonte potencial de competidores, que podem crescer no cadáver do inseto (BODE, 2009). Estas bactérias não-simbiontes podem coabitar o cadáver junto com as bactérias simbiotes, caso adquiram resistência aos antibióticos produzidos por *Xenorhabdus/Photorhabdus* durante a interação, ou caso já estejam resistentes desde o início da associação (ORTEGA-ESTRADA et al., 2012).

Quando começam a se alimentar do tecido do hospedeiro, os NEPs introduzem ao mesmo tempo as bactérias simbiotes. Os JIs desenvolvem-se em adultos no interior do inseto e dão lugar a uma ou mais gerações, dependendo do tamanho do inseto (HINCHLIFFE et al., 2010).

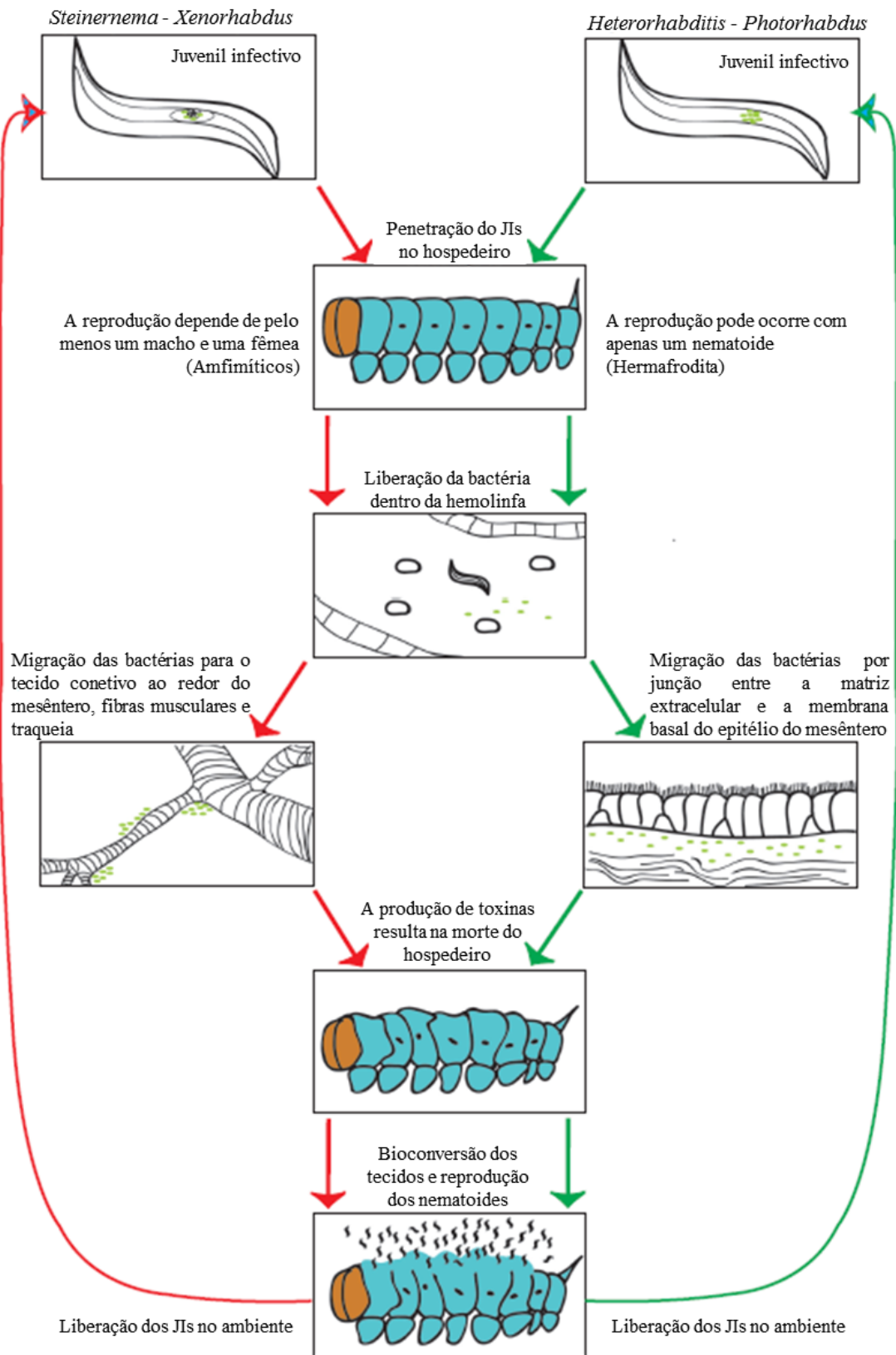


Figura 4. Ciclo de vida dos nematoides entomopatogênicos, associados a bactérias simbiotes  
 Fonte: HINCHLIFFE et al. (2010)

Uma das principais diferenças entre *Steinernema* e *Heterorhabditis* é o estado posterior no desenvolvimento do JI para a fase adulta. Para *Steinernema*, o JI converte-se em macho ou fêmea, enquanto que para *Heterorhabditis*, converte-se em hermafrodita na primeira geração, gerando machos e fêmeas nas demais gerações (KAYA; SIMMANN, 1987).

No cadáver do inseto, o alimento começa a se esgotar, induzindo o nematoide a converter-se para a forma de JIs. Os nematoides incorporam as bactérias simbiotes e emergem do cadáver do inseto como JIs (ADAMS; NGUYEN, 2002) para procurar um novo hospedeiro (KAYA; GAUGLER, 1993). Em condições ideais, este processo realiza-se entre quatro e dez dias para os esteinernematídeos, e entre 12 e 14 dias para os heterorabditídeos.

Estudos taxonômicos mostraram que no complexo nematoide–bactéria cada espécie de *Steinernema* e *Heterorhabditis* (Rhabditida: Heterorhabditidae) está associada a uma única espécie de *Xenorhabdus* e *Photorhabdus*, respectivamente. Não obstante, uma espécie de bactéria pode estar associada a mais de uma espécie de NEP (AKHURST; BOEMARE, 1990).

### **3.12. Diversidade das bactérias simbiotes**

Inicialmente, Thomas e Poinar (1979) catalogaram as bactérias simbiotes de NEPs como pertencentes ao gênero *Xenorhabdus*, mas posteriormente, estudos feitos por Boemare, Akhurst e Mourant (1993) permitiram desmembrar o gênero *Photorhabdus* como um grupo isolado do gênero *Xenorhabdus*.

Até o momento, o gênero *Xenorhabdus* contém 26 espécies descritas (Tabela 1) enquanto que o gênero *Photorhabdus* contém quatro espécies (Tabela 2), com 19 subespécies. Embora muitas espécies de *Steinernema* e *Heterorhabditis* já tenham sido identificadas e caracterizadas, muitas das bactérias associadas a esses nematoides ainda não foram totalmente identificadas e descritas.

Tabela 1. Espécies da bactéria *Xenorhabdus* identificadas até 2018, os nematoides do gênero *Steinernema* dos quais foram isoladas e sua origem geográfica.

Bactérias*	NEPs	Origem geográfica
<i>X. nematophila</i> (POINAR; THOMAS, 1965)	<i>S. carpocapsae</i>	Rússia
<i>X. poinarii</i> (AKHURST, 1983)	<i>S. glaseri</i>	USA
<i>X. bovienii</i> (AKHURST, 1983)	<i>S. feltiae</i>	França
<i>X. beddingii</i> (AKHURST, 1986)	<i>Steinernema</i> sp.	Austrália
<i>X. japonica</i> (NISHIMURA et al., 1995)	<i>S. kushidai</i>	Japão
<i>X. innexi</i> (LENGYEL et al., 2005)	<i>S. scapterisci</i>	Uruguai
<i>X. budapestensis</i> (LENGYEL et al., 2005)	<i>S. bicornutum</i>	Sérvia
<i>X. ehlersii</i> (LENGYEL et al., 2005)	<i>S. serratum</i>	China
<i>X. szentirmaii</i> (LENGYEL et al., 2005)	<i>S. rarum</i>	Argentina
<i>X. cabanillasii</i> (TAILLIEZ et al., 2006)	<i>S. riobrave</i>	USA e Jamaica
<i>X. doucetiae</i> (TAILLIEZ et al., 2006)	<i>S. diaprepesi</i>	América Central
<i>X. griffiniae</i> (TAILLIEZ et al., 2006)	<i>S. hermaphroditum</i>	Indonésia
<i>X. hominickii</i> (TAILLIEZ et al., 2006)	<i>S. monticolum</i>	Quênia e Coreia
<i>X. koppenhoeferi</i> (TAILLIEZ et al., 2006)	<i>S. scarabaei</i>	USA
<i>X. kozodoii</i> (TAILLIEZ et al., 2006)	<i>S. arenarium</i>	Rússia e Itália
<i>X. mauleonii</i> (TAILLIEZ et al., 2006)	<i>Steinernema</i> .sp.	São Vicente (Caribe)
<i>X. miraniensis</i> (TAILLIEZ et al., 2006)	<i>Steinernema</i> .sp.	Austrália
<i>X. romanii</i> (TAILLIEZ et al., 2006)	<i>S. puertoricense</i>	Porto Rico
<i>X. stockiae</i> (TAILLIEZ et al., 2006)	<i>S. siamkayai</i>	Tailândia
<i>X. indica</i> (SOMVANSI et al., 2009)	<i>S. thermophilum</i>	Guadalupe
<i>X. vietnamensis</i> (TAILLIEZ et al., 2010)	<i>S. sangi</i>	Vietnã
<i>X. magdalenensis</i> (TAILLIEZ et al., 2012)	<i>S. australe</i>	Chile
<i>X. ishibashii</i> (KUWATA et al., 2013)	<i>S. aciari</i>	China e Japão
<i>X. khoisanae</i> (FERREIRA et al., 2013)	<i>S. khoisanae</i>	África do Sul
<i>X. eapokensis</i> (KÄMPFER et al. 2017)	<i>S. eapokense</i>	Vietnã
<i>X. thuongxuanensis</i> (KÄMPFER et al. 2017)	<i>S. sangi</i>	Vietnã

\*linhagem tipo



Tabela 2. Espécies da bactéria *Photorhabdus* identificadas até 2018, os nematoides do gênero *Heterorhabditis* dos quais foram isoladas e sua origem geográfica.

Bactérias*	NEPs	Origem geográfica
<i>Photorhabdus luminescens</i> (THOMAS; POINAR, 1979)	<i>H. luminescens</i>	China
<i>P. luminescens luminescens</i> (FISCHER-LE SAUX et al., 1999)	<i>H. bacteriophora</i>	Austrália
<i>P. luminescens akhurstii</i> (FISCHER-LE SAUX et al., 1999)	<i>H. indica</i>	Guadalupe
<i>P. luminescens caribbeanensis</i> (TAILLIEZ et al., 2010)	<i>H. bacteriophora</i>	Guadalupe
<i>P. luminescens kayaii</i> (HAZIR et al., 2004)	<i>H. bacteriophora</i>	Turquia
<i>P. luminescens kleinii</i> (AN; GREWAL, 2011)	<i>H. georgiana</i>	USA
<i>P. luminescens laumondii</i> (FISCHER-LE SAUX et al., 1999)	<i>H. bacteriophora</i>	Trinidad
<i>P. luminescens hainanensis</i> (TAILLIEZ et al., 2010)	<i>Heterorhabditis</i> sp.	China
<i>P. luminescens noenieputensis</i> (FERREIRA et al., 2013)	<i>H. indica</i>	África do Sul
<i>P. luminescens thraceaensis</i> (HAZIR et al., 2004)	<i>H. bacteriophora</i>	Turquia
<i>P. luminescens sonorensis</i> (OROZCO; HILL; STOCK, 2013)	<i>H. sonorensis</i>	USA
<i>P. luminescens namnaonensis</i> (GLAESER et al., 2017)	<i>H. baujardi</i>	Tailândia
<i>P. temperata</i> (FISCHER-LE SAUX et al., 1999)	<i>H. megidis</i>	Austrália
<i>P. temperata cinerea</i> (TÓTH; LAKATOS, 2008)	<i>H. downesic</i>	Hungria
<i>P. temperata tasmaniensis</i> (TAILLIEZ et al., 2010)	<i>H. zealandica</i>	Austrália
<i>P. temperata stackebrandtii</i> (AN; GREWAL, 2011)	<i>H. bacteriophora</i>	USA
<i>P. temperata khani</i> (TAILLIEZ et al., 2010)	<i>H. bacteriophora</i>	USA
<i>P. temperata temperata</i> (TÓTH; LAKATOS, 2008)	<i>H. megidis</i>	Rússia
<i>P. temperata thracensis</i> (TAILLIEZ et al., 2010)	<i>Heterorhabditis</i> sp.	Turquia
<i>P. heterorhabditis</i> (FERREIRA et al., 2014)	<i>H. zealandica</i>	África do Sul
<i>P. asymbiotica</i> (FISCHER-LE SAUX et al., 1999)	Não simbiótica	USA
<i>P. asymbiotica asymbiotica</i> (AKHURST et al., 2004)	Não simbiótica	Austrália
<i>P. asymbiotica australis</i> (AKHURST et al., 2004)	Não simbiótica	Austrália

\*linhagem tipo

### 3.13. Metabólitos secundários produzidos pelas bactérias simbiotes

As bactérias dos gêneros *Xenorhabdus* e *Photorhabdus* produzem exo-enzimas, tais como lipases (THALER; BAGHDIGUIAN; BOEMARE, 1995), quitinases (CHEN et al., 1996), proteases (BOWEN et al., 2000) e fosfolipases (FORST; NEALSON, 1996). As lecitinas são produzidas somente por *Xenorhabdus* e estão envolvidas na quebra de fosfolipídios de insetos, proporcionando assim uma fonte lipídica para o crescimento de NEPs do gênero *Steinernema* (MAHAR; MAHAR; MAHAR, 2008).

A quitinase, protease e fosfolipase degradam o tecido do inseto, fornecendo alimento aos NEPs durante sua reprodução. Além disto, as quitinases clivam os polímeros de quitina, (componente estrutural importante de muitos organismos, incluindo fungos, insetos, crustáceos e ovos de nematóides (PUNJA; ZHANG, 1993)), protegendo o inseto hospedeiro de invasão por fungos (CHEN et al., 1996).

No geral, ocorre um aumento na produção dessas enzimas extracelulares durante o final da fase logarítmica e começo da fase estacionária do crescimento das bactérias, disponibilizando nutrientes para o desenvolvimento dos nematoides dentro do inseto. Além de exoenzimas, também são produzidas toxinas do grupo das citotoxinas capazes de lisar os granulócitos e impedir as reações de defesa (RIBEIRO et al., 1999), e antibióticos de ação fungicida e bactericida, que impedem a colonização do cadáver por outras espécies de microrganismos presentes no ambiente.

A produção de antibióticos por *Xenorhabdus* spp. e *Photorhabdus* spp. difere qualitativa e quantitativamente, dependendo de cada espécie e cepa de bactéria (WANG et al., 2011), além disto, os parâmetros de cultivo e meio de cultura são fatores críticos que podem alterar a produção dos compostos produzidos pelos microrganismos, pequenas mudanças no meio de cultura podem impactar a produção e/ou quantidade de certos compostos (Scherlach e HERTWECK, 2009).

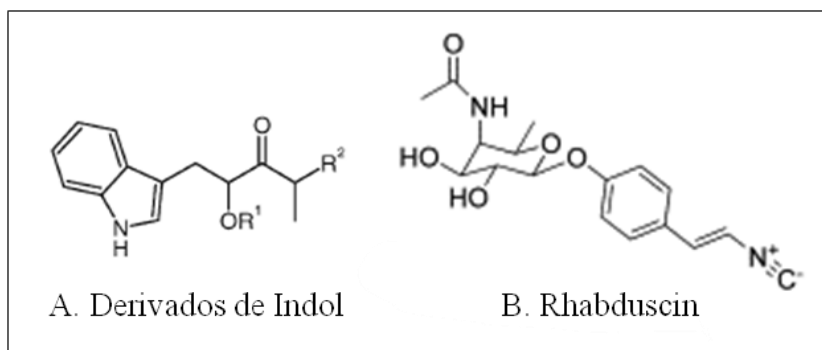


Figura 5. Estrutura de vários antibióticos produzidos pelas bactérias *Xenorhabdus* spp. e *Photorhabdus* spp., segundo (A) Forst e Nealson (1996) e (B) Crawford, Kontnik e Clardy (2010).

Atualmente, mais de vinte classes de compostos foram isolados e identificados a partir de *Xenorhabdus*, denotando uma alta biodiversidade estrutural. Alguns dos compostos produzidos em comum pelos dois gêneros são derivados de Indol (Figura 5) que tem um amplo espectro de efeitos nematicidas (OROZCO, 2012) e o Rhabduscin composto com atividade anti-Fenol-Oxidase (composto que faz parte do sistema imune do inseto) (CRAWFORD, KONTNIK; CLARDY, 2010).

Os compostos produzidos pelas bactérias do gênero *Xenorhabdus* (Figura 6), descritos na literatura, são na maioria moléculas pequenas, como Benzylideneacetone, Iodinine, Phenethylamides, e derivados de Índole, e também alguns compostos mais complexos como os Xenorhabdinas e Xenorxides, além de compostos derivados do complexo multienzimático: sintase de policétido (PKS)/ peptídeo sintase não ribossômica (NRPS) como Xenocoumacinas (XCNs), Xenematide e Xenortides (identificados como peptídeos produzidos por *X. nematophila*) (BODE, 2009), Xenofuranone e Szentiamide.

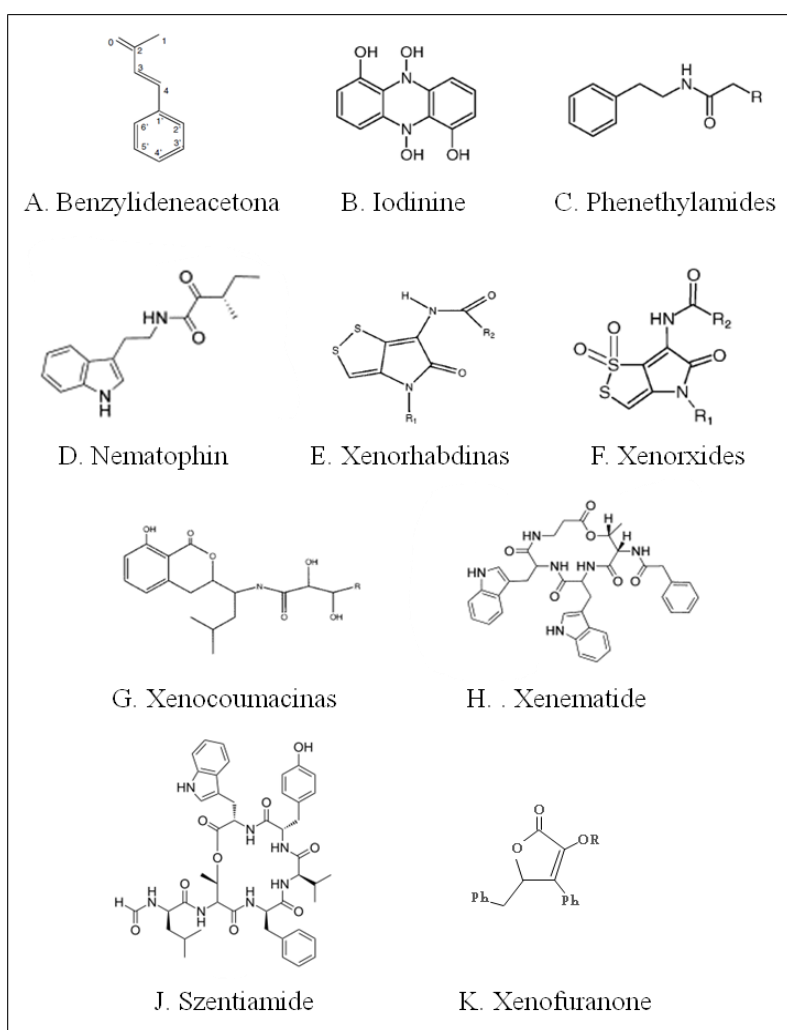


Figura 6. Estrutura de vários antibióticos produzidos pelas *Xenorhabdus* spp., segundo (A) Ji, Yi e Kim (2004); (B, C e F) Bode (2009); (E e G) Forst e Nealson (1996); (D e H) Crawford, Kontnik e Clardy (2010); (J) Nollmann et al. (2012) e (K) Schöffler et al. (2009).

A Benzylideneacetona (trans-4-phenyl-3-buten-2-one) é uma molécula pequena e estável ao calor, com atividade contra algumas bactérias Gram-negativas, encontrado em *X. nematophila*, por Ji, Yi e Kim (2004).

O exo-cristal de Poli- Iodine é um composto antimicrobiano, encontrado unicamente na bactéria *X. szentirmaii* (FODOR et al., 2008).

Outro composto produzido é o Nematophin (derivado do indol), estabelecido como indoleethyl 3-(3'-metil-2'-oxo)-pentanamida, revela uma forte bioatividade *in vitro* contra uma série de espécies de fungos e bactérias (LI; CHEN; WEBSTER, 1997).

A Xenorhabdina é uma substância natural que pertence à classe Pyrrothines, e isolada de *X. nematophila* e *X. bovienii*. Vários derivados de xenorababina foram descritos com atividade antibacteriana, antifúngica e inseticida. (LI; HU; WEBSTER, 1998).

Os principais antibióticos produzidos por *X. nematophila* são as Xenocoumacinas (XCN), dentre os quais apenas dois são conhecidos até o momento: XCN 1 e XCN 2, com amplo espectro biológico na atividade antibacteriana contra muitas bactérias Gram positivos.

Estudos realizados por Park, Aliza e Stanley (2005) demonstraram que XCN1 é melhor que XCN2 na ação contra diversas bactérias, indicando diferenças desses antibióticos quanto às funções biológicas.

O peptídeo cíclico Xenematide, cuja estrutura é PA-L-[L-Thr-Trp-D-Trp-beta-Ala]. (PA = fenilacetil), tem ação antimicrobiana fraca (Hung et al., 2011).

A Xenofuranone (dímero de phenylpyruvate) e Szentiamide (peptídeo) foram identificados na bactéria *X. szentirmaii* (BRACHMANN et al., 2006; NOLLMANN et al., 2012).

As bactérias do gênero *Photorhabdus* (Figura 7) produzem compostos poliquetídios, como as anthraquinones poliaromáticos, os quais possuem atividade antifúngica e antibacteriana fraca, mas têm atividade repelente contra formigas e pássaros (PANKEWITZ; HILKER, 2008).

*Photorhabdus* spp. também produz estilbenos (ST) que tem um amplo espectro antibacteriano e fortes propriedades antifúngicas, além de ser um potente inibidor da Fenol-Oxidase (ELEFThERIANOS et al., 2007). Compostos como os estilbenos são alquenos conjugados produzidos geralmente pelo reino vegetal, que têm sido encontrados nas culturas de todas as espécies de *Photorhabdus*. Essa bactéria vem sendo considerada, até o momento, como o único organismo não planta que produz essa família de compostos (CRAWFORD; CLARDY, 2011).

Richardson, Schmidt e Nealson (1988) registraram também a produção de hidroxistilbeno, composto com atividade antibiótica e nematicida, que exerce sua atividade antibiótica através da inibição da síntese de RNA.

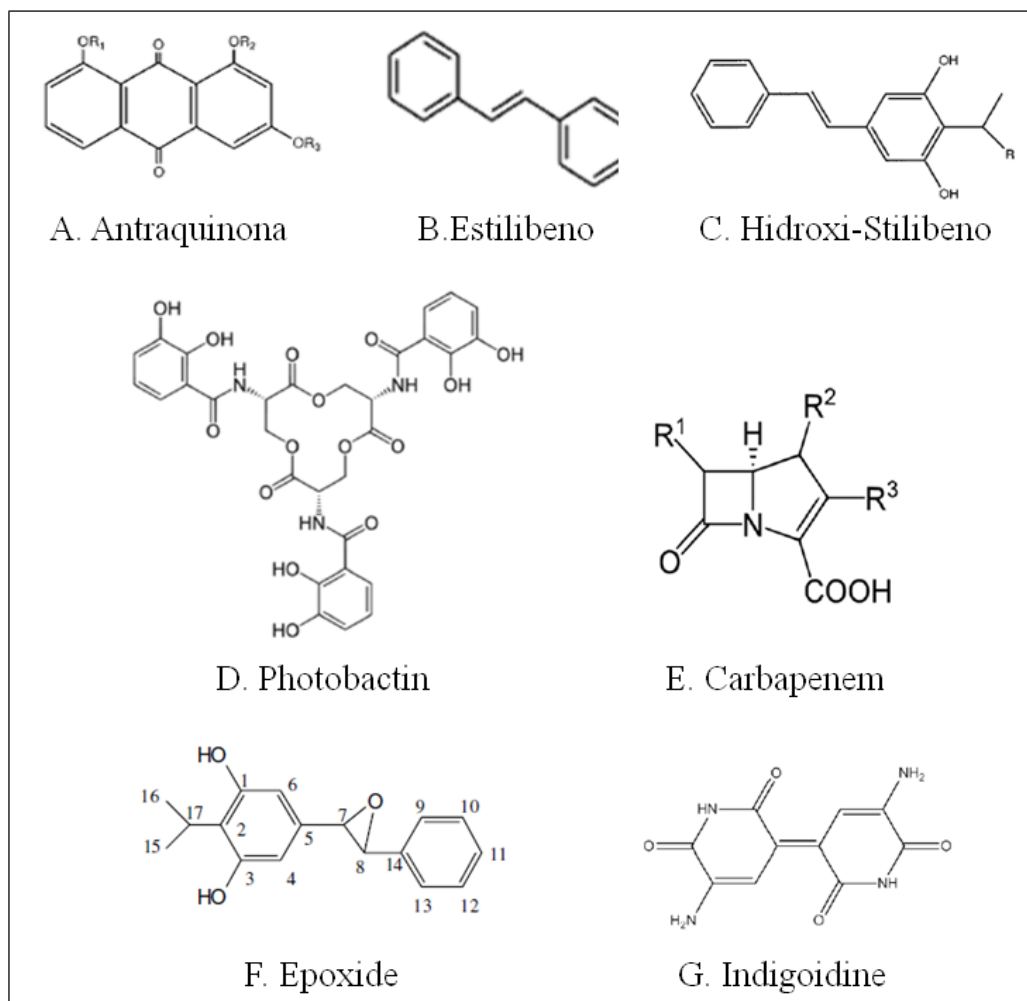


Figura 7. Estrutura de vários antibióticos produzidos pelas bactérias *Photorhabdus* spp., segundo (A e C) Forst e Neilson (1996); (B, D, E e G) Orozco (2012) e (F) Hu et al. (2006).

Outros compostos como sideróforos catecolatos (photobactina) têm sido encontrados com capacidade antimicrobiana (CICHE et al., 2003).

O Carbapenem é um antibiótico da classe  $\beta$ -lactam que tem atividade contra muitas bactérias Gram-negativas (COULHOROUST et al., 2005).

O Epoxide, 2-isopropyl-5-(3-phenyl-oxiranyl)-benzene-1,3-diol, é outro composto com ação contra as bactérias *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes* e *Staphylococcus aureus*, como demonstrado por Hu et al. (2006).

O Indigoidine, pigmento azul, é produzido através da NRPS, com ação antibacterial.

### 3.14. As bactérias simbióticas e seus metabólitos secundários no controle biológico de doenças

Novos compostos antimicrobianos são necessários para controlar doenças de plantas de difícil controle, ou resistentes a agrotóxicos. Nos últimos anos, os produtos naturais têm sido

uma fonte promissora para a descoberta de novos biocontroladores. Esse interesse é devido ao fato de que os produtos naturais oferecem novos modos de ação contra os patógenos, diversidade estrutural e são de fácil absorção e metabolismo (LADELL, 2011).

Os produtos naturais geralmente são metabólitos secundários produzidos pelo metabolismo, quase sempre após a fase de crescimento, devido à limitação de nutrientes, ou mecanismos reguladores de defesa. Praticamente todas as bactérias produzem metabólitos secundários, que podem ser inibitórios, tanto para si mesmas, quanto para outros microrganismos, podendo produzir efeito bactericida ou bacteriostático (JACK; TAGG; RAY, 1995).

Associações tripartidas inseto-nematodo-bactéria são um sistema que chama bastante a atenção por ter potencial para serem utilizados em programas de controle biológico (GAUGLER; CAMPBELL; GUPTA, 1991). As bactérias simbiotes de NEPs têm a característica de produzir metabólitos secundários, que possuem estruturas químicas diversas e tem uma ampla gama de atividades com interesses medicinais e agrícolas, como antibióticos, antimicóticos, inseticida, nematicida, antiulcerosa, antineoplásica e antiviral (WANG et al., 2011).

Novas espécies são descobertas cada vez com mais frequência (POWELL; WEBSTER, 2004), além da identificação de compostos naturais que atuam como toxinas e antibióticos (PARK et al., 2009). Metabólitos secundários de fermentações microbianas oferecem uma boa fonte de compostos orgânicos bioativos para o controle de doenças das plantas.

Paul e colaboradores (1981) descreveram pela primeira vez antibióticos (Estilbenos e derivados do indol) produzidos a partir das bactérias simbiotes de NEPs. Desde então, numerosos estudos resultaram na identificação de vários novos agentes antimicrobianos a partir de diferentes espécies. Alguns experimentos *in vitro* demonstraram o potencial do uso dos filtrados de bactérias simbiotes para inibir fungos fitopatogênicos economicamente importantes como *Botrytis cinerea*, *Ceratocystis ulmi*, *Mucor pitifomis*, *Pythium coloratum*, *P. unimum*, *Phytophthora infestans* e *Rhizoctonia solani* (CHEN; DUNPHY; WEBSTER, 1994; LI et al., 1995; CHEN et al., 1996).

Estudos realizados por Isaacson (2000) demonstram o amplo espectro antimicrobiano contra fungos e espécies bacterianas de importância agrícola, produzida por compostos de *Xenorhabdus* sp. isolado RIO. Os ensaios foram realizados pelo método de difusão em ágar, contendo o caldo de cultura livre de células (filtrado), inibindo completamente o crescimento

de muitos fungos patogênicos de plantas, incluindo *Botrytis cinerea*, *Diddymella bryoniae*, *Fusarium solani* e *Pythium ultimum*.

Böszörményi e colaboradores (2009) mostraram que os metabólitos secundários produzidos por *X. budapestensis* e *X. szentirmaii* inibiram a formação de colônias e crescimento micelial de *Phytophthora nicotianae*, *in vitro*, além de reduzirem efetivamente a queima bacteriana na macieira, causada por *Erwinia amylovora*, quando avaliada em condições de estufa.

Fang e colaboradores (2011) demonstraram que os metabólitos secundários produzidos por *Xenorhabdus bovienii* causaram inibição de crescimento nos fungos fitopatogenos *Botrytis cinerea* e *Phytophthora capsici*.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Local do experimento

Os bioensaios foram realizados no Laboratório de Controle Biológico de Pragas, localizado no Centro Avançado em Proteção de Plantas e Sanidade Animal do Instituto Biológico, em Campinas, São Paulo.

### 4.2. Isolado de *Sclerotinia sclerotiorum*

O isolado de *S. sclerotiorum* utilizado nos testes foi obtido de soja cultivada em Cristalina – Goiás. Este isolado pertence à Coleção da Fitopatologia do Instituto Biológico, sendo fornecido pela pesquisadora Dra. Silvânia Helena Furlan. A patogenicidade do fungo foi confirmada por teste *in vivo* em folhas destacadas de plantas de soja da cultivar BMX Potência - RR.

O fungo foi cultivado em placas de Petri contendo meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar) e incubado no escuro a 25 °C, por 10 dias, para a utilização de seu micélio, e por até 20 dias para a produção de escleródios.

### 4.3. Isolamento das bactérias simbiotes de nematoides entomopatogênicos

As bactérias foram isoladas de acordo com a metodologia de Akhurst (1980), a partir da hemolinfa de lagartas de *Galleria mellonella* infectadas, com 1 mL da suspensão de nematoides listados na Tabela 3. Logo após a morte, os insetos foram desinfestados superficialmente com álcool 90% e flambados. Com auxílio de um alfinete entomológico foi feito um ferimento na parte frontal da lagarta e a hemolinfa extravasada foi semeada em placas de Petri contendo o meio de cultura NBTA (Agar Nutritivo; 25 mg Azul de Bromotimol; 40 mg Cloreto de Trifenil-Tetrazolio; 1000 ml<sup>-1</sup> água destilada). As placas foram mantidas no escuro a 28 °C, durante 48-72 hs. Para o armazenamento por longos períodos (não superior a 6 meses), as bactérias foram suspensas em Glicerol 20% + meio de cultura NA (agar nutriente) e congeladas a -80 °C (Figura 8). Os códigos das bactérias foram mantidos iguais aos códigos dados para seus respectivos nematoides hospedeiros.



Tabela 3. Identificação e procedência dos isolados de nematoides entomopatogênicos (NEPs) e suas bactérias simbiotes.

Isolado	NEP hospedeiro	Bactéria	Local/Origem
IBCB n2	<i>S. carpocapse</i>	<i>X. nematophila</i>	All/USA
IBCB n6	<i>S. brazilense</i>	<i>Xenorhabdus</i> sp.	Porto Murтинho –MS
PONTO 2C	<i>S. brazilense</i>	<i>Xenorhabdus</i> sp.	Porto Murтинho –MS
IBCB n10	<i>H. amazonensis</i>	<i>P. luminescens</i>	Santa Fé do Sul –SP
HB EN01	<i>H. bacteriophora</i>	<i>P. luminescens</i>	Alemanha*
IBCB n47	<i>S. feltiae</i>	<i>X. bovienii</i>	Alemanha**
IBCB n48	<i>Steinernema</i> sp.	<i>Xenorhabdus</i> sp.	Itapetininga-SP
IBSC n15	<i>S. diapresi</i>	<i>Xenorhabdus</i> sp.	Teodoro Sampaio -SP
PAM 11	<i>S. rarum</i>	<i>X. szentirmaii</i>	Bagé –RS
PAM 25	<i>S. rarum</i>	<i>X. szentirmaii</i>	Bagé –RS
CER 09	<i>S. puertoricense</i>	<i>Xenorhabdus</i> sp.	Rio Verde –GO
CER 16	<i>S. puertoricense</i>	<i>Xenorhabdus</i> sp.	Rio Verde –GO
CER 21	<i>Steinernema</i> sp.	<i>Xenorhabdus</i> sp.	Rio Verde –GO
CER 129	<i>S. puertoricense</i>	<i>Xenorhabdus</i> sp.	Rio Verde –GO
CER 140	<i>S. puertoricense</i>	<i>Xenorhabdus</i> sp.	Rio Verde –GO
CER144	<i>Steinernema</i> sp.	<i>Xenorhabdus</i> sp.	Rio Verde –GO
AM 163	<i>S. diaprepsi</i>	<i>Xenorhabdus</i> sp.	Sinop –MT

\* Isolado híbrido, originado a partir de *cross-breeding* entre *H. bacteriophora* (Nova Jersey) e os isolados HK1 e HD01 (Alemanha).

\*\* Isolado híbrido, originado a partir de *cross-breeding* entre 10 isolados europeus de *S. feltiae* (Alemanha, Noruega, Suécia, Finlândia, Itália e Holanda).

S.: *Steinernema*; X.: *Xenorhabdus*; H.: *Heterorhabditis* e P.: *Photorhabdus*.

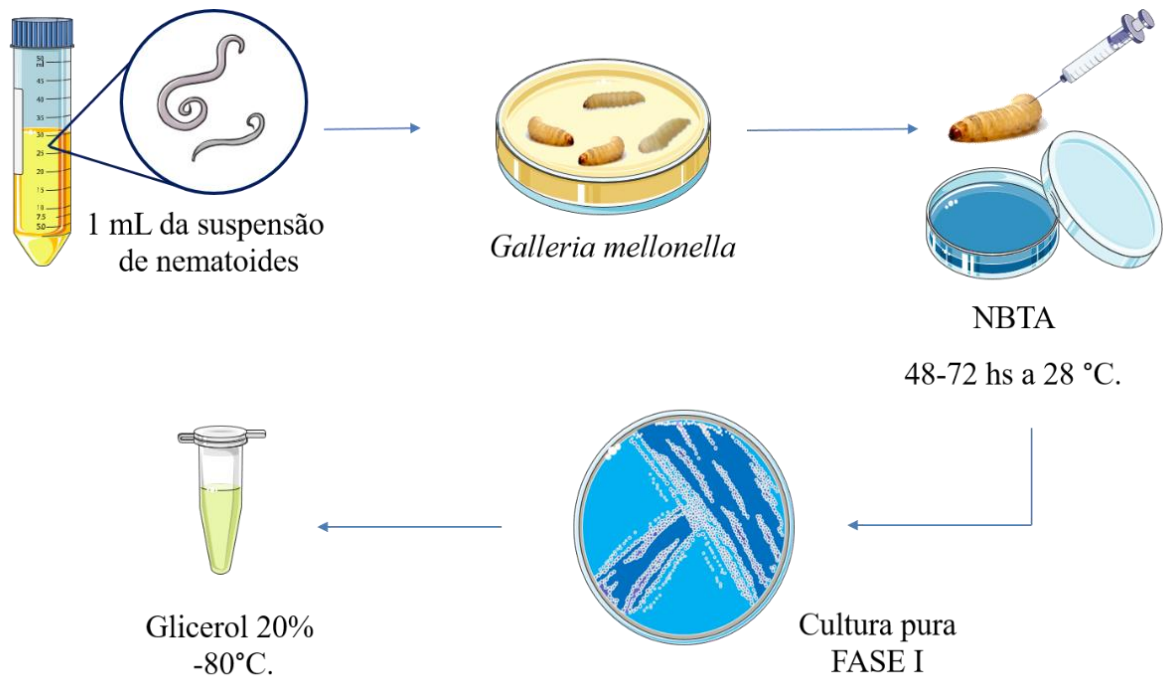


Figura 8. Procedimento para isolamento de bactérias simbiotas de nematoides entomopatogênicos.

#### 4.4. Obtenção dos filtrados produzidos pelas bactérias simbiotas de NEPs

Para obter os filtrados livres de células (metabólitos secundários), todos os isolados bacterianos foram cultivados em 100 mL de caldo Triptona-Soja (TSB) e mantidos a 27 °C, sob agitação constante (150 rpm). O número de dias de cultivo variou segundo os experimentos, sendo com 3; 6 e 9 dias.

As suspensões bacterianas foram centrifugadas a 3800 rpm durante 2h e os sobrenadantes foram esterilizados por filtros de celulose (0,22 µm), com auxílio de bomba de vácuo (Figura 9). Uma alíquota de cada suspensão filtrada foi plaqueada em agar de NBTA para verificar a ausência de células bacterianas (SAN-BLAS; CARRILLO; PARRA, 2012; HAZIR et al., 2016). Os filtrados obtidos no processo foram mantidos refrigerados, até sua incorporação nos meios de cultura para a montagem dos experimentos.

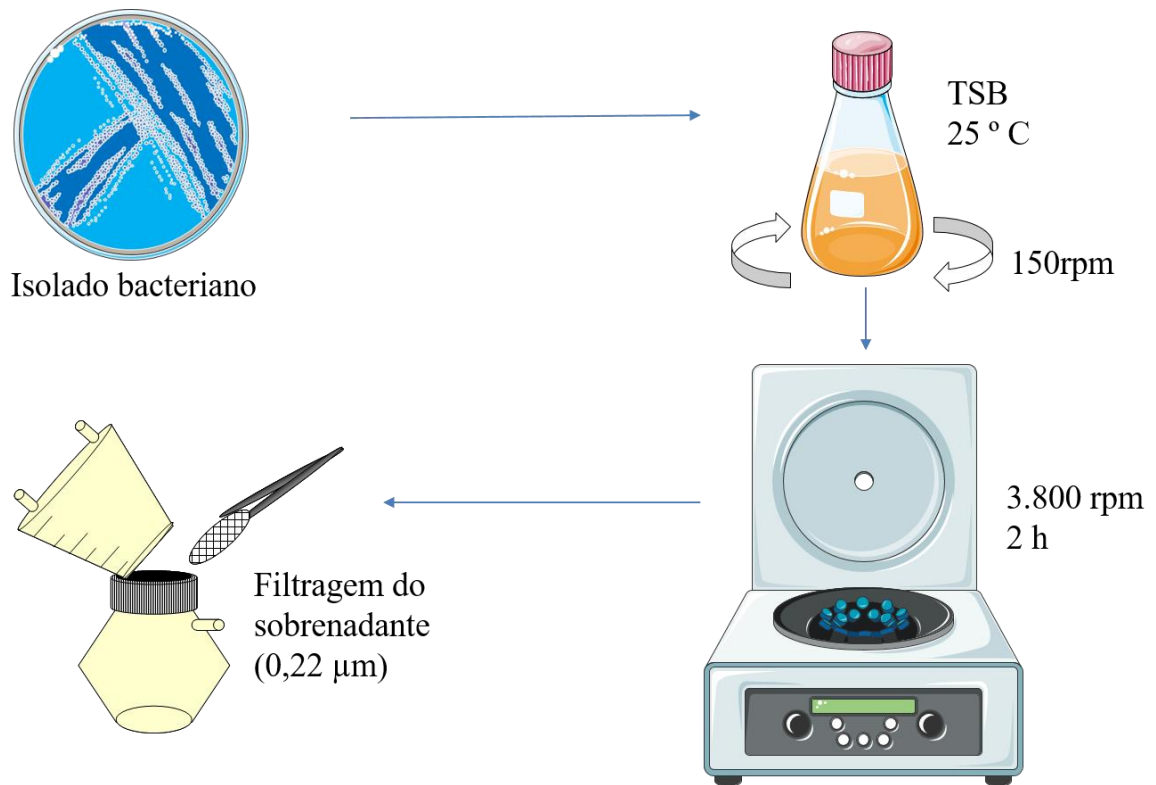


Figura 9. Obtenção dos filtrados produzidos pelas bactérias simbiotes de nematoides entomopatogênicos.

#### 4.5. Seleção do melhor isolado de bactéria simbiote de NEPs para controle do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum*

Para selecionar a bactéria a ser utilizada em todos os testes *in vitro* e *in vivo*, 16 isolados de *Xenorhabdus* sp. e de *Photorhabdus* sp. (Tabela 3) foram testados. Todos os filtrados das bactérias foram produzidos em 6 dias de crescimento e obtidos seguindo o protocolo descrito previamente no item 4.4.

Para a montagem do experimento, foram avaliados 17 tratamentos (16 filtrados + Controle TSB), cada um com 6 repetições. Para cada tratamento foi adicionado 10% do filtrado em meio BDA ainda quente (40-45°C). A mistura foi vertida em placas de Petri e posteriormente um disco de BDA contendo o micélio de *S. sclerotiorum* (com 10 dias de crescimento a 25°C na ausência da luz) foi colocado no centro da placa de cada tratamento. Como controle foi usado BDA + 10 % de TSB (sem filtrado) (Figura 10).

O delineamento experimental empregado foi o inteiramente ao acaso. O ensaio foi conduzido duas vezes no tempo (total de 12 repetições/tratamento). A avaliação do ensaio consistiu em medir o diâmetro da colônia do fungo (cm), até que o tratamento controle apresentasse 100% de crescimento.

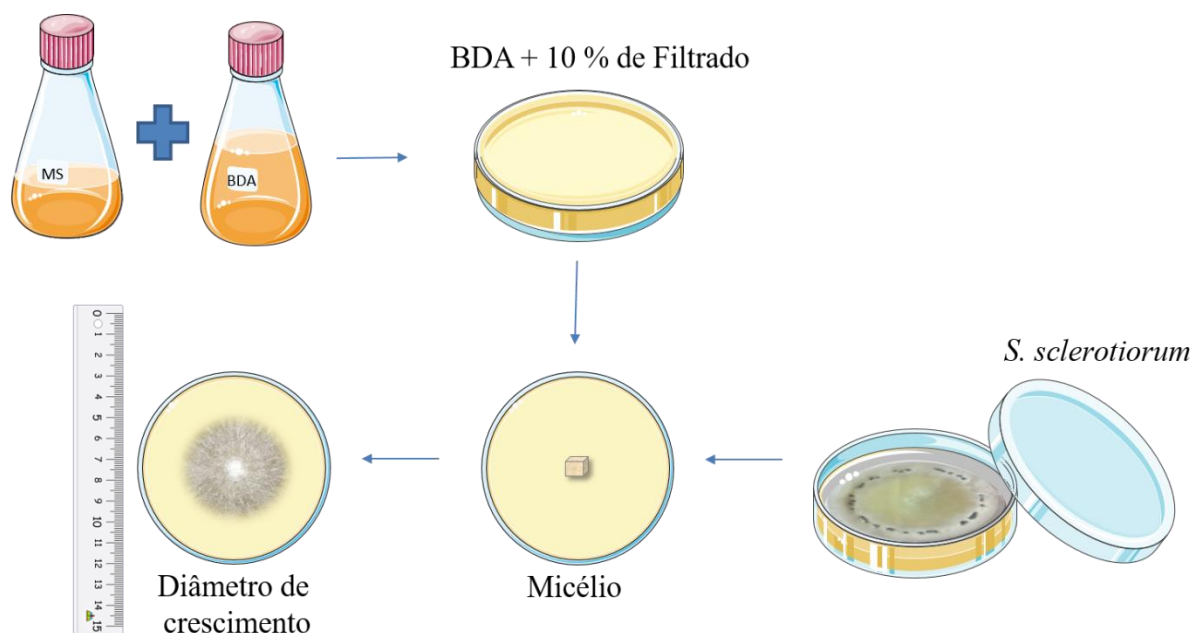


Figura 10. Seleção do melhor isolado de Bactéria simbiote de nematoides entomopatogênicos, para controle do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum*.

#### 4.6. Inibição *in vitro* do crescimento do micélio e da germinação miceliogênica de *Sclerotinia sclerotiorum*, em meio de cultura contendo filtrados de *Xenorhabdus szentirmaii* PAM25

O isolado bacteriano com melhor resultado de inibição do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* foi *X. szentirmaii* PAM25. Este isolado foi cultivado em três Erlenmeyers, cada um contendo 300 mL do meio TSB e mantidos a 27 °C, por 3; 6 e 9 dias, sob agitação constante (150 rpm). A suspensão bacteriana foi centrifugada a 3800 rpm durante 2h e filtrada como descrito no item 4.4. Para cada dia de cultivo (3; 6 ou 9 dias) um disco de BDA contendo o micélio de *S. sclerotiorum* (com 10 dias de crescimento a 25°C na ausência da luz) e um escleródio desinfestado superficialmente (30 segundos em solução de álcool a 70%; 1 minuto em solução de hipoclorito de sódio a 1,5%; tripla lavagem com água destilada esterilizada e secagem em papel de filtro estéril) (com 20 dias de crescimento a 25°C na ausência da luz) foram colocados separadamente no centro da placa de cada tratamento (Figura 11). Como controle foi usado BDA + 10 % de TSB (sem filtrados). Para cada tratamento foram consideradas cinco repetições.

O experimento foi delineado inteiramente ao acaso em esquema fatorial (dias de cultivo e diluição). Todo experimento foi repetido duas vezes no tempo, considerando-se as mesmas condições de montagem e avaliação. A inibição do fungo em ambos experimentos foi

avaliada pela medição do diâmetro da colônia do fungo até que o tratamento controle apresentasse 100% de crescimento.

Em ambos os ensaios, 20 dias após a inoculação avaliou-se a formação ou não de estruturas de resistência do fungo, contando o número de escleródio/placa e medindo o diâmetro da colônia com paquímetro.

Os tratamentos empregados no ensaio foram:

3d 3% MS - 3 dias de produção em meio TBS e 3% de filtrados

3d 10% MS - 3 dias de produção em meio TBS e 10% de filtrados

3d 33% MS - 3 dias de produção em meio TBS e 33% de filtrados

6d 3% MS - 6 dias de produção em meio TBS e 3% de filtrados

6d 10% MS - 6 dias de produção em meio TBS e 10% de filtrados

6d 33% MS - 6 dias de produção em meio TBS e 33% de filtrados

9d 3% MS - 9 dias de produção em meio TBS e 3% de filtrados

9d 10% MS - 9 dias de produção em meio TBS e 10% de filtrados

9d 33% MS - 9 dias de produção em meio TBS e 33% de filtrados

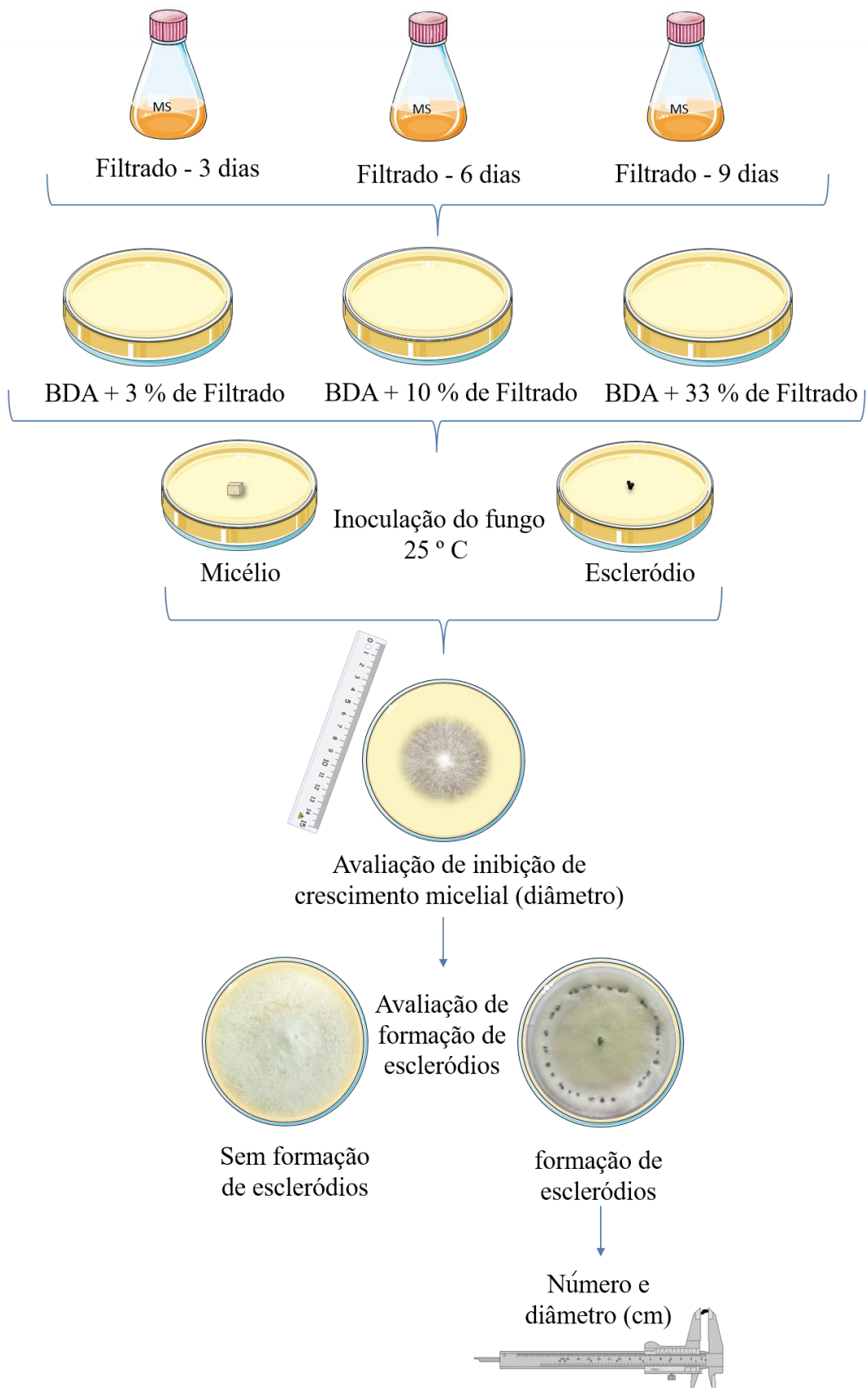


Figura 11. Avaliação da inibição do crescimento micelial e da germinação miceliogênica dos escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*.

#### **4.7. Ação *in vitro* dos compostos orgânicos voláteis de *Xenorhabdus szentirmaii* PAM25, sobre o crescimento micelial e a produção de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum***

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito dos compostos orgânicos voláteis (COVs) produzidos pela bactéria *X. szentirmaii* PAM 25 sobre a inibição da formação de micélio e do escleródio do fungo *S. sclerotiorum*.

A bactéria foi cultivada em três Erlenmeyers, cada um contendo 200 mL do meio TSB + 0,6% de ágar e mantidas a 27 °C por 3; 6 e 9 dias, sob agitação constante (150 rpm). Foram considerados 7 tratamentos: 1) bactérias com 3 dias de cultivo, puras (100%); 2) bactérias com 3 dias de cultivo, diluídas a 33%; 3) bactérias com 6 dias de cultivo, puras (100%); 4) bactérias com 6 dias de cultivo, diluídas a 33%; 5) bactérias com 9 dias de cultivo, puras (100%); 6) bactérias com 9 dias de cultivo, diluídas a 33%; e 7) controle (TSB sem bactéria). Cada tratamento foi constituído de placas de Petri bipartidas e estéreis, num dos lados da placa verteu-se o meio de cultura com cada tratamento e no outro lado foram colocados 10 discos de BDA contendo micélio de *S. sclerotiorum* (com 10 dias de crescimento a 25°C na ausência da luz), ou 10 escleródios (com 20 dias de crescimento a 25 °C na ausência da luz) (Figura 12).

Para o tratamento controle foram utilizados água destilada esterilizada e meio de cultura sem crescimento bacteriano (TSB + 0,6% Ágar). Todas as placas foram seladas com parafilme para evitar a perda dos voláteis produzidos pela bactéria e mantidas a 25 °C por 14 dias. Após este tempo, cada disco de micélio ou escleródio foi transferido separadamente para uma placa de Petri contendo meio BDA.

O delineamento experimental empregado foi o inteiramente ao acaso em esquema fatorial (períodos de cultivo e diluição). Para cada tratamento foram consideradas dez repetições. Todo experimento foi repetido três vezes no tempo, considerando-se as mesmas condições de montagem e avaliação.

A inibição do fungo em ambos experimentos foi avaliada pela medição do diâmetro da colônia do fungo (cm) até que o tratamento controle apresentasse 100% de crescimento, sendo realizada após 18 dias (14 de exposição aos voláteis + 4 de crescimento em placa), para os tratamentos com discos BDA contendo micélio do fungo e 20 dias (14 de exposição aos voláteis + 6 de crescimento em placa), para os tratamentos com escleródio.

Em ambos os ensaios, 20 dias após a inoculação, avaliou-se a formação ou não de estruturas de resistência do fungo, contando o número de escleródio/placa.

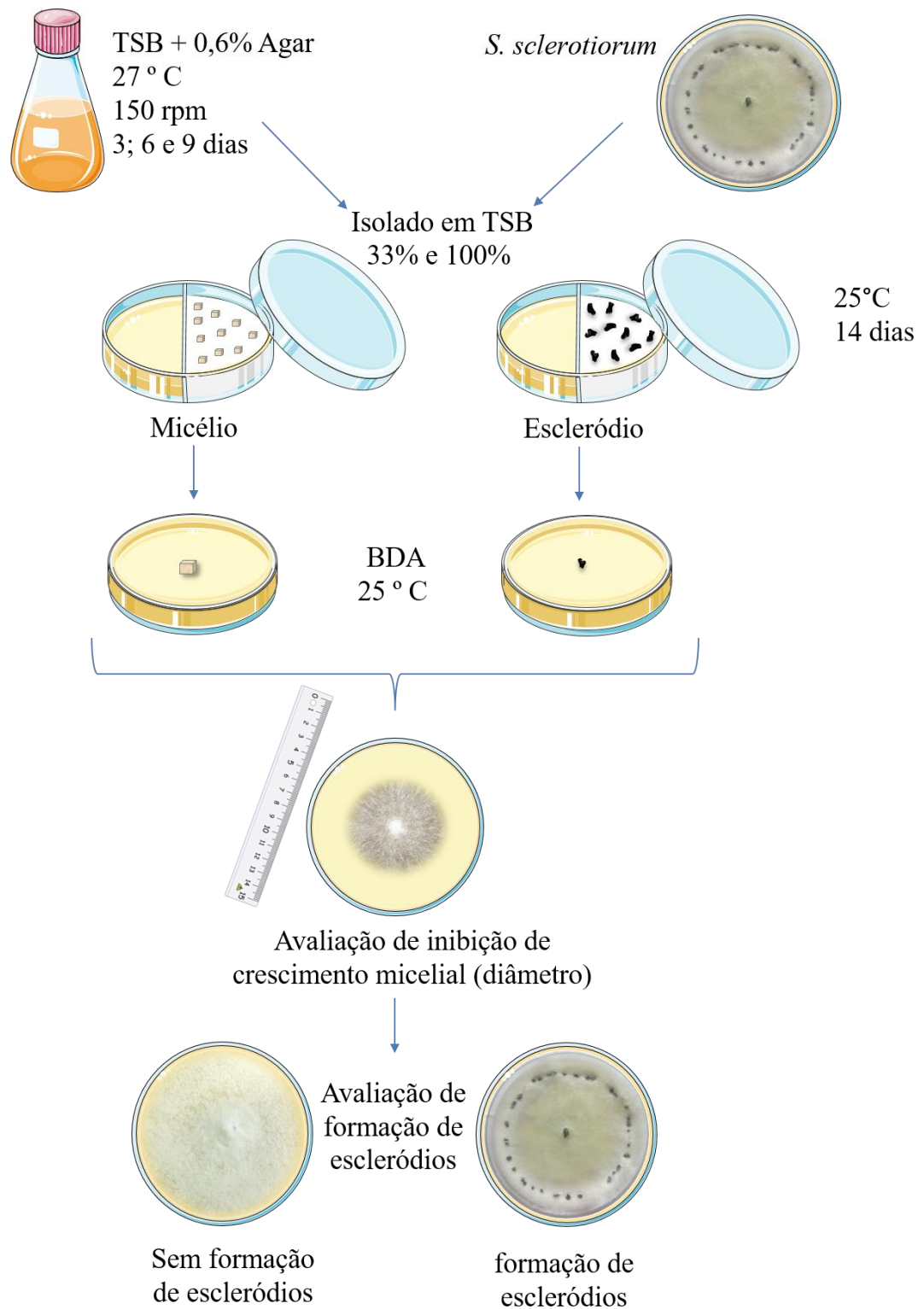


Figura 12. Avaliação do efeito *in vitro* dos compostos orgânicos voláteis de *Xenorhabdus szentirmaii* PAM25 no micélio e nos escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*.



#### **4.8. Efeito dos compostos orgânicos voláteis, produzidos pela bactéria *Xenorhabdus szentirmaii* PAM 25, na germinação de sementes de soja com e sem presença de *Sclerotinia sclerotiorum***

A bactéria foi cultivada em três Erlenmeyers, cada um contendo 200 mL do meio TSB + 0,6% de ágar e mantidas a 27 °C por 3 dias, 6 dias e 9 dias, sob agitação constante (150 rpm). O caldo de crescimento foi vertido em uma das metades de placas de Petri bipartidas nas diluições de 33% e 100%, e na outra metade da placa foram colocadas 10 sementes de soja (Cultivar BMX Potência - RR) com algodão estéril umedecido com água destilada esterilizada (Figura 13).

Para avaliar o efeito de voláteis na germinação das sementes de soja com a presença do fungo fitopatogênico, discos de BDA contendo micélio de *S. sclerotiorum*, com 10 dias de crescimento a 25°C na ausência da luz, foram colocados individualmente em contato com cada semente, de forma que o micélio tocasse a superfície da semente.

Todas as placas foram seladas com parafilme e mantidas a 25 °C por 14 dias. Para cada tratamento foram consideradas três repetições.

O delineamento experimental empregado foi o inteiramente ao acaso em esquema fatorial (dias de crescimento; concentração e inoculação ou não do fungo nas sementes). Todo experimento foi repetido duas vezes no tempo, considerando-se as mesmas condições de montagem e avaliação. A avaliação do ensaio constituiu-se em contar o número de sementes germinadas por repetição em cada tratamento.

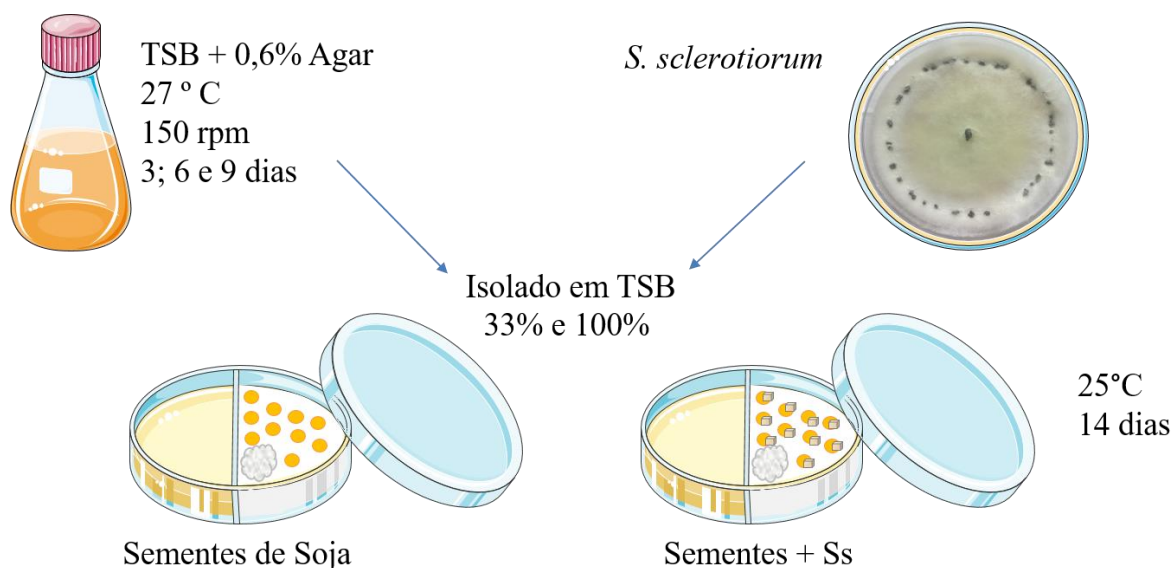


Figura 13. Avaliação do efeito dos compostos orgânicos voláteis de *Xenorhabdus szentirmaii* PAM25, nas sementes de soja, com e sem presença de *Sclerotinia sclerotiorum*.

#### 4.9. Efeito dos filtrados de *Xenorhabdus szentirmaii* PAM25 revestidos em sementes de soja, infestadas com o fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, sobre a sua germinação

O isolado bacteriano foi cultivado em Erlenmeyer, contendo 300 mL do meio TSB e mantido a 27°C por 6 dias, sob agitação constante (150 rpm) (Figura 14).

A suspensão bacteriana foi centrifugada a 3800 rpm durante 2h e filtrada como descrito no item 4.4. Os filtrados foram diluídos em água destilada esteril até obter concentrações de 10; 33 e 100%, adicionando posteriormente 1% de goma xantana para revestir as sementes de soja (cultivar BMX Potência - Embrapa). Como controles, adicionou-se 1% de Goma xantana em água destilada esterilizada e no meio TSB sem filtrados.

As sementes revestidas foram colocadas em placas de Petri, contendo papel filtro estéril umedecido com água destilada estéril. Para os tratamentos na presença do fungo fitopatogênico, no mesmo dia, colocou-se em contato com cada semente 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 dias. Para cada tratamento foram consideradas dez repetições.

O delineamento experimental empregado foi o inteiramente ao acaso em esquema fatorial (diluição e inoculação ou não do fungo nas sementes). Todo experimento foi repetido três vezes no tempo, considerando-se as mesmas condições de montagem e avaliação. O ensaio foi avaliado contando-se o número de sementes germinadas 7 dias após a montagem do experimento.

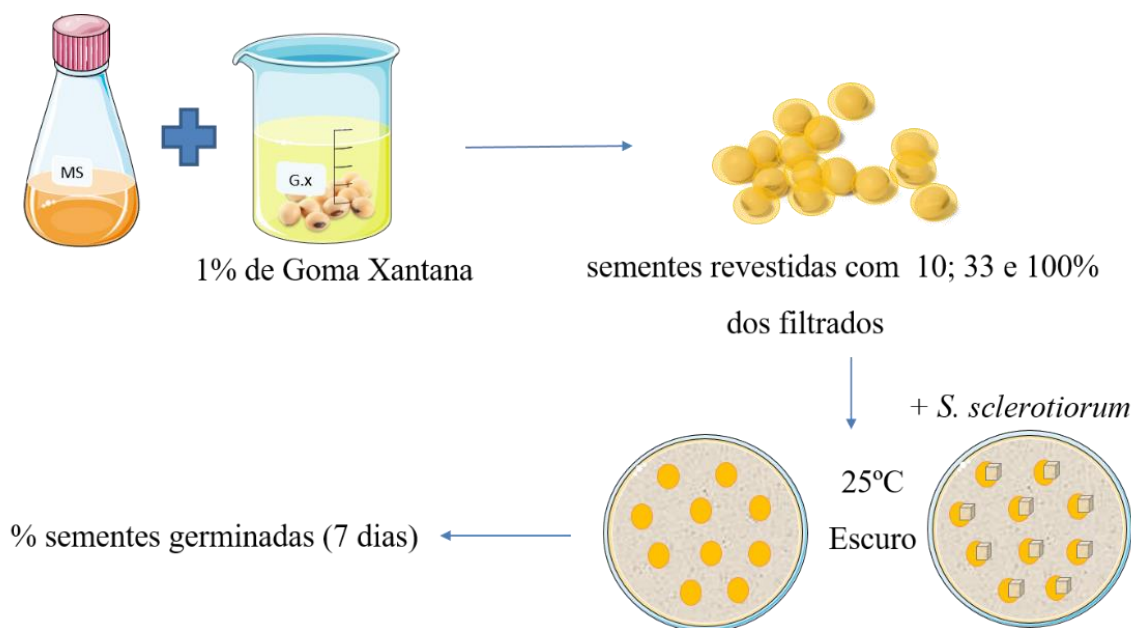


Figura 14. Avaliação do efeito dos filtrados de *Xenorhabdus szentirmatii* PAM25 revestidos em sementes de soja, contendo o fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, sobre a sua germinação.

#### 4.10. Ação da bactéria *Xenorhabdus szentirmatii* PAM25 revestida em sementes de soja contendo o fungo *Sclerotinia sclerotiorum* sobre a sua germinação

A bactéria foi cultivada em 300 mL de TSB e mantida a 27°C sob agitação constante (150 rpm) por 6 dias. As sementes de soja (Cultivar BMX Potência - RR) foram revestidas em diferentes diluições da suspensão bacteriana (10%, 33% e 100%) mais adição de 1% de goma xantana. Como controles negativos, adicionou-se 1% de goma xantana em água destilada esterilizada e no meio TSB sem filtrados, já no controle positivo as sementes foram tratadas com o fungicida CERTEZA® (tiofanato metílico + fluazinam) (Figura 15).

As sementes revestidas foram colocadas em copos plásticos desinfestados com solução de hipoclorito de sódio a 1,5 %, contendo algodão estéril no fundo embebido com 20 mL de água destilada estéril. Para os tratamentos na presença do fungo fitopatogênico, colocou-se em contato com cada semente um disco de BDA contendo o micélio do fungo *S. sclerotiorum* (com 10 dias de crescimento a 25°C na ausência da luz). Os potes foram selados com filme PVC e mantidos a 25°C com fotoperíodo 12 h, durante 21 dias. O delineamento experimental empregado foi o inteiramente ao acaso em esquema fatorial. Para cada tratamento foram consideradas dez repetições. O experimento foi repetido duas vezes no tempo.

Foram realizadas avaliações aos 7 dias, contando o número de sementes germinadas; aos 14 dias contou-se o número de plantas saudas e aos 21 dias mensurou-se a biomassa fresca e o tamanho das plantas.

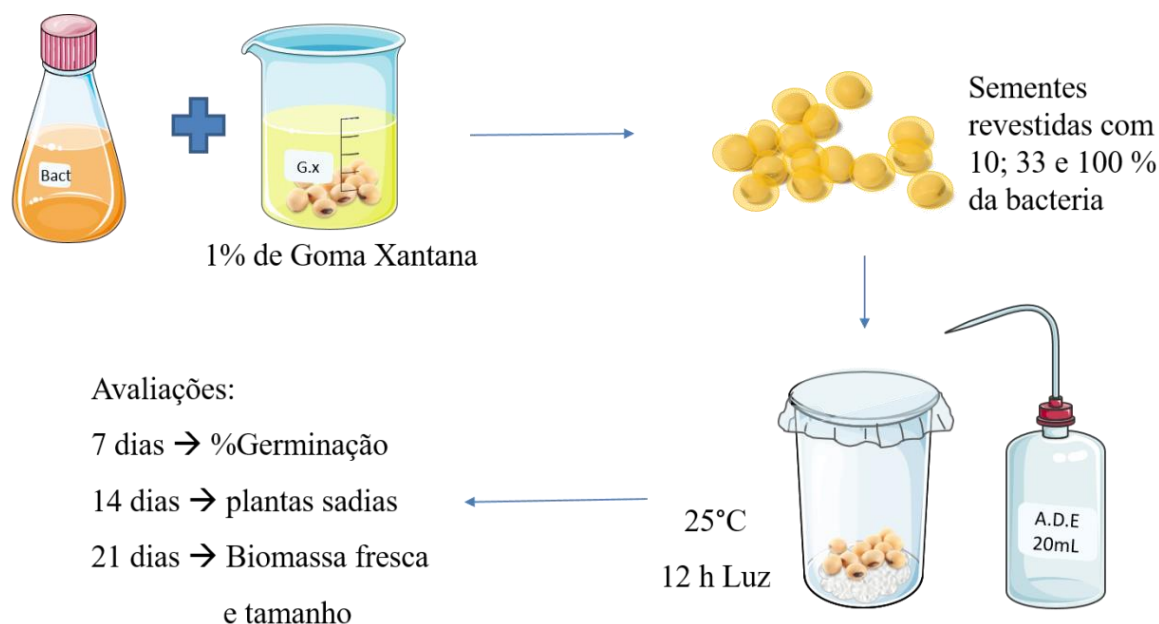


Figura 15. Avaliação do efeito da bactéria *Xenorhabdus szentirmaii* PAM25 revestida em sementes de soja, contendo o fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, sobre a sua germinação

#### 4.11. Capacidade endofítica ou sistêmica de *Xenorhabdus szentirmaii* PAM 25 e seus metabólitos secundários em plantas de soja.

Dez sementes de soja (cultivar BMX Potência - RR) foram colocadas para germinar em potes plásticos com algodão estéril, umedecido com água destilada estéril. Todas os potes foram selados com filme de PVC e mantidos em câmara climatizada a 25 °C com fotoperíodo de 12 h.

Uma colônia bacteriana foi cultivada em 300 mL de TSB e mantida sob agitação constante (150 rpm) por 6 dias a 27 °C. Para os tratamentos regados com os filtrados da bactéria, foi realizado o processo de separação descrito anteriormente (Figura 9). Após aparição das primeiras folhas, a cultura da bactéria ou seus filtrados (metabólitos secundários) foram adicionados como rega (10mL) nas plântulas durante dois dias seguidos. Como controle, as plantas foram regadas somente com água destilada estéril. Após esse tempo, as plantas foram retiradas dos potes e cortadas separadamente para obter as suas raízes, caule e folhas (Figura 16).

Para a avaliação da penetração endofítica da bactéria, todas os fragmentos da planta obtidos foram submetidos a tratamento de desinfestação superficial, primeiramente em álcool a 70% v/v por 30 segundos seguido em hipoclorito de sódio a 1,5% por um minuto. Finalmente, o material foi lavado em água destilada estéril por duas vezes e seco com papel de filtro estéril. A última água da lavagem das raízes, caule e folhas de cada plântula foi plaqueada em meio AN e NBTA e incubadas a 27 °C por 5 dias, para avaliação da eficiência da técnica de

desinfestação. Após a desinfestação, cada uma das partes da planta foi macerada separadamente com água destilada estéril e a suspensão obtida dos fragmentos foram plaqueadas em meio NBTA. O meio foi incubado a 27 °C por 5 dias para avaliação da presença ou ausência das bactérias simbiotes de NEPs no interior das partes obtidas. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso. De cada parte da planta, a suspensão dos fragmentos foram plaqueadas em três placas de Petri contendo o meio de BDA.

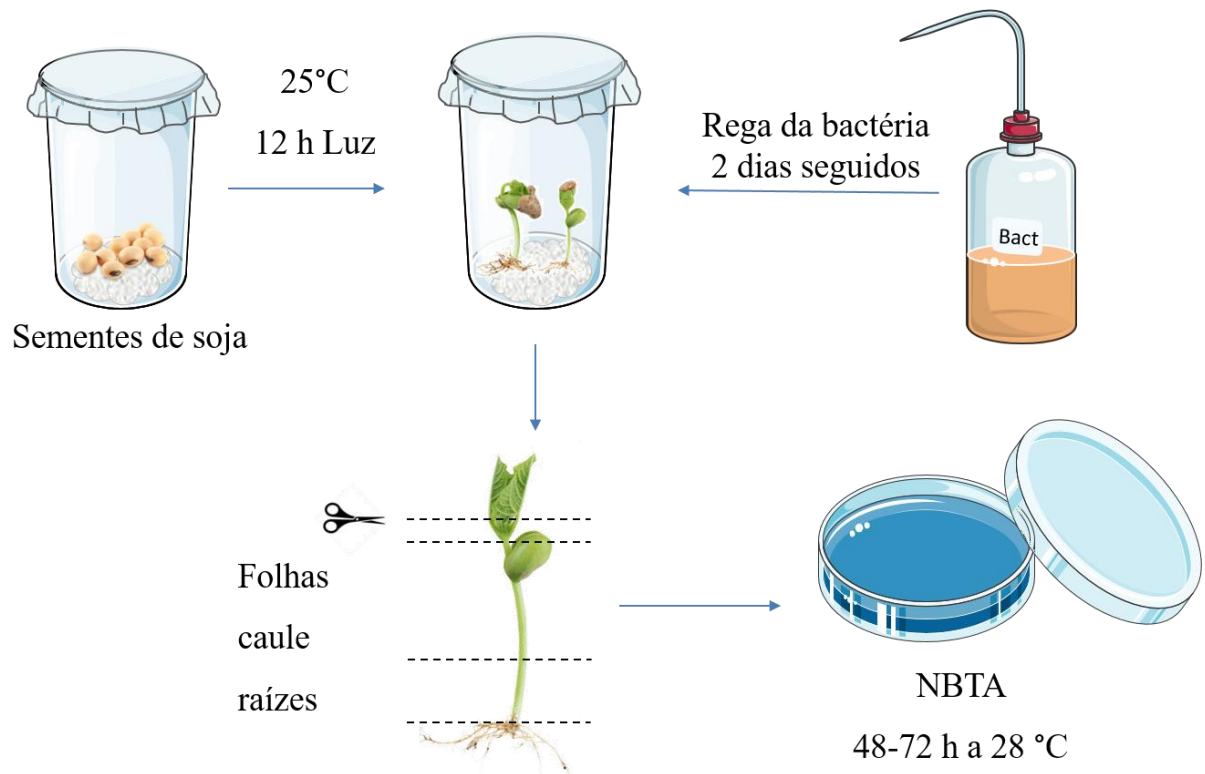


Figura 16. Avaliação da capacidade de penetração endofítica da bactéria *Xenorhabdus szentirmaii* PAM25, em plantas de soja.

Para a avaliação da absorção sistêmica dos metabólitos secundários (Figura 17), todas as partes obtidas foram submetidas a tratamento de desinfestação superficial (PEREIRA, AZEVEDO e PETRINI, 1993) com hipoclorito de sódio 3% por 3 min, seguido de três lavagens em água destilada estéril e secagem em papel de filtro estéril. Após a desinfestação das folhas, caule e raízes, fragmentos de aproximadamente 5 mm de cada parte foram retirados com auxílio de um estilete estéril. Cada fragmento de parte da planta foi inoculado em uma extremidade de uma placa de Petri contendo o meio BDA e na outra extremidade um disco do fungo *S. sclerotiorum* (com 10 dias de crescimento a 25 °C na ausência da luz). As placas foram mantidas em estufa BOD a 27 °C, no escuro, por 5 dias.

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso. De cada parte da planta foram feitas dez placas (repetições). O efeito inibitório do crescimento micelial foi avaliado pela

presença do halo de inibição de crescimento na placa, sendo que se os filtrados da bactéria entraram na planta o fungo não conseguiria se desenvolver ao redor do fragmento da planta.

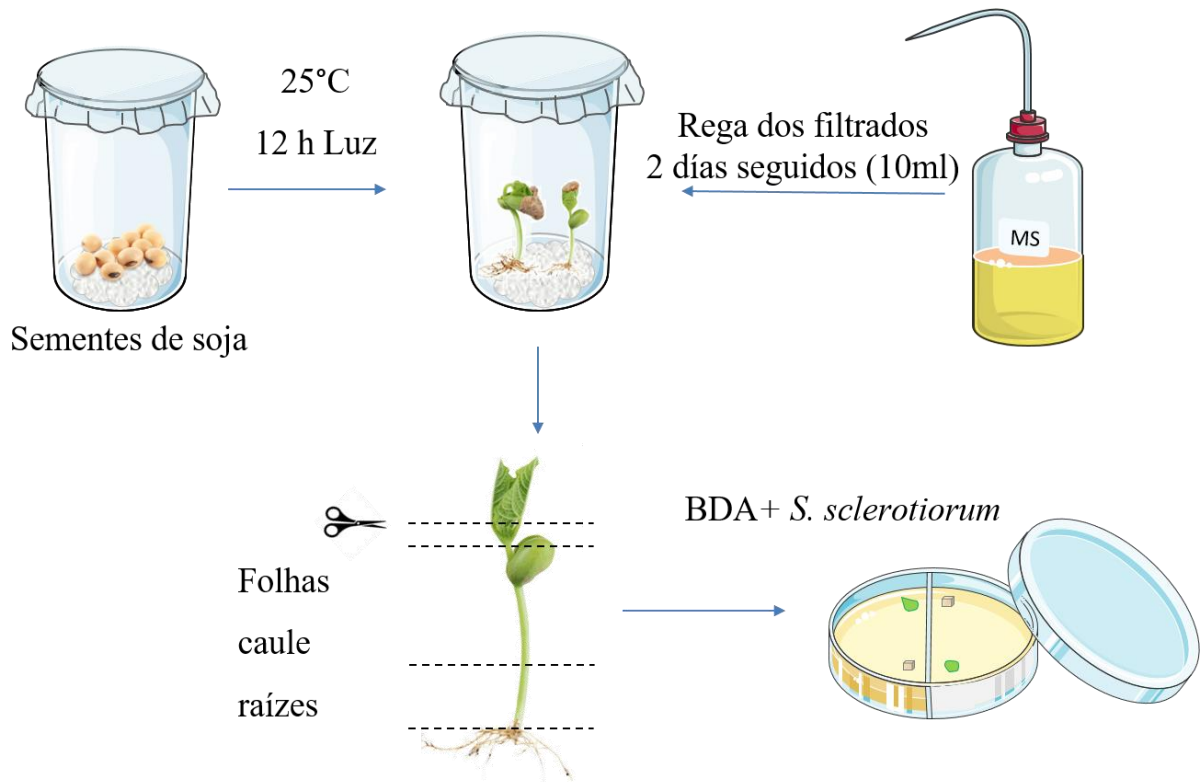


Figura 17. Avaliação do efeito inibitório do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum*, a partir de exsudados de plantas de soja, regadas com filtrados (MS) da bactéria *Xenorhabdus szentirmaii* PAM 25.

#### 4.12. Análise estatística

Todos os dados do percentual de inibição do fungo *S. sclerotiorum* de cada tratamento de cada ensaio *in vitro* foi comparado em relação ao tratamento controle, aplicando a seguinte equação:

$\arcsen \sqrt{X}/100$ , sendo X o valor de inibição das repetições dos tratamentos de cada experimento.

Para permitir as análises, os dados de tamanho do escleródio (cm), altura (cm) e Biomassa fresca (g) das plantas de soja foram transformados em  $\sqrt{X} + 0,5$ , sendo X o valor das repetições dos tratamentos de cada experimento.

O programa estatístico utilizado foi o SISVAR DEX/UFLA, versão 5.4. O teste empregado para a comparação das médias dos tratamentos foi o Tukey com 1% de probabilidade.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1. Seleção de filtrados produzidos pelos isolados de bactérias simbiotes de NEPs contra o crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum*

Os filtrados dos 16 isolados das bactérias simbiotes (tabela 3) apresentaram grandes variações nas porcentagens de inibição do crescimento do micélio de *S. sclerotiorum*, tendo os filtrados de *X. szentirmaii* PAM 11 e PAM 25 proporcionado os maiores percentuais de inibição do fungo, de 82% e 83%, respectivamente, diferindo significativamente dos demais filtrados dos outros isolados ( $F=283.625$ ;  $P < 0.001$ ) (Figura 18, Anexo A).

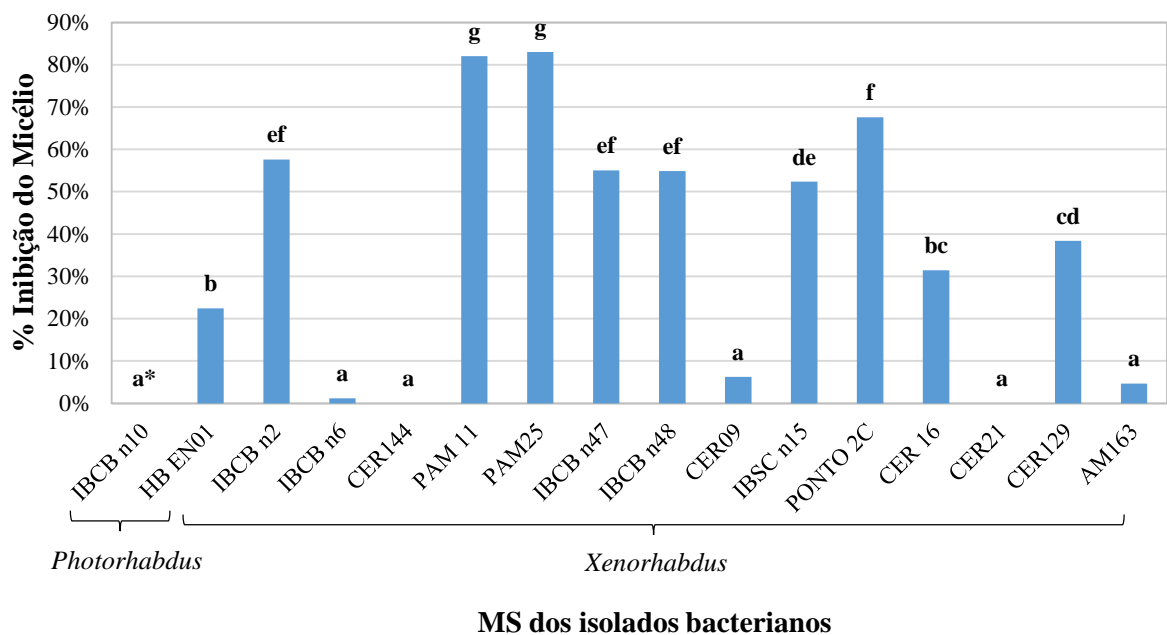


Figura 18. Porcentagem de inibição *in vitro* do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum*, utilizando filtrados de bactérias simbiotes de nematoides entomopatogênicos. \* Tratamentos com a mesma letra, não diferem estatisticamente entre si, de acordo com o teste de Tukey com 1% de probabilidade. CV = 8.65%

Os filtrados de *Xenorhabdus* sp., isolados IBCB n6, CER144, CER09, CER21 e AM163, e de *P. luminescens* IBCB10 apresentaram as menores taxas de inibição micelial de *S. sclerotiorum*, com variações de 0 a 6%, diferindo significativamente dos demais filtrados (Figura 18).

As bactérias *X. szentirmaii* e *X. budapestensis* têm se destacado em diversos outros estudos demonstrando que seus filtrados têm efeito na inibição do crescimento de diversos microrganismos, como para bactérias causadoras da mastite bovina *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* (FURGANI et al., 2008); para bactérias patogênicas *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*; para as próprias bactérias simbiotes de NEPs (FODOR et al., 2010); para bactérias fitopatogênicas como *Erwinia*

*amylovora* (BÖSZÖRMÉNYI et al., 2009); e ainda para fungos fitopatogenicos como *Fusicladium carpophilum*, *Phytophthora nicotianae*, *F. effusum*, *Monilinia fructicola*, *Glomerella cingulata* e *Armillaria tabescens* (HAZIR et al., 2016).

Os filtrados dos isolados de *Photorhabdus* (IBCB n10 e HB EN01) proporcionaram no máximo 22% de inibição micelial do fungo, enquanto que a maioria dos filtrados dos isolados de *Xenorhabdus* (IBCB n2, PAM 11, PAM 25, IBCB n47, IBCB n48, IBSC15, Ponto2C, CER 21, CER 129 e AM 163) proporcionaram inibições acima de 30% (Figura 18). Diversos outros estudos têm demonstrado tendências de maiores atividades antimicrobianas para espécies de *Xenorhabdus*, quando comparadas às espécies de *Photorhabdus* (BÖSZÖRMÉNYI et al., 2009; HAZIR et al., 2016).

Essas variações nas atividades dos filtrados das bactérias simbiotes sobre o fungo *S. sclerotiorum* já eram esperadas, pois são resultantes da produção de compostos quimicamente diferentes, dependendo da espécie e isolado da bactéria, conforme já observado em estudos anteriores contra outros fungos e bactérias fitopatogênicas (PAUL et al., 1981; CHEN; DUNPHY; WEBSTER, 1994; ISAACSON; WEBSTER 2002; WEBSTER et al., 2002; BÖSZÖRMÉNYI et al., 2009; SHAPIRO-ILAN; REILLY; HOTCHKISS, 2009; SHAPIRO-ILAN, BOCK; HOTCHKISS, 2014).

No controle de *S. sclerotiorum*, as bactérias simbiotes testadas quanto ao efeito dos seus filtrados, no crescimento micelial *in vitro* do fungo, foram *X. bovienii* YL002, *Xenorhabdus nematophila* TB e *X. nematophila* YL001, apresentando taxas de inibição elevadas, de  $91,23 \pm 2,67\%$  (FANG et al., 2011); no entanto, até o momento não há estudos procurando avaliar os filtrados dessas bactérias quanto ao seu efeito *in vivo* para *Sclerotinia sclerotiorum*.

Para os testes subsequentes de inibição *in vitro* e *in vivo* de *S. sclerotiorum*, utilizou-se o isolado *X. szentirmaii* PAM 25 por apresentar a maior taxa de inibição *in vitro* no crescimento micelial do fungo (Figura 18).

## **5.2. Inibição *in vitro* do crescimento micelial e da germinação dos escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*, pelos filtrados de *Xenorhabdus szentirmaii* PAM25**

Para o fungo inoculado como micélio sobre meio sólido + filtrados (Figura 19A; Anexo B), os filtrados obtidos de *X. szentirmaii* PAM25 com 6 dias de cultivo da bactéria proporcionaram as maiores porcentagens de inibição micelial do fungo *S. sclerotiorum*, com níveis de 46,94 a 100%, dependendo da diluição, diferindo significativamente nas respectivas



diluições dos filtrados obtidos com 3 e 9 dias de cultivo ( $F= 388.609$ ;  $P<0.001$ ), com percentuais de inibição do fungo de 0 a 83,29% e de 0 a 76,82%, respectivamente (Figura 19A).

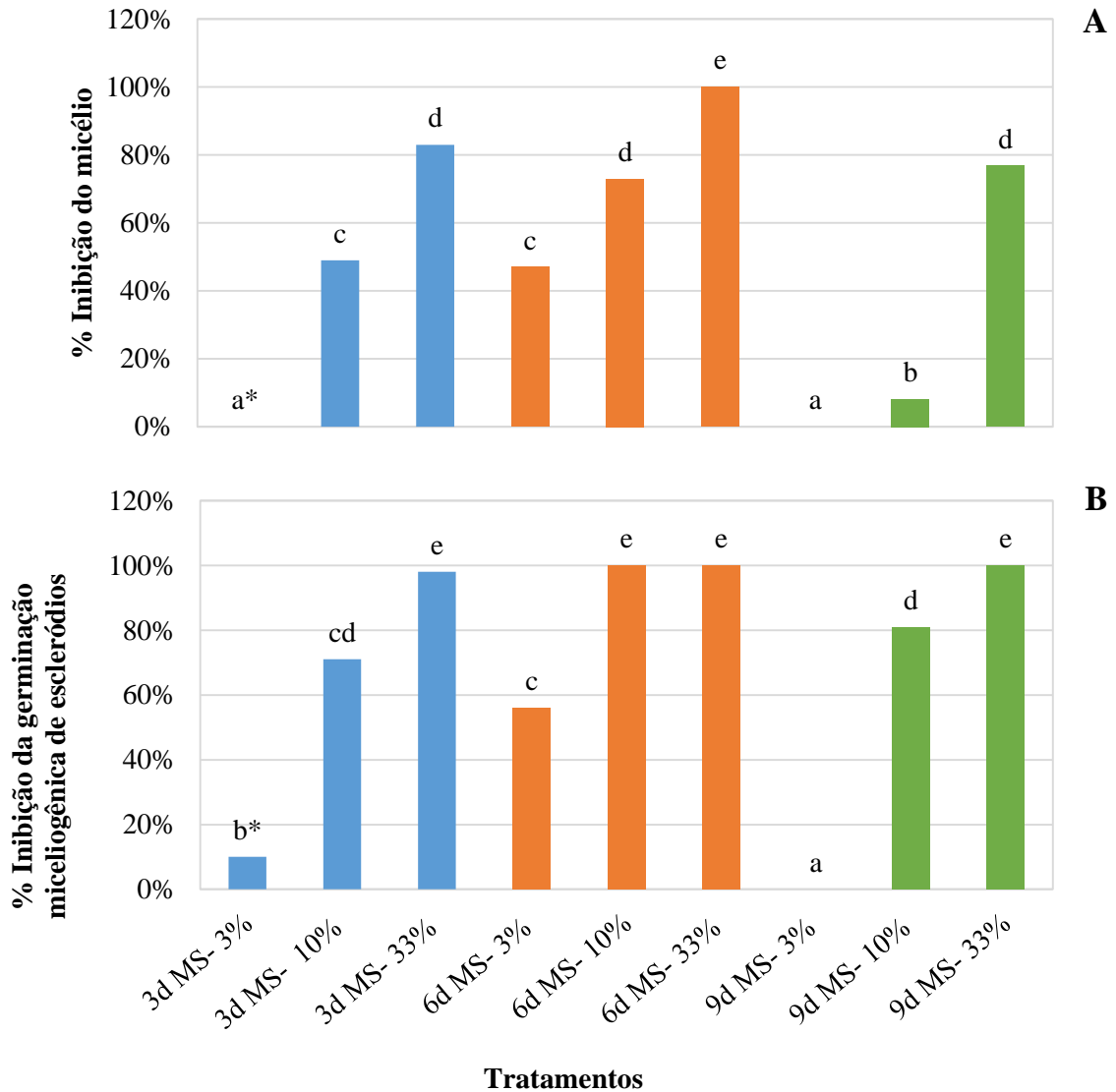


Figura 19. Porcentagem de inibição do crescimento micelial (A) e da inibição da germinação miceliogênica de escleródios (B) de *Sclerotinia sclerotiorum* em meios de cultura contendo filtrados da bactéria (MS) *Xenorhabdus szentirmaii* PAM 25 produzidos com diferentes tempos de cultivos e diferentes diluições destes filtrados incorporados em meio de cultura. \*Tratamentos com a mesma letra, não diferem estatisticamente entre si, segundo teste Tukey com 1% de probabilidade.  $CV_{\text{micélio}} = 10.53\%$ ,  $CV_{\text{escleródio}} = 23.59\%$

As maiores taxas de inibições para os filtrados da bactéria obtidos com 6 dias de cultivo podem estar relacionadas ao maior acúmulo de metabólitos secundários (antibióticos e exoenzimas), até esse momento de avaliação, seguido de uma provável degradação dos mesmos. Segundo Forst e Neilson (1996), na curva de crescimento das bactérias simbiotes dos NEPs ocorre um aumento na produção das exoenzimas (lipases, quitinases, proteases e fosfolipases), após o final da fase logarítmica até o final da fase estacionária.

Para os testes de inibição da germinação miceliogênica (Figura 19B), nota-se a mesma tendência observada para o teste com micélio. Entretanto, filtrados obtidos de culturas com cultivos de 3; 6 e 9 dias, diluídos a 33%, e de culturas com 6 dias e diluídas a 10%, proporcionaram níveis de inibição da germinação miceliogênica  $\geq 98\%$ , não diferindo entre si, mas diferindo-se em relação aos demais filtrados ( $F= 249,187$ ;  $P<0,001$ ). Já o filtrado obtido com 6 dias de cultivo e diluído a 3% inibiu a germinação miceliogênica em 56%, diferindo-se daqueles obtidos com 3 e 9 dias de cultivo, na mesma diluição.

Para ambos os testes realizados com micélio e com escleródio de *S. sclerotiorum*, observou-se um aumento na inibição do crescimento micelial do fungo com o aumento da diluição dos filtrados no meio de cultivo, independentemente do tempo de cultivo da bactéria (Figuras 19 A e B). Essa mesma correlação foi observada por Hazir e colaboradores (2018) ao avaliar o efeito de diferentes concentrações (10%, 20%, 40%, 60%, 80% e 100%) dos filtrados de *X. szentirmaii* no crescimento dos fungos fitopatogênicos *Monilinia fruticola* e *Glomerella cingulata*.

Comparando os testes realizados com micélio e com escleródio, nota-se maior inibição do fungo quando oriundos de escleródio para todos os tratamentos, demonstrando claramente que o escleródio pode ter sido mais afetado pelos filtrados, que os discos de micélio (Figuras 19 A e B). Segundo Adams e Ayers (1979), a microbiota do solo é considerada como o fator mais importante dentre aqueles que afetam a sobrevivência dos escleródios no campo, seguido dos fatores temperatura e pH do solo.

Para o fungo inoculado como micélio, os filtrados obtidos de culturas com 3 e 9 dias, diluídos a 33%, e filtrados obtidos de culturas com 6 dias, diluídos a 10%, não inibiram totalmente o crescimento micelial do fungo, mas inibiram totalmente a formação de escleródios que seriam produzidos sobre o micélio, mesmo após o micélio ter coberto todo o meio de cultura aos 20 dias da inoculação (Tabela 4). Dessa forma, os filtrados obtidos de culturas com 6 dias e diluídos a 33% e 10% merecem ser testados quanto à eficiência *in vivo* já que inibiram totalmente o crescimento micelial do fungo inoculado como micélio e escleródio, exceto o filtrado diluído a 10% que permitiu algum crescimento micelial do fungo inoculado como micélio (Figura 19A), mas inibiu totalmente a produção de escleródios (Tabela 4).

Os demais tratamentos com filtrados (3d MS -10%; 6d MS -3%; 9d MS -3%; 9d MS -10%; ) não inibiram totalmente o crescimento micelial do fungo inoculados como micélio e escleródio (Figura 19A e B), permitindo a colonização de todo o meio de cultura após 20 dias de inoculação, mas com reduções significativas no número ( $F_{\text{micélio}} = 235,536$  e  $F_{\text{escleródio}} = 379,531$ ;  $P < 0,001$ ) e nos diâmetros ( $F_{\text{micélio}} = 182,312$  e  $F_{\text{escleródio}} = 342m,930$ ;  $P < 0,001$ ) dos

escleródios produzidos, exceto para o filtrado 3d MS – 3% que não diferiu do tratamento controle (Tabela 4).

Tabela 4, Número e diâmetro de escleródios produzidos após 20 dias de crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum*, no meio de cultura BDA, com diferentes tempos de produção e concentrações de metabólitos secundários da bactéria *Xenorhabdus szentirmaii* PAM 25.

Tratamento	Estruturas do fungo plaqueadas no meio de cultura BDA			
	Micélio	Escleródio	Micélio	Escleródio
	Número		Diâmetro (cm)	
3d MS - 3%	24 a*	21 A*	0,22 ab*	0,24 A*
3d MS- 10%	13 bc	9 C	0,14 c	0,12 D
3d MS- 33%	0 d	0 D	0,00 d	0,00 E
6d MS- 3%	17 b	7 C	0,19 b	0,18 BC
6d MS- 10%	0 d	0 D	0,00 d	0,00 E
6d MS- 33%	0 d	0 D	0,00 d	0,00 E
9d MS- 3%	13 bc	12 B	0,13 c	0,20 B
9d MS- 10%	12 c	11 B	0,13 c	0,15 C
9d MS- 33%	0 d	0 D	0,00 d	0,00 E
Controle	24 a	23 A	0,24 a	0,24 A

\* As médias seguidas pela mesma letra, minúscula entre escleródios gerados a partir do disco de micélio e maiúscula entre escleródios gerados a partir de escleródios, não diferem estatisticamente entre si, segundo teste Tukey com 1% de probabilidade. Número, CV<sub>micélio</sub> = 19.80%; CV<sub>escleródio</sub> = 15.70% e Diâmetro CV<sub>micélio</sub> = 5.91%; CV<sub>escleródio</sub> = 4.54%.

*S. sclerotiorum* é um fungo de difícil controle no campo, principalmente por produzir escleródios que são estruturas de resistência e que permanecem viáveis por vários anos no solo (FERRAZ et al., 2003; FERNANDO et al., 2005). Portanto, a inibição na formação de escleródios ou a inviabilização dessas estruturas pode contribuir para um controle efetivo do fungo, já que pode interromper o ciclo reprodutivo do fitopatógeno.

Os compostos produzidos por *X. szentirmaii* são xenofuranone A e B (BRACHMANN et al., 2006), szentiamide (NOLLMANN et al., 2012), xenematide (OHLENDORF et al., 2011), e anthrarufin (antraquinona) (LADELL, 2011), todos com atividade antibacteriana já demonstrada, porém ainda não estudados quanto ao modo de ação sobre o micélio e escleródios de *S. sclerotiorum*. Considerando que *S. sclerotiorum* é um ascomiceto os modos de ação de *X. szentirmaii* sobre esse fitopatógeno podem ser os mesmos que aqueles observados por Liu (2006), quando avaliou o efeito de *X. nematophila* YL001 sobre o micélio do fungo

fitopatogênico *Botrytis cinerea*, também ascomiceto: alterações morfológicas e estruturais tais como malformação dos septos, dissolução da parede celular e infiltração de líquido celular.

### 5.3. Efeito *in vitro* dos compostos orgânicos voláteis de *Xenorhabdus szentirmaii* PAM 25 no micélio e nos escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*

No estudo para avaliar o efeito de compostos orgânicos voláteis (COVs), provenientes da cultura da bactéria *X. szentirmaii* PAM 25, sobre o micélio e escleródios de *S. sclerotiorum*, nota-se 100% de inibição quando essas estruturas ficaram expostas aos COVs produzidos por culturas puras da bactéria (100%), obtidas com 3; 6 e 9 dias de cultivo (Figura 20, Anexo C).

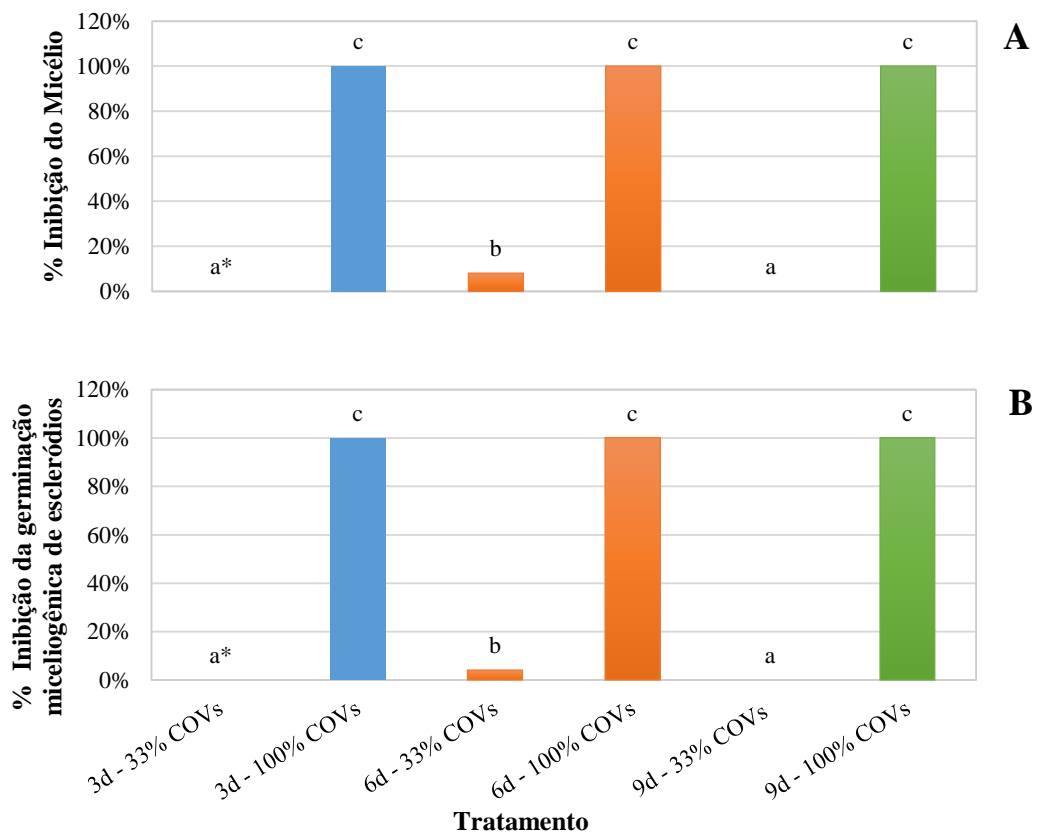


Figura 20. Porcentagem de inibição do crescimento micelial (após 4 dias de crescimento (A) e da inibição da germinação miceliogênica de escleródio (após 6 dias de crescimento) (B), expostos durante 14 dias aos compostos orgânicos voláteis (COVs) de *Xenorhabdus szentirmaii* PAM 25. \*Tratamentos com a mesma letra não diferem estatisticamente entre si, segundo teste Tukey com 1% de probabilidade.  $CV_{\text{micélio}} = 13.78\%$ ,  $CV_{\text{escleródio}} = 15.78\%$

Os COVs gerados por culturas da bactéria obtidas com 3; 6 e 9 dias de cultivo e diluídas a 33% permitiram o crescimento micelial do fungo e a germinação miceliogênica do escleródio, tendo COVs gerados por culturas com 6 dias de cultivo proporcionado uma ligeira inibição no crescimento micelial, diferindo dos COVs gerados pelas culturas com 3 e 9 dias de

cultivo das bactérias ( $F_{\text{micélio}} = 2166,283$ ;  $P < 0,001$ ) ( $F_{\text{escleródio}} = 1453,866$ ;  $P < 0,001$ ). Já os COVs gerados pela cultura de bactéria cultivada por 6 dias e diluída a 33%, apesar de terem permitido o crescimento micelial do fungo inoculado como escleródio, inibiram totalmente a produção de escleródios na colônia (Tabela 5), sugerindo ter causado a esterilização do micélio.

Tabela 5. Número de escleródios produzidos após 20 dias de crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* oriundos de micélio e escleródio no meio de cultura BDA, contendo voláteis da cultura da bactéria *Xenorhabdus szentirmaii* PAM 25, cultivada por diferentes tempos e diluída em duas concentrações diferentes.

Tratamento	Estruturas do fungo plaqueadas no meio BDA	
	Micélio	Escleródio
3d - 33% COVs	21,3 b*	13,75 B*
3d - 100% COVs	0 e	0 D
6d - 33% COVs	5,05 d	0 D
6d - 100% COVs	0 e	0 D
9d - 33% COVs	10,8 c	6,65 C
9d - 100% COVs	0 e	0 D
Controle	31 a	23 A

\* As médias seguidas pela mesma letra, minúscula entre escleródios gerados a partir do disco de micélio e maiúscula entre escleródios gerados a partir de escleródios, não diferem significativamente entre si, segundo teste Tukey com 1% de probabilidade.  $CV_{\text{micélio}} = 22,80\%$ ;  $CV_{\text{escleródio}} = 28,74\%$

Para o fungo inoculado como micélio, os COVs gerados por culturas com 6 dias, diluídas a 33%, permitiram o crescimento micelial do fungo por toda a placa após 20 dias, mas reduziram significativamente ( $F = 237,737$ ;  $P < 0,001$ ) o número de escleródios produzidos (Tabela 5). Embora tenha produzido menor número de escleródios quando exposto aos COVs como micélio, o fungo pode ter sido mais afetado quando exposto como escleródio já que gerou micélio mas inibiu a produção de escleródio.

Os demais COVs gerados por culturas com 3 e 9 dias, diluídas a 33%, não inibiram totalmente o crescimento micelial nem a germinação miceliogênica, permitindo a colonização do meio de cultura, mas também com reduções significativas na produção de escleródios ( $F_{\text{micélio}} = 237,737$ ;  $P < 0,001$ ) ( $F_{\text{escleródio}} = 181,505$ ;  $P < 0,001$ ).

Este é o primeiro estudo a demonstrar a emissão de COVs por culturas da bactéria *X. szentirmaii*, com efeitos bastante claros sobre micélio e escleródio de *S. sclerotiorum* patogênico para soja. A identificação desses voláteis poderá contribuir para o desenvolvimento de fungicidas com potencial de uso em fumigações para tratar sementes contaminadas com escleródios ou pequenas porções de solo com o fungo.

Outros estudos têm avaliado o efeito de voláteis na inibição do fungo *S. sclerotiorum*, porém obtidos a partir de outras bactérias e de fungos. Segundo Kai e colaboradores (2007), bactérias podem interagir com fungos mediante a liberação de COVs, que podem agir em uma determinada espécie de fungo ou em múltiplas espécies da comunidade ecológica. Esses COVs podem causar desde a inibição quase completa do crescimento micelial, até pequenas reduções de crescimento, além de anomalias morfológicas miceliais e conidiais (CHAURASIA et al., 2005).

Voláteis de *Paenibacillus polymyxa*, *Bacillus subtilis* e *Bacillus pumilus* causaram diferentes níveis de inibição no crescimento micelial de *S. sclerotiorum* (Liu e colaboradores, 2008), sugerindo que a suscetibilidade do patógeno pode variar de acordo com a espécie de bactéria, como já observado em outros estudos (MOORE-LANDECKER; STOTZKY, 1972; FIDDAMAN; ROSSALL, 1994; MACKIE; WHEATLEY, 1999). Giorgio e colaboradores (2015) avaliaram COVs dos isolados de *Pseudomonas brassicacearum* USB2101, USB2102 e USB2104, de *Bacillus megaterium* (USB2103) e dos isolados de *Pseudomonas putida* USB2105 e USB2106 e verificaram que os voláteis de todas as rizobactérias testadas, exceto de *B. megaterium* USB2103, causaram alta inibição no crescimento *in vitro* de *S. sclerotiorum*.

Lobo e Abreu (2000) avaliaram os metabólitos voláteis produzidos pelos fungos *Trichoderma viride* “TR2”, *T. aureoviride* “T10”, *T. koningii* “T15”, *T. pseudokoningii* “T26” e *Penicillium* sp. “P1” contra *S. sclerotiorum*, *in vitro* e verificaram taxas de inibição do micélio de até 100%, quando mantidos a temperaturas de 10 e 20 °C. Segundo os autores, a seleção de antagonistas deve ser realizada sob diferentes temperaturas, incluindo a temperatura ótima do patógeno.

Fialho e colaboradores (2011) avaliaram o efeito *in vitro* dos COVs produzidos por *Saccharomyces cerevisiae* na inibição de *S. sclerotiorum* e verificaram inibição completa do crescimento micelial do fungo pelos compostos 2-metil-1-butanol e 3-metil-1-butanol.

Segundo Wu e colaboradores (2015), metabólitos voláteis de *Streptomyces albulus* NJZJSA2 causaram 100% de inibição no crescimento micelial de *S. sclerotiorum* em teste *in vitro*, e retardaram a germinação dos escleródios no solo.

Além de estudos *in vitro*, Mercier e Jiménez (2004), realizaram estudos em pós-colheita, para o controle de podridão em maçãs e pêssegos, demonstrando que os COVs produzidos pelo fungo *Muscodora albus* inibiram e inviabilizaram estruturas de uma ampla gama de patógenos de produtos armazenados, pertencentes às espécies de *Botrytis*, *Colletotrichum*, *Geotrichum*, *Monilinia*, *Penicillium* e *Rhizopus*.

Mercier e Manker (2005) e Koitabashi (2005) realizaram testes *in vivo* com COVs produzidos pelos fungos *Muscodora albus* e Kyu-W63 (não identificado) para o controle dos fungos fitopatogênicos *Phytophthora capsici* e *Oidium* sp., respectivamente, em casa de vegetação. Os COVs inibiram os fungos, controlando totalmente o tombamento nas plântulas de brócolis (causado por *P. capsici*) e reduzindo significativamente a severidade da doença (60%) causada pelo *Oidium* sp. na cultura de salsa. Esses resultados sugerem o uso dos COVs como controladores biológicos de doenças em estufa sem causar efeitos adversos às plantas. A natureza volátil de certos antibióticos confere a vantagem de poderem atingir microrganismos em locais fora da área tratada (LOBO; ABREU, 2000).

#### **5.4. Efeito dos compostos orgânicos voláteis, produzidos pela bactéria *Xenorhabdus szentirmaii* PAM 25, na germinação de sementes de soja, com e sem presença de *Sclerotinia sclerotiorum***

No estudo para avaliar o efeito dos COVs de *X. szentirmaii* PAM 25 sobre a semente de soja, inoculada ou não com *Sclerotinia sclerotiorum*, nota-se um efeito inócuo do volátil sobre a semente, independentemente da diluição do filtrado e do tempo para sua obtenção. Os COVs também não apresentaram eficiência para impedir o desenvolvimento do fungo sobre as sementes, possibilitando que o patógeno colonizasse a semente e a inviabilizasse em qualquer das diluições e tempos de cultivo da bactéria (Figuras 21 e 22). A razão da ineficiência dos COVs para inibir o fungo, pode estar relacionada ao fato do fungo ter sido exposto ao volátil quando já estava inoculado na semente, podendo este ter sido afetado pelo volátil antes do contato com a semente, como demonstrado anteriormente, não tendo havido um tempo suficiente para que o volátil inviabilizasse totalmente o fungo antes de penetrar na semente.

Segundo Bailly e Weiskopf (2012), alguns compostos voláteis produzidos por microrganismos podem causar efeitos inibidores ou promotores de crescimento no desenvolvimento da planta. Hung e colaboradores (2014) avaliaram o efeito de 23 COVs isolados a partir de espécies fúngicas sobre plantas de *Arabidopsis thaliana*, observando efeitos positivos, negativos e neutros na taxa de germinação de sementes e formação de plântulas.

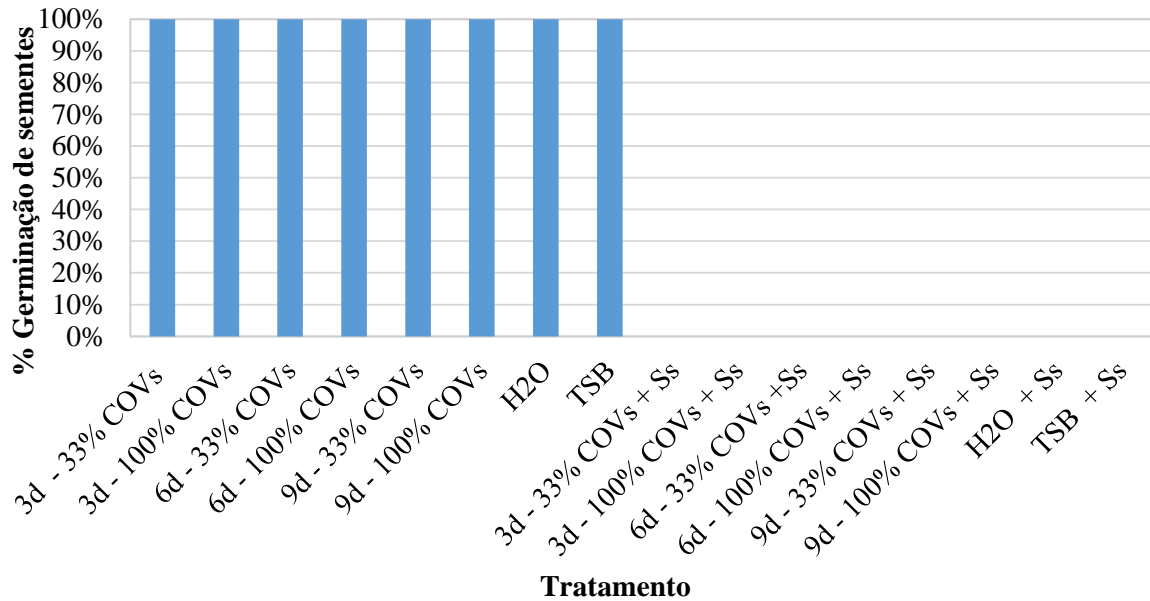


Figura 21. Porcentagem de germinação das sementes de soja “BMX Potência-RR” sem e com inoculação do fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, as quais ficaram expostas por 14 dias aos compostos orgânicos voláteis (COVs) da bactéria *Xenorhabdus szentirmaii* PAM 25.

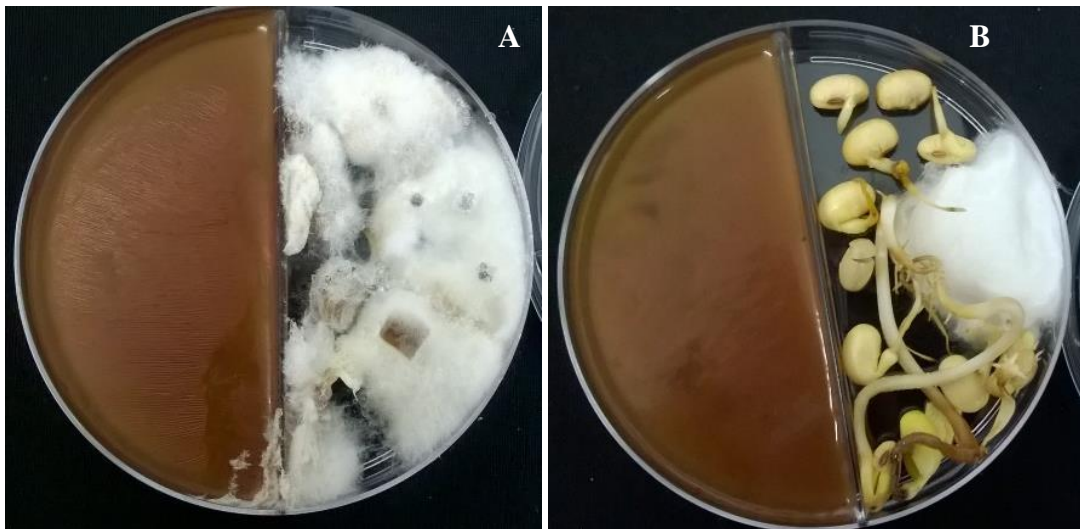


Figura 22. A) Sementes de soja “BMX Potência-RR” com *Sclerotinia sclerotiorum*, e B) Sementes de soja “BMX Potência” sem *S. sclerotiorum*. Ambas expostas por 14 dias aos COVs produzidos pela bactéria *Xenorhabdus szentirmaii* PAM25.

### 5.5. Efeito dos filtrados da bactéria *Xenorhabdus szentirmaii* PAM25, revestidos em sementes de soja, contendo ou não o fungo *Sclerotinia sclerotiorum*

Para o teste de revestimento das sementes de soja com filtrados da bactéria *X. szentirmaii* PAM25, nota-se uma ineficiência total do filtrado na inibição do fungo *S. sclerotiorum* quando diluído para 10% (0% de germinação) (Figura 23 e 24, Anexo D). Já o filtrado diluído a 33% proporcionou uma certa proteção da semente contra a ação do fungo,



porém com porcentagens de germinação das sementes (37%) ainda abaixo daquele obtido no controle H<sub>2</sub>O+G.xantana (63%), mas idêntico ao percentual do controle TSB+G.xantana (46%). Para o filtrado puro, nota-se uma redução na porcentagem de germinação das sementes, comparado ao filtrado diluído a 33%, com diferenças significativas entre as sementes inoculadas com *S. sclerotiorum*, mas não entre as sementes não inoculadas com o fungo. Dessa forma, o filtrado puro não causou efeito fitotóxico para as sementes pois a porcentagem de germinação das sementes inoculadas com o fungo (17%) foi maior que a germinação dos controles TSB+G.xant e H<sub>2</sub>O+G.xant.

Interessantemente, os filtrados puro e diluídos a 10% e 33% estimularam a germinação das sementes não inoculadas com o fungo *S. sclerotiorum*, pois diferiram do controle TSB+G.xantana ( $F = 1.770$ ;  $P < 0.001$ ), sugerindo um provável estímulo para indução de crescimento da planta.

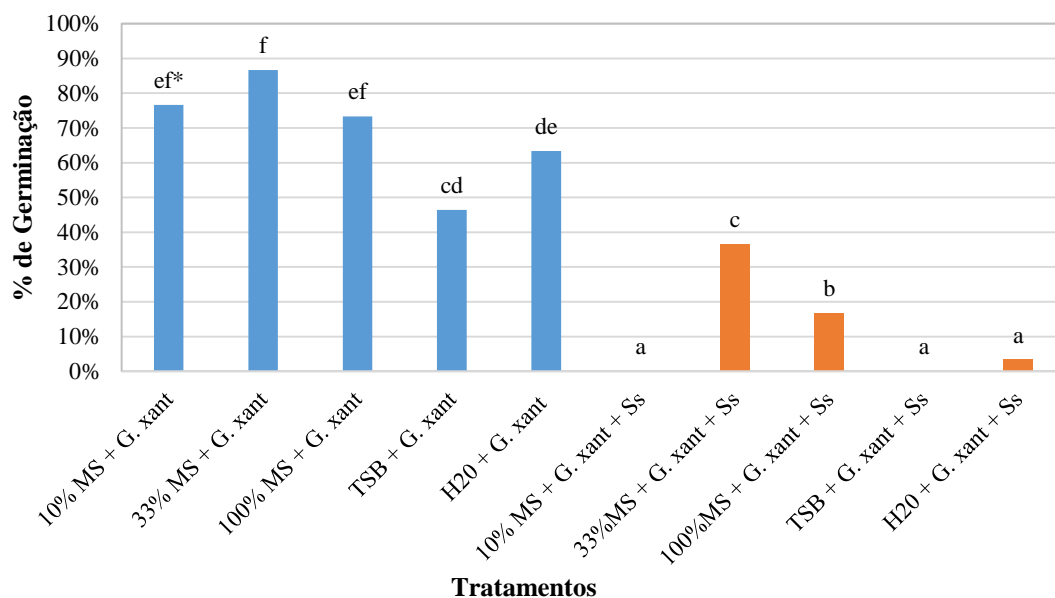


Figura 23. Porcentagem de germinação de sementes de soja “BMX Potência-RR”, revestidas com filtrados (MS) da bactéria *Xenorhabdus szentirmaii* PAM 25 e inoculadas ou não com o fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Ss). \*Tratamentos com a mesma letra, não diferem entre si, segundo teste Tukey com 1% de probabilidade. CV = 7.98%.

Molla, Shamsuddin e Saud (2001) verificaram que a adição do sobrenadante livre de células produzido por *Azospirillum brasilense* Sp7, aplicado em plantas de soja, estimulou o crescimento radicular em condições de estufa, devido à produção de fito-hormônios como ácido indolacético, ácido indol lático e ácido giberélico.

No presente estudo para o filtrado puro (100%), nota-se uma redução na porcentagem de germinação das sementes, quando comparado ao filtrado diluído a 33%, com diferenças

significativas entre as sementes inoculadas com *S. sclerotiorum*, mas não entre as sementes não inoculadas (Figura 23).

As sementes de soja sem o fungo, revestidas com os filtrados da bactéria, germinaram normalmente (Figura 24), demonstrando compatibilidade dos filtrados à planta. Hazir e colaboradores (2016) observaram efeitos atóxicos das bactérias simbiotes de NEPs (*X. bovienii*, *X. nematophila*, *X. cabanillasii*, *X. szentirmaii*, *P. temperata*, *P. luminescens* (VS) e *P. luminescens* (K22)), quando seus filtrados puros (100%) foram aspergidos em plantas com 4 semanas de crescimento de berinjela (*Solanum melongena* L.), pimenta (*Capsicum annuum* L.), tabaco (*Nicotiniana tabacum* L.), tomate (*Solanum lycopersicum* L.), pêsego (*Prunus persica* L.) e nozes (*Carya illinoensis*).

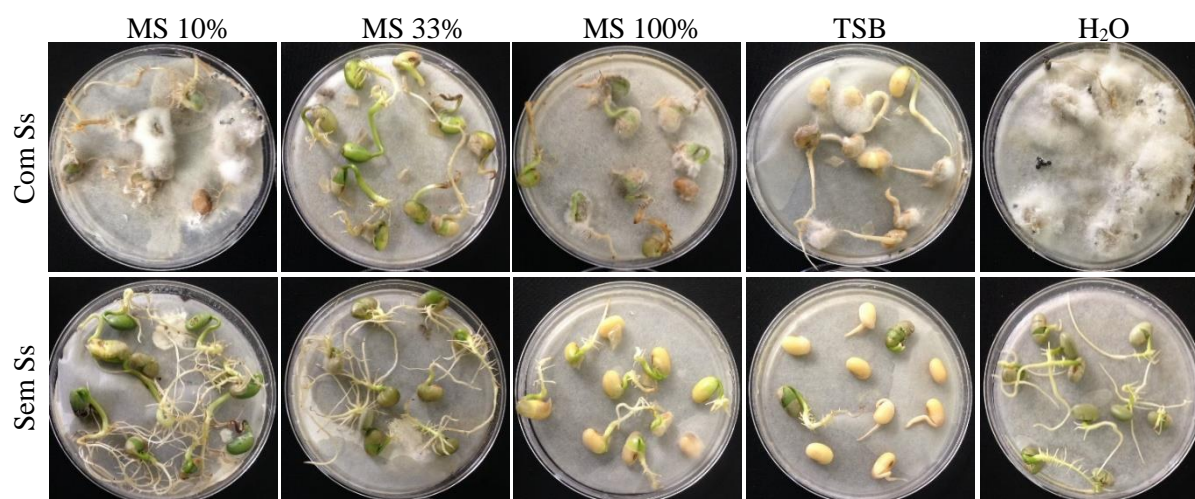


Figura 24. Comparação da germinação das sementes de soja “BMX Potência-RR” revestidas com 10%, 33% e 100% com filtrados (MS) da bactéria *Xenorhabdus szentirmaii* e inoculadas ou não com o fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Ss) e os controles (meio TSB e H<sub>2</sub>O).

Segundo Ullah e colaboradores (2014), a bactéria *Photorhabdus temperata* M1021 produz diferentes tipos de giberelinas (GA1, GA3, GA4 e GA7) que estimulam o crescimento de plantas de arroz (*Oryza sativa* L.), aumentando significativamente o comprimento da planta, teor de clorofila e biomassa. Quando inoculados em sementes de canola (*Brassica napus* L.), os hormônios aceleraram a taxa de germinação e produção de biomassa. Portanto, esses hormônios podem ser uma alternativa para uso como estimulantes no crescimento de plantas, sintetizando uma ampla gama de metabólitos bioativos. Com base no presente estudo, o revestimento de sementes com metabólitos secundários de bactérias simbiotes apresenta-se promissor para a proteção fitossanitária.

### 5.6. Efeito da bactéria *Xenorhabdus szentirmaii* PAM25 revestida em sementes de soja contendo o fungo *Sclerotinia sclerotiorum* sobre a sua germinação

Para o teste de revestimento das sementes com suspensão da bactéria *Xenorhabdus szentirmaii* PAM25, notou-se exatamente as mesmas tendências dos resultados observados com os filtrados, porém com efeitos mais acentuados na inibição do fungo para as sementes revestidas com a cultura da bactéria (Figura 25; Anexo E). O efeito mais acentuado obtido com a cultura da bactéria deveu-se provavelmente à presença das células e fragmentos celulares que também podem inibir o crescimento do fungo. Apesar dos resultados promissores, a cultura da bactéria foi menos eficiente, quando comparado ao fungicida químico (Certeza®), que permitiu 97% de germinação das sementes inoculadas com o fungo (Figuras 25). Segundo Sumida e colaboradores (2015), o composto químico Fluazinam (Ingrediente ativo do fungicida CERTEZA®), inibe a germinação carpogênica e miceliogênica *in vitro* do fungo, sendo mais eficiente para o controle do mofo branco na cultura de soja, em comparação com outros compostos químicos. No estudo de Cardoso e colaboradores (2015), fluazinam também foi o mais eficiente para o controle de mofo branco em soja, comparado a outros compostos químicos avaliados (tiofanato-metilico e procimidona).

A cultura da bactéria diluída a 33% permitiu a germinação de 80% das sementes de soja inoculadas com *S. sclerotiorum*, sem diferir da cultura diluída a 33% aplicada em sementes não inoculadas com o fungo (76%), e dos controles TSB+G.xantana (70%) e H<sub>2</sub>O+G.xantana (73%), sem a presença do fungo (Figura 25A). Hu e colabores (2011) verificaram  $\geq 85\%$  de germinação de sementes e redução significativa da incidência de *S. sclerotiorum* (11%), quando revestiram sementes de colza (*Brassica napus*) com *Bacillus subtilis* Tu-100. Shiomi, Ferreira e Melo (2017) constataram redução na severidade do fungo *S. sclerotiorum* em sementes revestidas com a bactéria *Photorhabdus luminescens luminescens* BS-2, mas a taxa de germinação da semente foi de apenas 52% no substrato inoculado com o fitopatógeno.

Da mesma forma, como observado para o teste com filtrados (Figura 23), a cultura pura da bactéria causou redução na germinação das sementes, comparada à cultura diluída a 33%, entretanto sem diferenças significativas para a germinação das sementes inoculadas ou não com *S. sclerotiorum* ( $F = 41.423$ ) (Figura 25A).

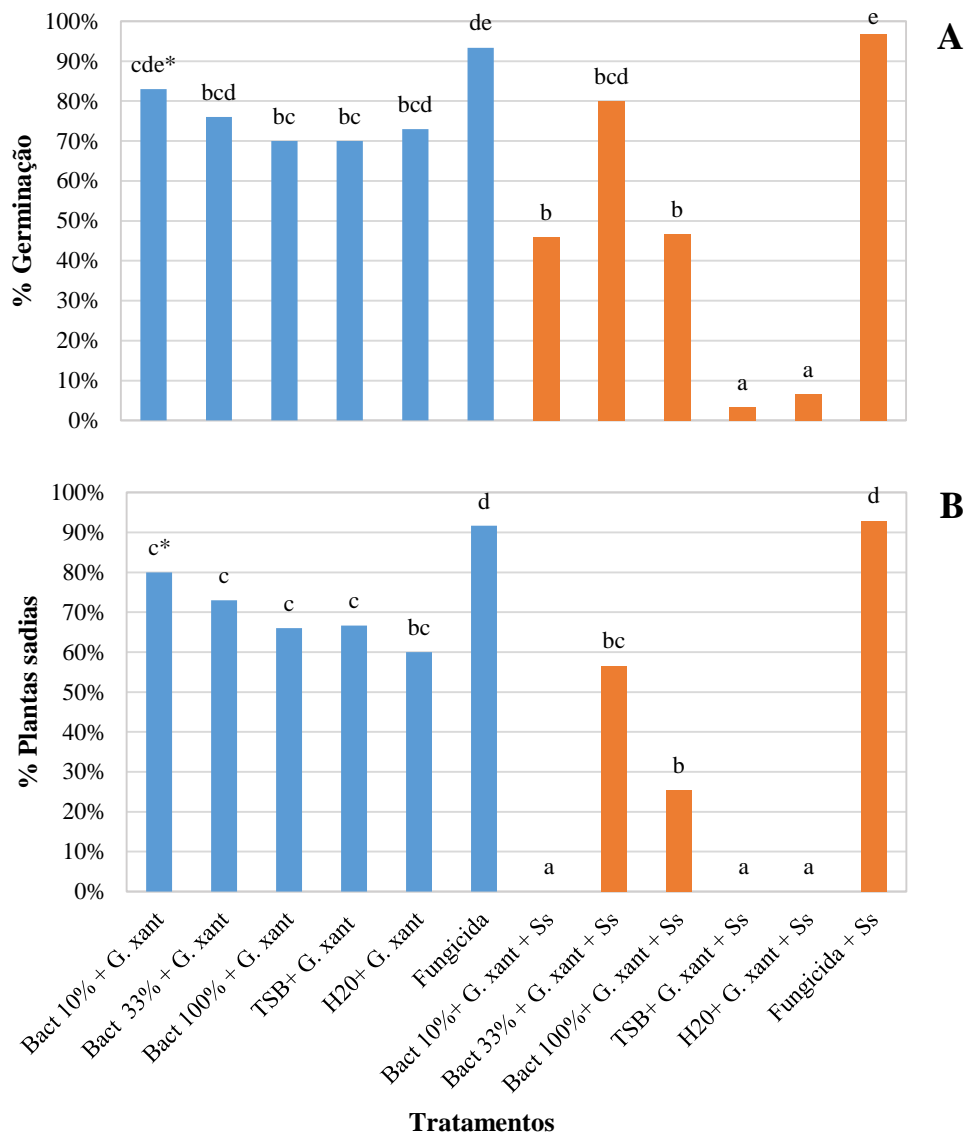


Figura 25. Porcentagem de germinação de sementes de soja ‘BMX Potência-RR’ sem inoculação de *Sclerotinia sclerotiorum* e com inoculação do fungo (aos 7 dias) (A) e plantas saudáveis desenvolvidas (aos 14 dias) (B). \*Tratamentos com a mesma letra, não diferem estatisticamente entre si, segundo teste Tukey com 1% de probabilidade.  $CV_{\text{Germinação}} = 23.92\%$ ,  $CV_{\text{Plantas sadias}} = 15.78\%$ .

G. xant: gom xantana; Ss: *Sclerotinia sclerotiorum*

A cultura da bactéria diluída a 33% em sementes de soja inoculadas com o fungo contribuiu não somente para a germinação das sementes, mas também para o desenvolvimento das plantas originadas a partir das sementes que germinaram, com 55% de plantas saudáveis após 14 dias, diferenciando significativamente da cultura da bactéria diluída a 10% e 100% na presença do fungo ( $F = 98.622$ ;  $P < 0.001$ ), mas não dos controles TSB+G.xantana e H2O+G.xantana na ausência do fungo (Figura 25B).

Além disso, a suspensão da bactéria diluída a 33% em sementes de soja inoculadas com o fungo proporcionou maior comprimento ( $F = 346,290$ ;  $P < 0,001$ ) e peso de biomassa

fresca das plantas ( $F = 1797,958$ ;  $P < 0,001$ ), diferindo da suspensão da bactéria diluída a 10% em sementes de soja inoculadas com o fungo, mas não do tratamento controle TSB+G.xantana (Figura 26 e 27; Anexo F).

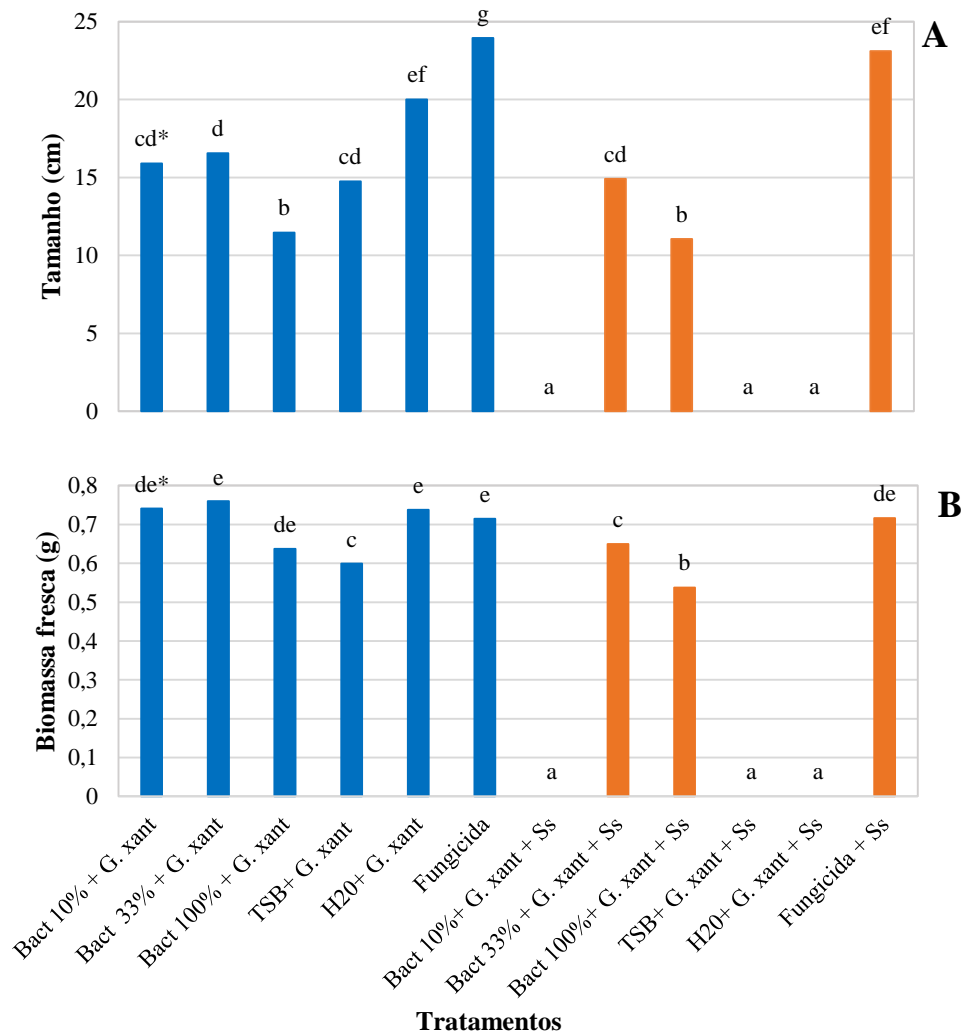


Figura 26. Tamanho (cm) das plantas de soja (A) e sua biomassa fresca (g) (B) (21 dias após tratamento com suspensão de bactéria). \*Tratamentos com a mesma letra, não diferem estatisticamente entre si, segundo teste Tukey com 1% de probabilidade.  $CV_{\text{tamanho}} = 7.36\%$  e  $CV_{\text{biomassa fresca}} = 13.26\%$ .

As culturas das bactérias inoculadas nas sementes sem o fungo não diferenciaram dos tratamentos controle TSB+G.xantana e H2O+G.xantana para os parâmetros porcentagem de germinação da semente e plantas sadias desenvolvidas (Figura 25 A e B). Isso sugere que as culturas da bactéria não contribuíram para a germinação das sementes e indução de crescimento da planta.

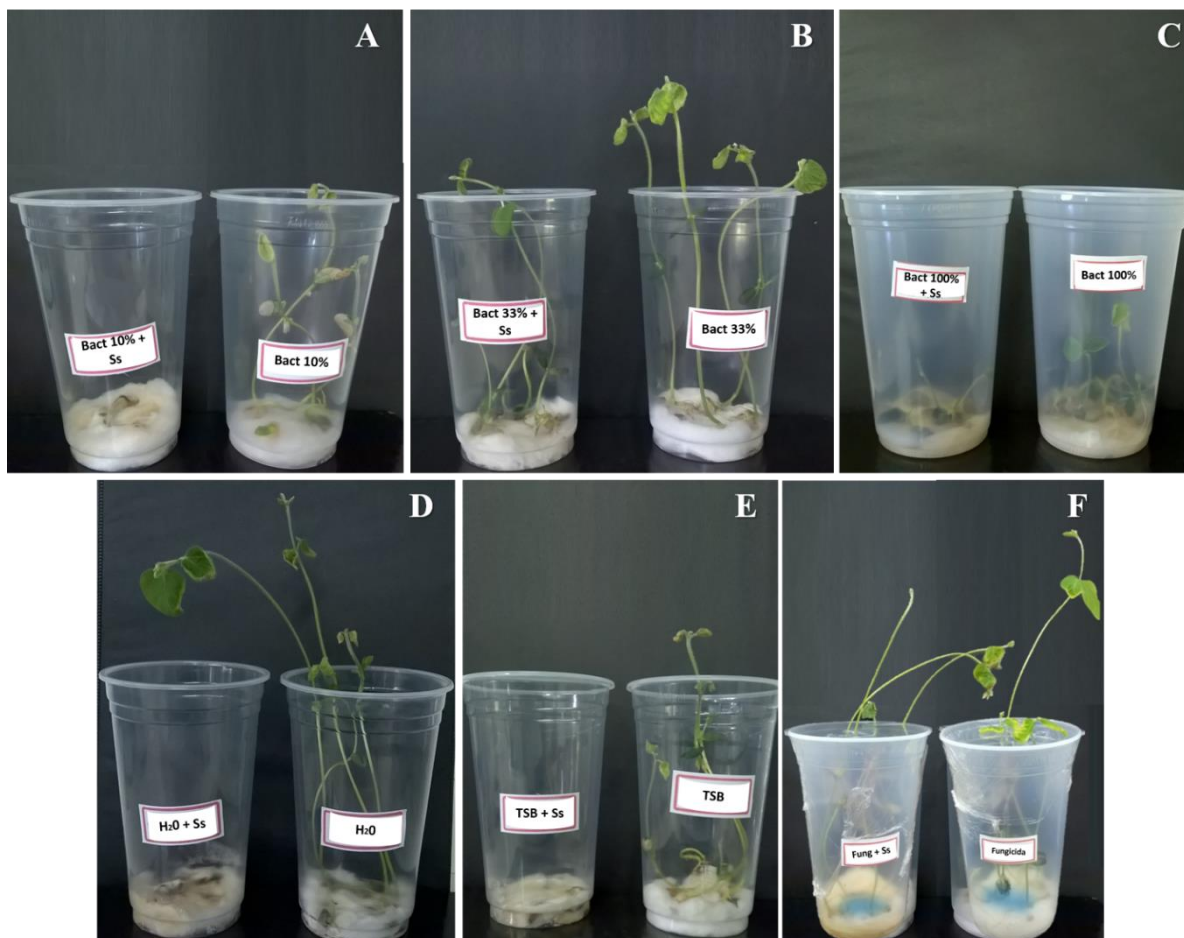


Figura 27. Comparação de crescimento das plântulas de sojos diferentes tratamentos, após 21 dias de desenvolvimento. Inoculadas com *Sclerotinia sclerotiorum* (Esquerda) e sem o fungo (Direita). A) Sementes tratadas com bactéria diluída a 10%; B) tratamento com bactéria diluída a 33%; C) tratamento com bactéria pura; D) tratamento controle H<sub>2</sub>O; E) tratamento controle TSB e F) tratamento com fungicida Certeza®.

### 5.7. Capacidade endofítica e sistêmica de *Xenorhabdus szentirmaii* PAM 25 e seus metabólitos secundários em plantas de soja

Macerados de raiz, caule e folhas das plantas de soja que foram regados com culturas de bactéria *X. szentirmaii* PAM 25 e depois plaqueadas em meio NBTA não apresentaram crescimento da bactéria, sugerindo que a bactéria não se estabeleceu endofiticamente na planta. Da mesma forma, fragmentos obtidos dessas mesmas partes da planta de soja regados com o filtrado da cultura da mesma bactéria e que foram plaqueados em meio BDA juntamente com inoculação de *S. sclerotiorum* não inibiram o crescimento micelial do fungo e o micélio desenvolvido não produziu escleródios (Figura 28), indicando que os metabólitos não circularam internamente na planta.

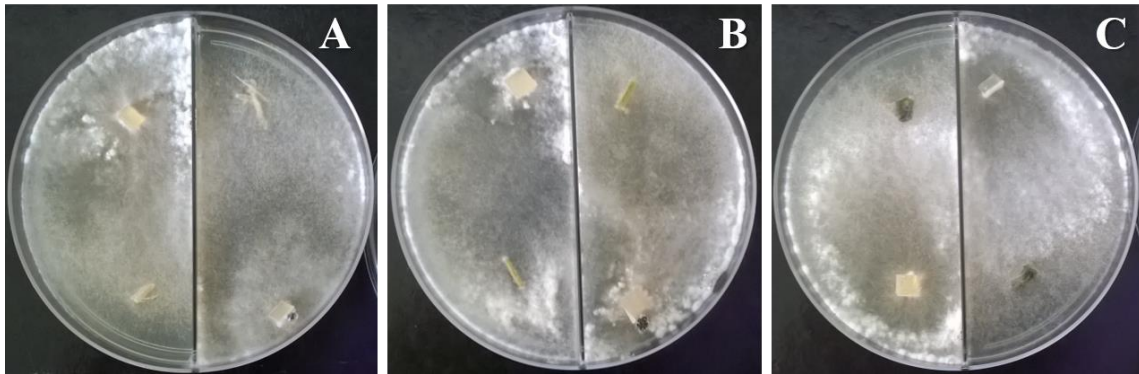


Figura 28. Crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* em meio de cultura BDA, com partes de planta de soja regada com filtrado da bactéria *Xenorhabdus szentirmaii* e seus exsudados. (a) raiz, (b) caule e (c) folha.

Este estudo é o primeiro a avaliar a capacidade endofítica e sistêmica da cultura da bactéria *X. szentirmaii* e de seus filtrados em plantas de soja e não exclui do contrario ocorrer, em outras espécies de bactérias ou em outras plantas.

Embora a bactéria e seus metabólitos secundários não possuam capacidade endofítica ou sistêmica na planta de soja, poderiam ser aplicados no solo visando reduzir a concentração de inóculos do fungo *S. sclerotiorum* como micélio e escleródios. Segundo Mahar e colaboradores (2008), as bactérias simbiotes de NEPs e seus metabólitos secundários permanecem ativos no solo por até 5 meses.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os filtrados das bactérias *X. szentirmaii* PAM 25, *Xenorhabdus szentirmaii* PAM11 e de *X. braziliense* Pnt2C, proporcionam altas porcentagens de inibição do crescimento micelial do fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, quando avaliados na diluição de 10% no meio de cultura BDA, destacando-se a bactéria *X. szentirmaii* PAM 25;

*S. sclerotiorum* não é suscetível aos filtrados produzidos pelas bactérias *Xenorhabdus* sp. CER144, *Xenorhabdus* sp. CER21 e *Pothorahbdus luminescens* IBCB10;

Os filtrados da bactéria *X. szentirmaii* PAM 25 proporcionam inibição total do crescimento micelial e da germinação miceliogênica do fungo *S. sclerotiorum*, quando obtidos da cultura da bactéria incubada por 6 dias e seu filtrado diluído a 33%;

Os filtrados da bactéria *X. szentirmaii* PAM 25 obtidos com 3 e 9 dias de cultivo e diluído a 33%, bem como os filtrados da bactéria com 6 dias de cultivo e diluído a 10% não controlam totalmente o crescimento micelial do fungo, mas inibiram a produção de escleródios;

Os compostos orgânicos voláteis apresentam inibição total do crescimento micelial e da germinação miceliogênica de *S. sclerotiorum*, quando oriundos de culturas da bactéria *X. szentirmaii* PAM 25 sem diluição, independentemente dos tempos de cultivo das bactérias;

Os compostos orgânicos voláteis, gerados da cultura da bactéria cultivada por 6 dias e diluída a 33%, quando expostos em escleródios, não controlam totalmente o crescimento micelial de *S. sclerotiorum*, mas inibiram a produção de escleródios;

Os compostos orgânicos voláteis, gerados da cultura de *X. szentirmaii* PAM 25, são inócuos à germinação das sementes não contaminadas, mas não protegem as sementes contra a ação do fungo;

Os filtrados da bactéria *X. szentirmaii* PAM 25 cultivada por 6 dias e diluídos a 33%, quando aplicados em sementes de soja, são eficientes na proteção contra a ação do fungo *S. sclerotiorum* e, ainda, estimulam a germinação das sementes não contaminadas com patógeno;

A suspensão da bactéria *X. szentirmaii* PAM25 cultivada por 6 dias, diluída a 33%, quando aplicada em sementes de soja, é altamente eficiente na proteção contra a ação do fungo;

A bactéria *X. szentirmaii* PAM 25 não penetra endofiticamente em plantas de soja, bem como os filtrados da cultura da bactéria não são absorvidos e não circulam sistemicamente na planta.



## 7. CONCLUSÕES

A eficácia dos filtrados entre espécies de *Xenorhabdus* e *Photorhabdus* variou no controle de crescimento do fungo, sendo os filtrados de *X. szentirmaii* PAM25 os que causaram maior inibição. A bactéria *X. szentirmaii* PAM25., seus filtrados e seus compostos orgânicos voláteis, não causaram nenhum efeito fitotóxico nas sementes e plantas de soja, pelo contrario estimularam a germinação e ofereceram proteção contra o patogeno. Também foi verificado que a bactéria *X. szentirmaii* PAM 25 e seus filtrados não possuem capacidade endofítica nem sistêmica em plantas de soja.

Este estudo demonstra que a bactéria *X. szentirmaii* PAM 25 produz metabolitos antifúngicos com forte atividade sobre o fungo *S. sclerotiorum*, quando avaliados *in vitro* e *in vivo*, com grande potencial para o controle integrado de mofo branco para reduzir a aplicação química na cultura de soja.

## 8. BIBLIOGRAFIA

ADAMS, B. J.; NGUYEN, K. B. **Taxonomy and sistematics**. Gaugler R, editor. **Entomopathogenic nematology**. New York: CABI. 2002, p. 1-34.

ADAMS, P. B.; AYERS, W.A. Ecology of *Sclerotinia* species. **Phytopathology**, St Paul, v.69 n.8 p.689 -899 Aug., 1979.

AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. San Diego: Academic,2005. 992 p.

AGROFIT- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Coordenação-Geral de Agrotóxicos e Afins/DFIA/DAS. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/agrofit>. Acesso em: 21 de novembro de 2018.

AKHURST, A. J. A taxonomic study of *Xenorhabdus*, a genus of bacteria symbiotically associated with insectpathogenic nematodes. **International journal of systematic bacteriology**, v. 33. p. 8-45, 1983.

AKHURST, R. J. Antibiotic activity of *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with insect pathogenic nematodes of the families Heterorhabditidae and Steinernematidae. **Journal of General Microbiology**, v. 128. p. 3061-3066, 1982.

AKHURST, R. J. et al. Taxonomy of Australian clinical isolates of the genus *Photorhabdus* and proposal of *Photorhabdus asymbiotica* subsp. *asymbiotica* subsp. nov. and *P. asymbiotica* subsp. *australis* subsp. nov. **Int. International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 54, p. 1301-1310, 2004.

AKHURST, R. J. Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabditis* spp., bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes *Neoaplectana* and *Heterorhabditis*. **Journal of General Microbiology**. v. 121, p. 303–309, 1980.

AKHURST, R. J. *Xenorhabdus nematophilus* subsp. *beddingii* (Enterobacteriaceae): a new subspecies of bacteria mutualistically associated with entomopathogenic nematodes. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 36, p. 454-457, 1986.

AKHURST, R. J.; BOEMARE, N. E. Biology and Taxonomy of *Xenorhabdus*. In: Gaugler, R.; Kaya, H. K. eds. **Entomopathogenic nematodes in Biological Control**. Boca Raton: CRC Press. 1990, p. 75-90.

ALMEIDA, A. M. R. et al. Doenças da soja. In: KIMATI, H. et al. **Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. v. 2, cap. 61, p. 642-664.

An, R.; Grewal, P. S. *Photorhabdus luminescens* subsp. *kleinii* subsp. nov. (Enterobacteriales: Enterobacteriaceae). **Current Microbiology**, v. 62, p. 539–543, 2011.

ANDRADE, C. M. et al. Host-induced gene silencing in the necrotrophic fungal pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Pathology**, v. 65, p. 626–632, 2016. doi:10.1111/ppa.12447

BAILLY, A., WEISSKOPF, L. The modulating effect of bacterial volatiles on plant growth: current knowledge and future challenges. **Plant Signaling & Behavior**, v. 7, p. 79–85, 2012. doi: 10.4161/psb.7.1.18418

BAKER, K. F.; COOK, R. J. **Biological Control of Plant Pathogens**. San Francisco: W. H. Freeman, 1974. 433p.

BETTIOL, W. et al. **Produtos comerciais à base de agentes de biocontrole de doenças de plantas**. Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente, 2012. 155 p. (Documentos 88).

BIRD, A. F.; AKHURST, R. J. The nature of the intestinal vesicle in nematodes of the family Steinernematidae. **International Journal of Parasitology**, v. 13, n. 6, p. 599-606, 1983.

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

BOEMARE, N. E. et al. Lysogeny and bacteriocinogeny in *Xenorhabdus nematophilus* and other *Xenorhabdus* spp. **Applied and environmental microbiology**, v. 58, p. 3032-3037, 1992.

BOEMARE, N. E.; AKHURST, R. J. Biochemical and physiological characterization of colony form variants in *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae). **Journal of General Microbiology**. v. 134, p. 751-761, 1988.

BOEMARE, N. E.; AKHURST, R. J.; MOURANT, R. G. DNA relatedness between *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae), symbiotic bacteria of entomopathogenic nematodes, and a proposal to transfer *Xenorhabdus luminescens* to a new genus, *Photorhabdus* gen. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 43, p. 249–255, 1993.

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

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

BÖSZÖRMÉNYI, E. et al. Isolation and activity of *Xenorhabdus* antimicrobial compounds against the plant pathogens *Erwinia amylovora* and *Phytophthora nicotianae*. **J Appl Microbiol**, v. 107, n. 3, p. 746–759, 2009.

BOWEN, D. et al. Secreted proteases from *Photorhabdus luminescens*: separation of the extracellular proteases from the insecticidal Tc toxin complexes. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 30, p. 69–74, 2000.

BRACHMANN, A. O. et al. Xenofuranones A and B: phenylpyruvate dimers from *Xenorhabdus szentirmaii*. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 1830-1832, 2006.

CAMPBELL, R. **Biological control of microbial plant pathogens**. Sidney: C.U.P, 1989. 218p.

CARDOSO, S. S. et al. Eficiência de fungicidas no controle do mofo branco na cultura da soja. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 14, n. 1, p. 49-52, 2015.

CHAURASIA, B. et al. Diffusible and volatile compounds produced by an antagonistic *Bacillus subtilis* strain cause structural deformations in pathogenic fungi in vitro. **Microbiological Research**, v. 160, n. 1, p. 75-81, 2005.

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.

CHEN, G.; DUNPHY, G. B.; WEBSTER, J. M. Antifungal Activity of Two *Xenorhabdus* Species and *Photorhabdus luminescens*, Bacteria Associated with the Nematodes *Steinernema* Species and *Heterorhabditis megidis*. **Biological Control**, v. 4, p. 157–162, 1994. doi:10.1006/bcon.1994.1025.

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

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.

COLEY-SMITH, J.R; COOKE, R.C. Survival and germination of fungal sclerotia. **Annual Review of plant Pathology**, v. 9, p. 65-92, 1971.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. 2016. Acompanhamento da safra brasileira. Disponível em: <<http://www.conaba.gov.br>>. Acesso em: 07 de maio de 2016.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. 2018. Indicadores da Agropecuária. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/download/indicadores/pubindicadores.pdf>. Acesso em: 07 de Dezembro de 2018.

COOK, R. J.; BAKER, K. F. **The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens**. American Phytopathological Society, St. Paul, MN. 1983, 539p.

COSTA, J.R.; COSTA, J.L. da S. Efeito da aplicação de fungicidas no solo sobre a germinação carpogênica e miceliogênica de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*. **Pesquisa Agropecuária Tropical**. v. 34, p. 133-138, 2004.

CRAWFORD, J. M.; KONTNIK, R.; CLARDY, J. Regulating alternative lifestyles in entomopathogenic bacteria. **Current Biology**, v. 20, p. 69–74, 2010.

CRAWFORD, J. M.; CLARDY, J. Bacterial symbionts and natural products. **Chemical Communication**, v. 47, n. 27, p. 7559-7566. 2011. doi:10.1039/c1cc11574j

DILDEY, O. D. F. et al. Inibição do crescimento *in vitro* de *Sclerotinia sclerotiorum*, causador de mofo branco, por isolados de *Trichoderma* spp. **Revista Brasileira de Biociências**. Porto Alegre, v. 12, n. 3, p. 132-136, 2014.

DONALDSON, P. A. Soybean plants expressing an active oligomeric oxalate oxidase from the wheat gf-2.8 (germin) gene are resistant to the oxalate-secreting pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. v. 59, p. 297–307, 2001.

ELEFThERIANOS, I. An antibiotic produced by an insect-pathogenic bacterium suppresses host defenses through phenoloxidase inhibition. **Proceedings of the National Academy of Science**, USA, v. 104, p. 2419-2424, 2007.

ENSIGN, J. C. 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.

FERNANDO, W. G. D. et al. Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 37, p. 955-964, 2005.

FERRAZ, L.C.L. et al. Viabilidade de *Sclerotinia sclerotiorum* após a solarização do solo na presença de cobertura morta. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 1, p. 17-26, 2003.

FERREIRA, T. et al. Description of *Xenorhabdus khoisanae* sp. nov., the symbiont of the entomopathogenic nematode *Steinernema khoisanae*. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 63, p. 3220-3224, 2013.

FERREIRA, T. et al. *Photorhabdus heterorhabditis* sp. nov., a symbiont of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis zealandica*. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 64, p. 1540-1545, 2014.

FIALHO, M. B. et al. Potential of antimicrobial volatile organic compounds to control *Sclerotinia sclerotiorum* in bean seeds. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 46, n. 2, p. 137-142, 2011.

FIDDAMAN, P.J.; ROSSALL, S. Effect of substrate on the production of antifungal volatiles from *Bacillus subtilis*. **Journal of Applied Bacteriology**. v. 76, n. 4, p. 395-405, 1994.

FISCHER-LE SAUX, M. et al. Polyphasic classification of the genus *Photorhabdus* and proposal of new taxa: *P. luminescens* subsp. *luminescens* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *akhurstii* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *laumondii* subsp. nov., *P. temperata* sp. nov., *P. temperata* subsp. *temperata* subsp. nov. and *P. asymbiotica* sp. nov. **International Journal Systematic Bacteriology**, v. 49, p. 1645–1656, 1999.

FODOR, A. Comparative analysis of antibacterial activities of *Xenorhabdus* species on related and nonrelated bacteria in vivo. **Journal of Microbiology and Antimicrobials**. v. 2, p. 36–46, 2010.

FODOR, A. et al. New perspectives of *Xenorhabdus* antibiotics research. In: EHLERS, R. U. Eds. **Insect Pathogens Insect Parasitic Nematodes**. IOBC/WPRS Bulletin. p. 157-164, 2008.

FORST, S.; NEALSON, K. Molecular Biology of the Symbiotic-Pathogenic Bacteria *Xenorhabdus* spp. and *Photorhabdus* spp. **American Society for Microbiology**, v. 60, n. 1, p. 21–43, 1996.

FURGANI, G. *Xenorhabdus* antibiotics: a comparative analysis and potential utility for controlling mastitis caused by bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, p. 745-758, 2008.

GAUGLER, R.; CAMPBELL, J. F.; GUPTA, P. Characterization and basis of enhanced host finding in a genetically improved strain of *Steinernema carpocapsae*. **Journal of invertebrate Pathology**, v. 57, p. 234-241, 1991.

GELDER, J. W.; DROS, J. M. From rainforest to chicken breast: Effects of soybean cultivation for animal feed on people and nature in the Amazon region – a chain of custody study. Research report for the Dutch Soy Coalition commissioned by Friends of the Earth Netherlands and Cordaid. Disponível em: [www.milieudefensie.nl/landbouw/publicaties/rapporten/From%20Rainforest%20to%20Chickenbreast.pdf](http://www.milieudefensie.nl/landbouw/publicaties/rapporten/From%20Rainforest%20to%20Chickenbreast.pdf). Acesso em: 17 de agosto de 2017.

GIORGIO, A. Biocide effects of volatile organic compounds produced by potential biocontrol rhizobacteria on *Sclerotinia sclerotiorum*. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1056, 2015. doi: 10.3389/fmicb.2015.01056

GIVAUDAN, A.; LANOIS, A. *flhDC*, the flagellar master operon of *Xenorhabdus nematophilus*: requirement for motility, lipolysis, extracellular hemolysis, and full virulence in insects. **Journal of Bacteriology**, v. 182, p. 107–115, 2000.

GLAESER, S. P. *Photorhabdus luminescens* subsp. *namnaonensis* subsp. nov., isolated from *Heterorhabditis baujardi* nematodes. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 67, p. 1046-1051, 2017.

GOODRICH-BLAIR, H.; CLARKE, D. J. Mutualism and pathogenesis in *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*: two roads to the same destination. **Molecular Microbiology**, 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.

GÖTZ, F.; AHRNÉ, S.; LINDBERG, M. Plasmid transfer and genetic recombination by protoplast fusion in staphylococci. **Journal of Bacteriology**, v. 145, p. 74-81, 1981.

GRACIA-GARZA, J. A. et al. Influence of crop rotation and tillage on production of apothecia by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 24, p. 137-143, 2002.

GUO, S. et al. Regulation of antimicrobial activity and xenocoumamins biosynthesis by pH in *Xenorhabdus nematophila*. **Microbial Cell Factories**, v. 16, p. 203, 2017. doi:10.1186/s12934-017-0813-7

HAAS, D.; KEEL, C. Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. **Annual Review of Phytopathology**, v. 41, p. 117–153, 2003. doi:10.1146/annurev.phyto.41.052002.095656

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. 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.

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. *thracensis* subsp. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 27, p. 36-42, 2004.

HEGEDUS, D. D.; RIMMER, S. R. *Sclerotinia sclerotiorum*: When “to be or not to be” a pathogen? **FEMS Microbiology Letters**, New Jersey, v. 251, n. 2, p. 177-184, 2005.

HINCHLIFFE, S. J. et al. Insecticidal Toxins from the *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* Bacteria. **The Open Toxinology Journal**, v. 3, p. 101-118, 2010.

HU, X. et al. Formulations of the endophytic bacterium *Bacillus subtilis* Tu-100 suppress *Sclerotinia sclerotiorum* on oilseed rape and improve plant vigor in field trials conducted at separate locations. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 57, n. 7, p. 539-46, 2011. doi: 10.1139/W11-041

HUNG, R. et al. Common gas phase molecules from fungi affect seed germination and plant health in *Arabidopsis thaliana*. **AMB Express**. v. 4, p. 53, 2014.

HUNG, K. et al. Synthesis and assignment of stereochemistry of the antibacterial cyclic peptide xenematide. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 9, p. 236-242, 2011.

IBGE - Levantamento sistemático da produção agrícola. 2017 Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br>. Acessado em 15 de janeiro de 2017.

INSTITUTO DE ESTUDO DO AGRONEGÓCIO (IEAg). 2016. O futuro da Soja no Brasil. Em: Associação Brasileira do Agronegócio (abag). Disponível em: <http://www.abag.com.br/media/images/0-futuro-da-soja-nacional---ieag---abag.pdf>. Acesso em: 10 fevereiro de 2017.

ISAACSON, P. J. Antimicrobial activity of *Xenorhabdus* sp. (Enterobacteriaceae), symbiont of the entomopathogenic nematode, *Steinernema riobrave* (Rhabditida:

**Steinernematidae**). 2000. Msc. thesis, Simon Fraser University, British Columbia, Canada. 2000.

ISAACSON, P. J.; WEBSTER, J. M. Antimicrobial activity of *Xenorhabdus* sp. RIO (Enterobacteriaceae), symbiont of the entomopathogenic nematode, *Steinernema riobrave* (Rhabditida: Steinernematidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 79, n. 3, p. 146-153, 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.

JACK, R. W.; TAGG, J. R.; RAY, B. Bacteriocins of gram positive bacteria. **Microbiological Reviews**, v. 39, n. 2, p. 171-200, 1995.

JI, D., YI, Y., KIM, Y. 16S rDNA sequence and biochemical characters of a Korean isolate of *Xenorhabdus nematophila*. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 7, p. 105–111, 2004.

JULIATTI, F. C.; JULIATTI, F. C. A. **Podridão branca da haste da soja: Manejo e uso de fungicidas em busca da sustentabilidade nos sistemas de produção**. Uberlândia-MG, Gráfica Composer Editora, 2010. 35 p.

KAI, M. Bacterial volatiles and their action potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Seoul, v. 81, p. 1001-1012, 2009.

KÄMPFER, P. et al. *Xenorhabdus thuongxuanensis* sp. nov. and *Xenorhabdus eapokensis* sp. nov., isolated from *Steinernema* species. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 67, p. 1107-1114, 2017.

KANG, J. G. et al. Isolation and Antifungal Activities of 2-Hydroxymethyl-chroman-4-one. Produced by *Burkholderia* sp. MSSP. **The Journal of Antibiotics**, v. 57, p. 726–731, 2004.

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

KAYA, H. K.; STIMMANN, M. W. **Parasitic nematodes in biological control of insect pest**. University of California, Berkeley. Vegetable Research and Information Center. 1987, 3p.

KOITABASHI M. New biocontrol method for parsley powdery mildew by the antifungal volatiles-producing fungus Kyu-W63. **Journal of General Plant Pathology**, v. 71, 280-284, 2005.

KOPPENHÖFER, A. M. Nematodes. *In*: Lacey, L. A.; Kaya, H. K. (eds.) **Field manual of techniques in invertebrate pathology**: Application and evaluation of pathogens for control of insects and other invertebrate pests. Dordrecht: Springer, v. 2, p. 249–264, 2007.

KUWATA, R. et al. *Xenorhabdus ishibashii* sp. nov., isolated from the entomopathogenic nematode *Steinernema aciari*. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 63, p. 1690-1695, 2013.

LADELL, P. **Isolation and characterization of antibiotics produced by the nematode symbiont *xenorhabdus szentirmaii***. 2011. 70 p. Thesis MSc. in Biology. University of wisconsin-la crosse. USA. 2011.

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

LEE, C. H. et al. MR304A, a new melanin synthesis inhibitor produced by *Trichoderma harzianum*. **The Journal of Antibiotics**, v. 48, p. 1168–1170, 1995.

LENGYEL, K. et al. Description of four novel species of *Xenorhabdus*, family *Enterobacteriaceae*: *Xenorhabdus budapestensis* sp. nov., *Xenorhabdus ehlersii* sp. nov., *Xenorhabdus innexi* sp. nov., and *Xenorhabdus szentirmaii* sp. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 28, p. 115-122, 2005.

LI, J. J. et al. Antimicrobial metabolites from a bacterial symbiont. **Journal of Natural Products**, v. 58, p. 1081-1085, 1995.

LI, J. J.; CHEN, G.; WEBSTER, J. M. Nematophin, a novel antimicrobial substance produced by *Xenorhabdus nematophilus* (Enterobacteriaceae). **Canadian journal of microbiology**. v. 43, n. 8, p. 770-773, 1997.

LI, J.; HU, K.; WEBSTER, J. M. Antibiotics from *Xenorhabdus* spp. and *Photorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae) (review). **Chemistry of Heterocyclic Compounds**, v. 34, p. 1331-1339, 1998. doi:10.1007/BF02256814

LIU, W. et al. Antagonistic Activities of Volatiles from Four Strains of *Bacillus* spp. and *Paenibacillus* spp. Against Soil-Borne Plant Pathogens. **Agricultural Sciences in China**. v. 7, n. 9, p. 1104-1114, 2008.

LOBO JÚNIOR, M.; ABREU, M. S. Inibição do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* por metabólitos voláteis produzidos por alguns antagonistas em diferentes temperaturas e pH's. **Ciência Agrotécnica**, v. 24, p. 521-526, 2000.

MACHADO, A. Q.; CASSETARI NETO, D. Epidemia branca. **Cultivar Grandes Culturas**. v. 130, p. 20-23, 2010.

MACKIE A. E, WHEATLEY R. E. Effects and incidence of volatile organic compound interactions between soil bacterial and fungal isolates. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 31, n.3, p. 375-385, 1999.

MAHAR, A. N. et al. Control of Insects with Entomopathogenic Bacterium *Xenorhabdus nematophila* and its Toxic Secretions. **International journal of agriculture & biology**, v. 10, p. 52-56, 2008.

MCLNERNEY, B. V. Biologically Active Metabolites from *Xenorhabdus* Spp., Part 2. Benzopyran1-one Derivatives with Gastroprotective Activity. **Journal of Natural Products**, v. 54, n. 3, p. 785–795, 1991. DOI:10.1021/np50075a006.

MELO, I. S. Potencialidades na utilização de *Trichoderma* spp. no controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W. (ed) **Controle biológico de doenças de plantas**. Brasília: EMBRAPA/ CNPMA. p.135-156, 1991. (Documentos, 15)

MERCIER, J.; MANKER, D. C. Biocontrol of soil-borne diseases and plant growth enhancement in greenhouse soilless mix by the volatile-producing fungus *Muscodor albus*. **Crop Protection**, v. 24, p. 355-362, 2005.

MERCIER, J.; JIMÉNEZ J. I. Control of fungal decay of apples and peaches by the biofumigant fungus *Muscodor albus*. **Postharvest Biology and Technology**, v. 31, p. 1-8, 2004.

MEYER, M. C. et al. **Eficiência de fungicidas para controle de mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) em soja, na safra 2013/2014** – resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. Londrina: Embrapa Soja, 2015. 4p. (Embrapa Soja. Circular Técnica, 109).

MEYER, M. C. et al. **Eficiência de fungicidas para controle de mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) em soja, na safra 2015/2016:** resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. Londrina: Embrapa Soja, 2016. 5p. (Embrapa Soja. Circular Técnica, 122).

MEYER, M. C. et al. **Ensaio cooperativos de controle químico de mofo branco na cultura da soja:** safras 2009 a 2012. Londrina: Embrapa Soja, 2014. 100p. (Embrapa Soja. Documentos, 345).

MEYER, M. C.; CAMPOS, H. D. Guerra ao mofo. **Cultivar Grandes Culturas**, n. 120, ano 11, p. 16-18, 2009.

MEYER, M. C.; GODOY, C. V. Combate ao mofo branco na lavoura de soja. **A Granja**. n. 809, p. 49-51, 2016.

MOLLA, A. H.; SHAMSUDDIN, Z. H.; SAUD, H. M. Mechanism of root growth and promotion of nodulation in vegetable soybean by *Azospirillum brasilense*. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 32, p. 2177–2187, 2001.

MOORE-LANDECKER, E.; STOTZKY, G. Inhibition of fungal growth and sporulation by volatile metabolites from bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 18, n. 7, p. 957-962, 1972.

MORANDI, M. A. B.; BETTIOL, W.; GHINI, R. Situação do controle biológico de doenças de plantas no Brasil. In: VENZON, M.; PAULA JUNIOR, T. J.; PALLINI, A. (Eds.). **Controle alternativo de pragas e doenças**. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa: 2005, p.247-267.

MUELLER, D.S.; DERKSEN, R.C; OZKAN, E. Efficacy of fungicides on *Sclerotinia sclerotiorum* and their potencial for control of *Sclerotinia* stem rot on soybean. **Plant Disease**. Saint Paul, v.86, n.1, p.26-31, jan. 2002.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 311–335, 2012. doi: 10.1021/np200906s.

NISHIMURA, Y. et al. *Xenorhabdus japonicus* sp. nov. associated with the nematode *Steinernema kushidai*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 10, p. 207-210, 1994.

NOLLMANN, F. I. et al. Synthesis of szentiamide, a depsipeptide from entomopathogenic *Xenorhabdus szentirmaii* with activity against *Plasmodium falciparum*. **Beilstein journal of organic chemistry**, v. 8, p. 528-533, 2012. doi: 10.3762/bjoc.8.60.

OHLENDORF, B.; SIMON, S.; WIESE, J.; IMHOFF, J. F. Szentiamide, an N-formylated cyclic depsipeptide from *Xenorhabdus szentirmaii* DSM 16338T. **Natural Product Communications**, v. 6, p. 1247–1250, 2011.

OROZCO, R. A. **Characterization of the entomopathogenic bacterium *photorhabdus luminescens sonorensis*, and bioactivity of its secondary metabolites**. 2012. 90p. Dissertação (Master of Science), Department of Entomology, University of Arizona. 2012.

OROZCO, R. A.; HILL, T.; STOCK, S. P. Characterization and phylogenetic relationships of *Photorhabdus luminescens* subsp. *sonorensis* ( $\gamma$ -Proteobacteria: Enterobacteriaceae), the bacterial symbiont of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis sonorensis* (Nematoda: Heterorhabditidae). **Current Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 30-39, 2013. doi: 10.1007/s00284-012-0220-6

ORTEGA-ESTRADA, M. de J. et al. Phoresis between *Serratia marcescens* and *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Steinernematidae) during Infection of *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) Larvae. **Florida Entomologist**, v. 95, n. 1, p. 120-127, 2012.

PANKEWITZ, F.; HILKER, M. Polyketides in insects: ecological role of these widespread chemicals and evolutionary aspects of their biogenesis. **Biological Review**, v. 83, n.2, p. 209-226, 2008.

PARK, Y. K. et al. Antibiotic susceptibility and resistance of *Streptococcus iniae* and *Streptococcus parauberis* isolated from olive flounder (*Paralichthys oliveceus*). **Veterinary Microbiology**, v. 136, p. 76–81, 2008.

PARK, Y. K.; ALIZA, A. R.; STANLEY, D. A secretory PLA2 associated with tobacco hornworm hemocyte membrane preparations acts in cellular immune reactions. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 60, p. 105-115, 2005.

PAUL, V. J. et al. Antibiotics in microbial ecology, isolation and structure assignment of several new antibacterial compounds from the insect symbiotic bacteria *Xenorhabdus* spp. **Journal of Chemical Ecology**, v. 7, p. 589–597, 1981.

PENGUE, W. Producción agroexportadora e (in)seguridad alimentaria: El caso de la soja en Argentina. **Revista Iberoamericana de Economía Ecológica**, v. 1, p. 46-55, 2004.

PEREIRA, J. O.; AZEVEDO, J. L.; PETRINI, O. Endophytic fungi of *Stylosanthes*: a preliminary study. **Mycologia**, v. 85, p. 362-364, 1993.

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.

POINAR JR., G. O.; THOMAS, G. M. A new bacterium, *Achromobacter Nematophilus* sp. nov. (Achromobacteriaceae Eubacteriales) associated with a nematode. **International Bulletin of Bacterial Nomenclature and Taxonomy**, v.15, p. 249-252, 1965.

POWELL, J. R.; WEBSTER, J. G. Target host finding by *Steinernerema feltia* and *Heterorhabditis bacteriophora* in the presence of a non-target insect host. **Journal of Nematology**, v. 36, p. 285-289, 2004.

PUNJA, Z. K.; ZHANG, Y. Y. Plant chitinases and their roles in resistance to fungal disease. **Journal of Nematology**, v. 25, p. 526-540, 1993.

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

PYNENBURG, G. M. et al. The interaction of annual weed and white mold management systems for dry bean production in Canada. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 91, p. 587-598, 2011.

RANA, A. et al. Identification of multi- trait PGPR isolates and evaluating their potential as inoculants for wheat. **Annals of Microbiology**, v. 61, p. 893-900, 2011. doi: 10.1007/s13213-011-0211-z

RIBEIRO, C. et al. Insect immunity—effects of factors produced by a nematobacterial complex on immunocompetent cells. **Journal of Insect Physiology**, v. 45, p. 677-685, 1999.

RICHARDSON, W. H.; SCHMIDT, T. M.; NEALSON, K. H. Identification of an anthraquinone pigment and a hydroxystilbene antibiotic from *Xenorhabdus luminescens*. **Applied and environmental Microbiology**, v. 54, p. 1602-1605, 1988.

RIDNER, E. **Soja, propiedades nutricionales y su impacto en la salud**. Buenos Aires: Grupo Q S.A.: Sociedad Argentina de Nutrición. 2006. 96p. 1a ed.

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

ROCHA, R. Selection of endophytic fungi from comfrey (*Symphytum officinale* L.) for in vitro biological control of the phytopathogen *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 73-78, 2009.

ROUSSEAU, G.; RIOUX, S.; DOSTALER, D. Effect of crop rotation and soil amendments on *Sclerotinia* stem rot on soybean in two soils. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 87, p. 605-614, 2007.

SAHARAN, G. S.; MEHTA, N. ***Sclerotinia* diseases of crop plants: Biology, ecology and disease management**. Springer. LXII. 2008, 485p.

SAN-BLAS, E.; CARRILLO, Z.; PARRA, Y. Effect of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* bacteria and their exudates on *Moniliophthora roreri*. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 45, p. 1950-1967, 2012.

SBARDELOTTO, A.; VILLAR, L. G. Escolha de cultivares de soja com base na composição química dos grãos como perspectiva para maximização dos lucros nas indústrias processadoras. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 3, p. 614-619, 2008.

SCHERLACH, K.; HERTWECK, C. Triggering cryptic natural product biosynthesis in microorganisms. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 7, p. 1753-1760, 2009.

SCHLESINGER, S. et al. Agronegócio + Agroenergia: Impactos Cumulativos e Tendências Territoriais da Expansão das Monoculturas para a Produção de Bioenergia. 2006. Disponível em: [http://boelllatinoamerica.org/download\\_pt/Agronegocio\\_e\\_biocombustiveis\\_PORT.pdf](http://boelllatinoamerica.org/download_pt/Agronegocio_e_biocombustiveis_PORT.pdf). Acesso em: 23 de agosto de 2017.

SCHLESINGER, S.; NORONHA, S. O Brasil está nu! O avanço da monocultura de soja, o grão que cresceu demais. **Fase**. 2006, 148p.



SCHÜFFLER, A. et al. Allantofuranone, a new antifungal antibiotic from *Allantophomopsis lycopodina* IBWF58B-05A. **The Journal of Antibiotics**, v. 62, p. 119- 121, 2009.

SECEX - COMPLEXO SOJA – Dados oficiais, exportações Brasil - por países destino. Disponível em: <<http://portal.siscomex.gov.br/legislação/orgaos/secretaria-de-comercio-exterior-secex>>. Acessado em: 10 de janeiro de 2018.

SHAPIRO-ILAN, D. I.; REILLY, C. C.; HOTCHKISS, M. W. Suppressive effects of metabolites from *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* spp. on phytopathogens of peach and pecan. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 42, p. 715– 728, 2009.

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.

SHIOMI, H. F.; FERREIRA, M. V. R.; MELO, I. S. Bioprospecting bacterial strains for biological control of white mold on soybean. **Scientific Electronic Archives**, v. 10, n. 2, p. 56-63, 2017.

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.

SNYDER, H. New insights into the colonization and release processes of *Xenorhabdus nematophila* and the morphology and ultrastructure of the bacterial receptacle of its nematode host, *Steinernema carpocapsae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 5338– 5346, 2007.

SOMVANSHI, V. S. A novel species of *Xenorhabdus*, family Enterobacteriaceae: *Xenorhabdus indica* sp. nov., symbiotically associated with entomopathogenic nematode *Steinernema thermophilum* Ganguly and Singh, 2000. **Syst. Appl. Microbiol.**, v. 29, p. 519- 525, 2006.

SUMIDA, C. H. et al. Chemical and biological control of *Sclerotinia* stem rot in the soybean crop. **Ciência Rural**. v. 45, n. 5, p. 760-766, 2015.

TAILLIEZ, P. Description of *Xenorhabdus magdalenensis* sp. nov., the symbiotic bacterium associated with *Steinernema australe*. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 62, p. 1761-1765, 2012.

TAILLIEZ, P. et al. New insight into diversity in the genus *Xenorhabdus*, including the description of ten novel species. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 56, p. 2805-2818, 2006.

TAILLIEZ, P. et al. Phylogeny of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* based on universally conserved protein-coding sequences and implications for the taxonomy of these two genera. Proposal of new taxa: *X. vietnamensis* sp. nov., *P. luminescens* subsp. *caribbeanensis* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *hainanensis* subsp. nov., *P. temperata* subsp. *khanii* subsp. nov., *P. temperata* subsp. *tasmaniensis* subsp. nov., and the reclassification of *P. luminescens* subsp. *thracensis* as *P. temperata* subsp. *thracensis* comb. nov. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 60, p. 1921-1937, 2010.

THALER, J. O.; BAGHDIGUIAN, S.; BOEMARE, N. Purification and characterization of xenorhabdycin, a phage tail-like bacteriocin, from the lysogenic strain FI of *Xenorhabdus nematophilus*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 61, p. 2049-2052, 1995.

THOMAS, G. M.; POINAR Jr, G. O. *Xenorhabdus* gen. nov., a genus of entomopathogenic, nematophilic bacteria of the family Enterobacteriaceae. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 29, p. 352-360, 1979.

TIMOSSI, P. C.; DURIGAN, J. C.; LEITE, G. J. Formação de palhada por braquiárias para adoção do sistema plantio direto. **Bragantia**, Campinas, v. 66, n. 4, p. 617-622, 2007.

TÓTH, T.; LAKATOS, T. *Photorhabdus temperata* subsp. *cinerea* subsp. nov., isolated from *Heterorhabditis nematodes*. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 58, p. 2579-2581, 2008.

TRECENTI, R. Efeito da palhada no manejo do mofo branco da soja e do feijão. **A Granja**, Porto Alegre, v. 68, n. 762, p. 65-67, 2012.

TU, J. C. Control of white mold of beans. Agriculture and Agri-Food Canada, Greenhouse and Processing Crops Research Centre, Harrow, Ontario N0R 1G0, Canada. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**. 1997, v.38, p.73-76.

TU, J. C. Management of white mold of white bean in Ontario. **Plant Disease**, v. 73, p. 281-285, 1989.

ULLAH I. et al. Gibberellins synthesized by the entomopathogenic bacterium, *Photorhabdus temperata* M1021 as one of the factors of rice plant growth promotion. **Journal of Plant Interactions**, v.9, n.1, p.775-782, 2014. doi: 10.1080/17429145.2014.942956

WANG, Y. et al. Improvement of antibiotic activity of *Xenorhabdus bovienii* by medium optimization using response surface methodology. **Microbial Cell Factories**. v. 10, p. 98, 2011. Disponível em: <<http://www.microbialcellfactories.com/content/10/>>. Acesso em: 09 de janeiro de 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, J. M. et al. Bacterial metabolites. In GAUGLER, R. (Ed.). **Entomopathogenic nematology**, London: CABI International. 2002, p. 99-114.

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 agricultural nematology**. New York: Marcel Dekker. 1991, p. 855-897.

WU, Y. et al. Effects of volatile organic compounds from *Streptomyces albulus* NJZJSA2 on growth of two fungal pathogens. **Journal of Basic Microbiology**, v. 55, p. 1104-1117, 2015. doi:10.1002/jobm.201400906.

ZHOU, Y. et al. Novel roles of *Bacillus thuringiensis* to control plant diseases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 80, p. 563-572, 2008. doi: 10.1007/s00253-008-1610-3

## ANEXO A

Inibição *in vitro* do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum*, com incorporação de filtrados (10%) de bactérias simbiotes de nematoides entomopatogênicos.

<b>Filtrado do isolado</b>	Crescimento em	Inibição de
<b>bacteriano</b>	BDA (cm)	crescimento (%)
Controle	8,50	0 a*
IBCBn 02	3,60	58 fe
IBCBn 06	8,39	1 a
IBCBn 10	8,50	0 a
CER144	8,50	0 a
PAM 11	1,45	82 g
PAM25	1,52	83 g
Hb EN01	6,57	22 b
CB47	3,80	55 ef
CB48	3,63	55 ef
CER09	8,19	6 a
IBSCn 15	4,05	52 de
Ponto 2C	2,75	68 f
CER 16	5,82	31 bc
CER21	8,50	0 a
CER129	5,23	38 cd
AM163	8,10	5 a

\* Letras diferentes significam diferenças entre tratamentos, de acordo com o teste de Tukey com 1% de probabilidade. CV = 8.65 %

## ANEXO B

Porcentagem de inibição do crescimento micelial e germinação miceliogênica de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* no meio de cultura contendo diferentes tempos de produção dos filtrados da bactéria *Xenorhabdus szentirmaii* PAM 25, bem como diferentes concentrações destes metabólitos incorporados ao meio.

Tratamento	Inibição de crescimento (%)	
	Micélio	Germinação miceliogênica
Controle	0 a*	0 a*
3d MS - 3%	0 a	9,64 b
3d MS- 10%	49,17 c	71,05 cd
3d MS- 33%	83,29 d	98,35 e
6d MS- 3%	46,94 c	56,47 c
6d MS- 10%	73,52 d	100 e
6d MS- 33%	100 e	100 e
9d MS- 3%	0 a	0 a
9d MS- 10%	8,11 b	81,52 d
9d MS- 33%	76,82 d	100 e

MS: Filtrados da bactéria

d: dias de produção dos MS

#: concentração de MS no meio BDA

\*Letras diferentes significam diferenças entre tratamentos, segundo teste Tukey com 1% de probabilidade.  $CV_{micélio} = 10,53\%$ ,  $CV_{escleródio} = 23,59\%$

## ANEXO C

Inibição do crescimento micelial (após 4 dias de crescimento); e inibição da germinação miceliogênica de escleródio (após 6 dias de crescimento), expostos durante 14 dias aos compostos orgânicos voláteis de *Xernorhabdus szentirmaii* PAM 25.

Tratamento	Inibição de crescimento (%)	
	Micelio	Germinação miceliogênica
Controle	0 a*	0 a*
3d - 33% COVs	0 a	0 a
3d - 100% COVs	100 c	100 c
6d - 33% COVs	8 b	4,10 b
6d - 100% COVs	100 c	100 c
9d - 33% COVs	0 a	0 a
9d - 100% COVs	100 c	100 c

COVs: compostos orgânicos voláteis

\*Letras diferentes significam diferenças entre tratamentos, segundo o teste de Tukey com 1% de probabilidade.  $CV_{micélio} = 13.78 \%$ ,  $CV_{escleródio} = 15.78 \%$

## ANEXO D

Germinação de sementes de soja revestidas com filtrados da bactéria *X. szentirmaii* PAM 25 e inoculadas ou não com o fungo *Sclerotinia sclerotiorum*

<b>Tratamento</b>	<b>Germinação de sementes (%)</b>
10% MS + G. xant	76,66 ef*
33% MS + G. xant	86,66 f
100% MS + G. xant	73,33 ef
TSB + G. xant	46,66 cd
H2O + G. xant	63,33 de
10% MS + G. xant + Ss	0 a
33% MS + G. xant + Ss	36,66 c
100% MS + G. xant + Ss	16,66 b
TSB + G. xant + Ss	0 a
H2O + G. xant + Ss	3,33 a

MS: Concentração dos Filtrados de *X. szentirmaii*

G. xant: Goma Xantana

Ss: *Sclerotinia sclerotiorum*

\*Letras diferentes significam tratamentos diferentes, segundo o teste de Tukey com 1% de probabilidade. CV = 12.46 %.

## ANEXO E

Germinação de sementes de soja revestidas com suspensão da bactéria *X. szentirmaii* PAM 25; e plantas sadias desenvolvidas inoculadas ou não com o fungo *Sclerotinia sclerotiorum*.

<b>Tratamento</b>	<b>Germinação de sementes (%)</b>	<b>Plantas sadias (%)</b>
Bact 10% + G. xant	83,33 cde*	80 c*
Bact 33% + G. xant	76,66 bcd	73,33 c
Bact 100% + G. xant	70 bc	66,66 c
TSB+ G. xant	70 bc	66,66 c
H20+ G. xant	73,33 bcd	60 bc
Fungicida	93,33 de	91,66 d
Bact 10%+ G. xant + Ss	46,66 b	0 a
Bact 33% + G. xant + Ss	80 bcd	56,66 bc
Bact 100%+ G. xant + Ss	46,67 b	25,25 b
TSB+ G. xant + Ss	3,33 a	0 a
H20+ G. xant + Ss	6,66 a	0 a
Fungicida + Ss	96,66 e	93,33 d

\* Letras diferentes significam diferenças entre tratamentos, de acordo com o teste de Tukey com 1% de probabilidade.  $CV_{\text{Germinação}} = 23.92 \%$ ,  $CV_{\text{Plantas sadias}} = 15.78 \%$



## ANEXO F

Tamanho e Biomassa fresca das plantas de soja, 21 dias após tratamento com suspensão de bactéria.

<b>Tratamento</b>	<b>Tamanho (cm)</b>	<b>Biomassa (g)</b>
Bact 10% + G. xant	15,90 cd*	0,74 de
Bact 33% + G. xant	16,54 d	0,76 e
Bact 100% + G. xant	11,46 b	0,63 de
TSB+ G. xant	14,75 cd	0,59 c
H20+ G. xant	20 ef	0,73 e
Fungicida	23,95 g	0,71 e
Bact 10%+ G. xant + Ss	0 a	0 a
Bact 33% + G. xant + Ss	14,91 cd	0,64 c
Bact 100%+ G. xant + Ss	11,05 b	0,53 b
TSB+ G. xant + Ss	0 a	0 a
H20+ G. xant + Ss	0 a	0 a
Fungicida + Ss	23,11 ef	0,71 de

\*Letras diferentes significam diferenças entre tratamentos, de acordo com o teste de Tukey com 1% de probabilidade.  $CV_{\text{Tamanho}} = 7.36\%$  e  $CV_{\text{biomassa fresca}} = 13.26\%$ .