

# Seleção e Prospecção de Rizobactérias para o Controle Biológico do Mofo Branco em Espécies de *Crotalaria* spp.<sup>1</sup>

## Selection and Exploration of Rhizobacteria for Biological Control of Mold Blank Species *Crotalaria* spp .

Lais Mayara Melo Duré<sup>a\*</sup>; Lara Rezek Rocha<sup>a</sup>; Ellen Juliete Damasceno Capurro<sup>b</sup>; Bianca Obês Corrêa<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Universidade Anhanguera Uniderp, Curso de Agronomia. MS, Brasil.

<sup>b</sup>Universidade Anhanguera Uniderp, Laboratório de Fitopatologia. MS, Brasil.

<sup>c</sup>Universidade Anhanguera Uniderp, Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Produção e Gestão Agroindustrial. MS, Brasil.

\*E-mail: [laisdure@gmail.com](mailto:laisdure@gmail.com).

### Resumo

O objetivo do trabalho foi isolar micro-organismos de diferentes nichos e avaliar a capacidade dos mesmos no controle de patógenos *in vitro* (*Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium solani*) e *in vivo* (*S. sclerotiorum*), além da promoção do crescimento de *Crotalaria* sp. As amostras de solo foram pesadas e diluídas para obtenção dos micro-organismos. Nos testes *in vitro*, as colônias bacterianas, que apresentaram crescimento, foram submetidas ao confronto direto com os fungos fitopatogênicos. Para análise fisiológica das sementes de *Crotalaria* sp, as sementes foram distribuídas em caixas gerbox contendo papel filtro umedecido com água destilada e incubadas a 20-30 °C por 10 dias. Também foram testadas a antibiose de escleródios em meio líquido. O delineamento usado foi DIC e os dados foram submetidos à análise de variância e comparados por Tukey a 0,5%. Além disso, foi realizada a patologia de sementes tratadas com as bactérias Fit-03 e Fit-04, além da microbiolização das sementes para avaliação da promoção do crescimento em casa de vegetação. Dos 51 isolados, seis foram capazes de produzir substâncias capazes de inibir o crescimento micelial do *F. solani* e três de *S. sclerotiorum*. Na avaliação da capacidade de controle de micro-organismos sobre as sementes das duas espécies de *Crotalaria* sp, Fit-03 e Fit-04 reduziram a incidência de fungos como *Aspergillus* e *Penicillium*. Pode-se afirmar que os isolados Fit-03 e Fit-04 apresentam potencial de uso no controle biológico do mofo branco em plantas de *Crotalaria* sp., bem como amplo espectro de ação.

**Palavras-chave:** Antibiose. *Sclerotinia sclerotiorum*. Microbiolização de Sementes.

### Abstract

The objective was to isolate microorganisms of different niches and assess the ability of these *in vitro* control pathogens (*Sclerotinia sclerotiorum* and *Fusarium solani*) and *in vivo* (*S. sclerotiorum*) in addition to promoting the growth of *Crotalaria* sp. Soil samples were weighed and diluted to obtain the microorganisms. *In vitro* tests the bacterial colonies that grew were subjected to direct confrontation with the pathogenic fungi. For physiological seed analysis *Crotalaria* sp. the seeds were distributed in gerbox boxes containing filter paper moistened with distilled water and incubated at 20-30 °C for 10 days. Antibiosis sclerotia were also tested in liquid medium. The design used was DIC and the data were subjected to analysis of variance and compared by Tukey 0.5%. In addition, there was the seed pathology treated with the Fit-03 bacteria and Fit-04, in addition to microbiolization seeds for evaluation of growth promotion in greenhouse and also spraying the same in detached leaves of *C. juncea* and *C. spectabilis* and pathogen inoculation. After 51 isolates, six were able to produce substances capable of inhibiting the mycelial growth of *F. solani* and three *S. sclerotiorum*. In the evaluation of microorganisms control capability on the seeds of the two species of *Crotalaria* sp, Fit-Fit-03 and 04 reduced the incidence of fungi such as *Aspergillus* and *Penicillium*. It can be said that the Fit-03 isolated and Fit-04 have potential use in biological control of white mold in plant *Crotalaria* sp., as well as a broad spectrum of action.

**Keywords:** Antibiosis. *Sclerotinia sclerotiorum*. Microbiolization seeds.

### 1 Introdução

O controle biológico de doenças de plantas surge como uma possibilidade para o manejo de diversos fitopatógenos (MORANDI; BETTIOL, 2009), envolvendo a redução da densidade populacional do patógeno, a proteção biológica da superfície de plantas e o controle dentro da planta (SILVEIRA, 2001).

As bactérias habitantes de solo e rizosfera de plantas são micro-organismos muito dinâmicos, pois apresentam capacidade de produzir uma série de compostos com capacidade de inibir ou impedir o desenvolvimento de outros micro-organismos, uma vez que possuem uma ampla gama de estratégias para sobreviver em condições adversas de ambiente

e em competição direta com outros micro-organismos (BETTIOL, 1991; ROMEIRO et al., 2000). As bactérias de rizosfera agem sobre os patógenos por mecanismos como antibiose, indução de resistência, competição, predação, parasitismo e hipovirulência (LUGTENBERG; KAMILOVA, 2009).

As bactérias antagonistas se destacam por agir com diferentes mecanismos de ação (antibiose, indução a resistência e parasitismo), sendo os gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus* os mais analisados devido à capacidade que estas bactérias têm de induzirem a resistência, bem como de exercer antagonismo direto pela produção de compostos antimicrobianos (LATHA et al., 2011; WU et al., 2014).

De acordo com Bueno et al. (2007), os fungos

fitopatogênicos habitantes do solo podem causar enormes prejuízos econômicos as culturas, pois são organismos capazes de produzirem estruturas de resistência na ausência de hospedeiro ou em condições climáticas desfavoráveis e são de difícil controle depois que introduzidos na cultura, pois suas estruturas de resistência sobrevivem por vários anos no solo.

O fungo *Sclerotinia sclerotiorum* pode infectar 408 espécies vegetais de 278 gêneros, entre plantas cultivadas e daninhas, à exceção das gramíneas, e causa doenças conhecidas por diferentes denominações, tais como: mofo branco, podridão de esclerotinia, podridão branca da haste e murcha de esclerotinia, devido aos sintomas e sinais produzidos pelo patógeno nas plantas infectadas (AGRIOS, 2005; KIMATI et al., 2005; REIS; TOMAZINI, 2005; BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006; COSTA; COSTA, 2006; REIS et al., 2011; CRATO, 2013).

O fungo *S. sclerotiorum* (Lib.) De Bary produz estruturas de resistência denominadas escleródios, dentro e na superfície dos tecidos colonizados, que voltam ao solo com os resíduos da cultura e são responsáveis pela sua sobrevivência. Os escleródios exercem papel importante no ciclo de vida do fungo, pois sob condições favoráveis e na presença de um hospedeiro suscetível, este germina e produz micélio, que penetra diretamente nos tecidos da base da planta, ou formam apotécios (germinação carpogênica), que se manifesta na superfície do solo e libera os ascósporos, infectando principalmente as flores (LEITE, 2005).

Segundo Poletto (2006), outro fungo de importância agrícola e de difícil controle é o *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. Este gênero *Fusarium* provoca doenças em determinadas culturas como o apodrecimento do caule, a síndrome da morte súbita, a podridão da raiz, a podridão vermelha e a podridão seca (LUGINBUHL, 2010).

Dentre as espécies de plantas que são atacadas por estes patógenos está o gênero *Crotalaria* spp que é um dos maiores da família Leguminosae, com cerca de 690 espécies, sendo estas encontradas em diferentes condições ambientais, como áreas próximas a rios, morros litorâneos, restingas, orlas de florestas, campos e cerrados (FLORES; MIOTTO, 2005). É uma planta de clima tropical e subtropical, não resistindo a geadas, apresentando bom comportamento em solos argilosos e arenosos (CALEGARI et al., 1993).

Dentre as diversas leguminosas usadas como adubo verde, a crotalária é muito eficiente como produtora de massa vegetal e como fixadora de N (SALGADO et al., 1982). Segundo Souza e Pires (2002), no Brasil esta espécie é uma das mais utilizadas para adubação verde.

Com base no exposto, o objetivo do trabalho foi isolar e selecionar bactérias isoladas de diferentes nichos e avaliar a capacidade das mesmas em inibir por antibiose o desenvolvimento dos fungos fitopatogênicos *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium solani* *in vitro* e avaliar a capacidade das mesmas em promover o crescimento vegetal de plantas de *Crotalaria* das espécies *Crotalaria spectabilis* e *Crotalaria*

*juncea*, além do controle do patógeno *in vivo*.

## 2 Material e Métodos

Os experimentos foram realizados no Campo experimental da Universidade Anhanguera Uniderp Agrárias e no Laboratório de Fitopatologia, no município de Campo Grande – MS. A região está situada no bioma Cerrado (20°26'34"S e 54°38'47"W), com altitude média de 532 m.

### 2.1 Coleta e isolamento das bactérias do solo e rizosfera:

Foram coletadas amostras de solo em 20 cm de profundidade sob cultivo de cana-de-açúcar em dois pontos (AM1 e AM2), milho (AM3), café (AM4), crotalaria (AM5) e feijão (AM6). O material foi acondicionado em embalagens plásticas e mantido sobre refrigeração para manter sua conservação para posterior avaliação da população microbiana.

Foram pesadas 10g das amostras AM1, AM3 e AM6 separadamente e suspensas em 90 mL de solução salina (NaCl - 0,85%) e agitadas por 15 minutos. Em sequência, as amostras foram submetidas a diluição seriada, em que 200 µL de cada tubo de diluição foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura PCA (Plate Count Agar) esterilizado (SILVA et al; 2010). Para o crescimento das colônias bacterianas com a finalidade de obter o acervo de bactérias, que foram utilizadas no trabalho, cada diluição 10-1 a 10-10 contou com duas repetições, resultando em 20 placas por amostra.

Após a diluição, as placas foram acondicionadas em BOD por 48 horas a 28°C e, posteriormente, levadas a câmara de fluxo laminar em que foi realizada a caracterização morfológica de cada colônia crescida nas placas e isolamento das mesmas. A caracterização levou em consideração: coloração, forma, bordos e elevação das colônias, a fim de se obter diferentes tipos de isolados.

Feita a caracterização, as colônias foram isoladas em tubos com meio de cultura PCA inclinado para serem acondicionadas novamente em BOD à temperatura de 28°C, em que foram mantidas até apresentarem crescimento pleno para então serem submetidas aos demais testes.

### 2.2 Antibiose

Os testes se iniciaram no dia 08 de Junho de 2015, utilizando as colônias que apresentaram crescimento pleno nas amostras. Estas foram submetidas ao confrontamento direto com os fungos *Fusarium solani* e *Sclerotinia sclerotiorum*, tendo como objetivo constatar quais as bactérias possuem potencial de controle biológico por antibiose.

Para a realização deste procedimento, placas de Petri com meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar) foram vertidas em câmaras de fluxo laminar, sendo quatro bactérias repicadas por placa em pontos equidistantes e no centro adicionado um disco de micélio de 5mm de diâmetro do fungo fitopatogênico. Foram quatro repetições e as placas foram vedadas com papel filme e armazenadas em BOD com fotoperíodo de 12 horas de

luz e 12 horas de escuro. As testemunhas constaram de placas com meio de cultura BDA com disco de micélio dos fungos fitopatogênicos.

As avaliações foram diárias, até que as placas testemunhas cobrissem toda a superfície das placas. Por tanto, foram avaliadas qualitativamente e quantitativamente as placas, observando presença de halos de inibição do crescimento dos fungos fitopatogênicos e os mesmos medidos com paquímetro digital.

Os ensaios subsequentes foram realizados somente com *S. sclerotiorum* devido a importância do patógeno para o cultivo da *Crotalaria* sp.

### 2.3 Antibiose por confrontamento com escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*

#### 2.3.1 Produção de escleródios

O substrato utilizado foi feito com 250g de cenouras picadas e 15 mL de água destilada em erlenmeyers, sendo posteriormente autoclavados por 10 minutos a 120 °C.

Após o resfriamento, foram adicionados quatro discos de micélio de *S. sclerotiorum* com sete dias de crescimento, incubados em câmara de crescimento a temperatura de 28 °C e mantidas até apresentarem crescimento das estruturas de resistência (escleródios).

Após este período, os escleródios produzidos no substrato à base de cenoura foram separados do substrato de origem através de lavagem em água corrente e secos à temperatura ambiente. Os mesmos foram separados por tamanho: pequeno, médio e grande.

#### 2.3.2 Antibiose bactéria antagonista x escleródios

Foram submetidos ao confrontamento direto com as bactérias Fit-03 e Fit-04 que apresentaram comportamento amplo nos testes anteriores. Para tanto, foram utilizadas placas de Petri com meio de cultura BDA (batata-dextrose-água) estéril, na qual foram repicadas as bactérias na forma de um risco de 1 cm em uma extremidade da placa e na outra adicionado um escleródio.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado para cada uma das bactérias e os diferentes tamanhos de escleródios, com quatro repetições.

#### 2.3.3 Tratamento dos escleródios com as bactérias antagonistas

Os escleródios dos três diferentes tamanhos foram desinfestados por um minuto em cada um dos líquidos de desinfestação, álcool 70%, hipoclorito de sódio a 0,5% e lavados em água destilada estéril, em seguida foi retirado o excesso de líquido em papel filtro estéril.

Posteriormente, os diferentes tamanhos de escleródios foram tratados com uma suspensão de cada uma das bactérias (Fit-03 e Fit-04) com 24 horas de crescimento, suspensas em solução salina estéril (0,85% NaCl) e tendo as concentrações ajustadas pelo tubo 5 da escala de Mc Farland por 90 minutos.

Após, os mesmos foram retirados da suspensão e secos em papel filtro estéril e adicionados em placas de Petri contendo meio de cultura BDA. Como testemunhas foram utilizados escleródios de diferentes tamanhos tratados com solução salina.

Então, estes foram incubados em câmara de crescimento a 25±2 °C. As avaliações do crescimento micelial ocorreram diariamente.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro repetições para os diferentes tamanhos de escleródios (P, M, G) e as duas bactérias antagonistas.

### 2.4 Antibiose em meio líquido

Neste ensaio foi utilizado meio de cultura BD (batata – dextrose) líquido, sem adição de ágar e avaliado o crescimento de *S. sclerotiorum*, para isso foram repicados discos de micélio (0,5 cm de diâmetro) com sete dias de crescimento, em erlenmeyers contendo meio líquido adicionado com 100 µL das bactérias Fit-03 e Fit-04 separadamente e como testemunha somente o disco de micélio do fungo adicionado ao meio líquido.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três repetições.

### 2.5 Análise fisiológica de sementes de *Crotalaria* sp.

Foram avaliadas as porcentagens de germinação das duas cultivares de crotalaria, sendo estas: *C. juncea* e *C. spectabilis*, ambas cedidas pela Agropecuária Cultivar e as duas foram submetidas ao teste de germinação, segundo o Manual de Regras para Análises de Sementes (Brasil, 2009), em que sementes de diferentes cultivares foram distribuídas em caixas gerbox contendo papel filtro umedecido com água destilada.

Foram utilizadas quatro repetições de 25 sementes, totalizando 100 sementes para cada cultivar. As caixas gerbox foram incubadas a 20-30 °C por 10 dias. As avaliações foram realizadas aos quatro e dez dias após a semeadura.

### 2.6 Avaliação do potencial antagonista em sementes de *Crotalaria* sp.

As sementes das espécies *C. juncea* e *C. spectabilis* foram tratadas em suspensão das bactérias Fit-03 e Fit-04, com 24 horas de crescimento em meio de cultura Nutriente-Ágar, suspensas em solução salina (NaCl 0,85%) e suas concentrações ajustadas pelo tubo número 5 da escala de Mc Farland.

As sementes das duas espécies ficaram embebidas nestas suspensões por 30 minutos. Como testemunhas foram usadas sementes das duas espécies embebidas em solução salina. As sementes foram, então, submetidas ao Botter test (BRASIL, 2009), em caixas gerbox anteriormente desinfestadas com álcool 70% e hipoclorito de sódio a 0,5%, contendo três folhas de papel filtro umedecido com água destilada. As caixas foram incubadas a 25±2 °C pelo período de sete dias. As avaliações

foram realizadas observando cada uma das sementes em microscópio estereoscópio para observação dos fungos que estavam sobre as mesmas.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com duas repetições de 100 sementes para cada uma das espécies e seus tratamentos.

### 2.7 Avaliação do potencial de uso de bactérias para promoção do crescimento vegetal

Após as avaliações de antibiose foram selecionadas duas bactérias com potencial antagonístico *in vitro* para *F. solani* e *S. sclerotiorum*, sendo estas a Fit-03 e Fit-04.

Para tanto, as bactérias Fit-03 e Fit-04 foram repicadas para meio de cultura Ágar-Nutriente, e as suspensões realizadas com solução salina (NaCl 0,85%) e a concentração ajustada pelo tubo número 5 da escala de Mc Farland. As sementes das duas cultivares foram embebidas nesta suspensão por 30 minutos. Em seguida, semeadas em vasos com capacidade para 5 litros com solo pobre em matéria orgânica.

As avaliações foram baseadas no índice de velocidade de emergência (IVE), número e massa fresca de folhas, massa fresca das raízes e massa fresca da parte aérea.

### 3 Resultados e Discussão

Foram isoladas 93 bactérias, destas 46 de solo sob cultivo de milho, 34 foram isoladas de solo sob cultivo de cana-de-açúcar, 13 de solo sob cultivo de feijão.

Os isolados apresentaram uma ampla variação com relação à forma, cor, elevação das colônias, o que potencializa a ideia da diversidade de micro-organismos, principalmente, bactérias em solos sob cultivo de leguminosas e gramíneas (COSTA JÚNIOR et al., 1999).

Com relação aos ensaios para antibiose foram testados somente os isolados bacterianos, que apresentaram crescimento após o período entre isolamento e início dos ensaios. Assim, pode-se observar no Quadro 1 que dos 51 isolados, seis foram capazes de produzir substâncias capazes de inibir o crescimento micelial do *F. solani* e duas de *S. sclerotiorum*.

**Quadro 1** - Antibiose de 51 isolamentos bacteriano isolados de diferentes nichos sobre o confrontamento direto com *Fusarium solani* e *Sclerotinia sclerotiorum* *in vitro*. Campo Grande/MS

Isolados bacterianos	Antibiose
<i>Fusarium solani</i>	
Fit03 04 05 07 08 09 11 12 13 14 15 16 17 18 19 23 24 27 28 30 31 34 41 42 43 44 45 53 60 62 63 64 66 67 69 71 72 75 76 79 82 83 84 85 86 87 88 89 91 92 93	03 04 05 07 12 27
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	
Fit03 04 05 07 08 09 11 12 13 14 15 16 17 18 19 23 24 27 28 30 31 34 41 42 43 44 45 53 60 62 63 64 66 67 69 71 72 75 76 79 82 83 84 85 86 87 88 89 91 92 93	04 05

Fonte: Dados da pesquisa.

Nas avaliações realizadas com *F. solani*, a bactéria Fit-031 durante os primeiros três dias de avaliação possibilitou controle do patógeno, atrasando seu desenvolvimento em comparação com as testemunhas, porém no último dia de medição, o fungo já havia atingido a borda da placa de Petri, ou seja, conseguiu se desenvolver.

Nas avaliações com *F. solani* se pode observar nitidamente os halos de inibição do crescimento micelial nos isolados bacterianos Fit-03, Fit-04, Fit-05, Fit-12 e Fit-27. Destacando os três últimos, respectivamente, uma vez que os mesmos apresentaram potencial inibitório desde os primeiros dias após a implantação do ensaio.

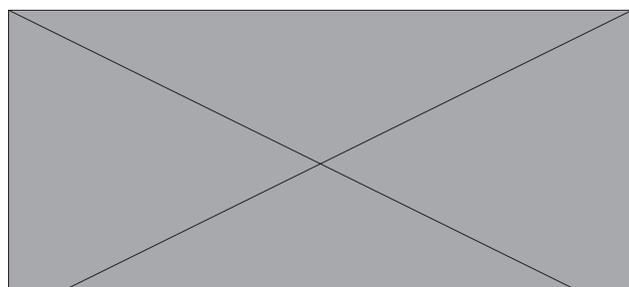
Já nas avaliações realizadas com *S. sclerotiorum*, das 51 amostras testadas somente duas apresentaram potencial inibitório do crescimento micelial, somente Fit-04 e Fit-05 que são isolados de amostras de solo sob cultivo de cana-de-açúcar. Além disso, a Fit-05 possibilitou a formação de um micélio de coloração diferente e mais transparente em relação à testemunha.

O isolado Fit-04 apresentou maior potencial de antagonismo em relação ao fungo patogênico, não permitindo que o mesmo aproximasse da bactéria, sendo que nas placas testemunhas não possibilitaram o controle e o crescimento do fungo ocupou toda a placa.

O isolado Fit-05 apresentou controle para inibir os dois fungos fitopatogênicos, o que permitiu seu uso devido ao amplo espectro de ação.

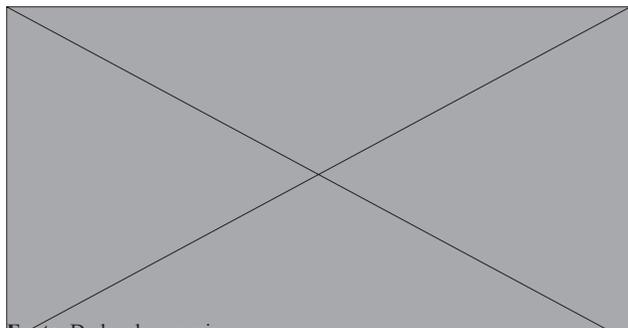
Nos gráficos das Figuras 1 e 2 estão os resultados de antibiose dos isolados Fit-03 e Fit-04 que se destacaram nos ensaios anteriores, em que foi avaliada a porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC), observa-se que para o fungo *F. solani* as bactérias Fit-03 e Fit-04 foram os tratamentos que possibilitaram reduções de 23,3 e 23,7% no crescimento do fungo, respectivamente. Já para as *S. sclerotiorum* não houve diferença estatística para nenhum dos isolados bacterianos.

**Figura 1** - Antibiose por confrontamento direto dos isolados bacterianos e o fungo fitopatogênico *Fusarium solani*, Campo Grande/MS.



Fonte: Dados da pesquisa.

**Figura 2** - Antibiose por confrontamento direto dos isolados bacterianos e o fungo fitopatogênico *Sclerotinia sclerotiorum*, Campo Grande/MS.



Fonte: Dados da pesquisa.

Para o ensaio em que foi realizado o tratamento dos escleródios com as bactérias Fit-03 e Fit-04 não foi possível realizar a avaliação devido à alta incidência de contaminantes, fato provavelmente decorrente da desinfestação dos escleródios. No entanto, pode-se observar qualitativamente que nas placas nas quais os escleródios receberam o tratamento com as bactérias (Fit-03 e Fit-04), independente do tamanho dos escleródios (P, M ou G), os micélios formados eram mais hialinos e sem produção de novos escleródios, diferentemente das placas testemunhas, nas quais havia produção de escleródios.

Os ensaios com meio líquido possibilitaram observar, mais uma vez, que as bactérias Fit-03 e Fit-04 qualitativamente permitiram a inibição do crescimento micelial do fungo. Uma vez que estas bactérias produziram uma pigmentação verde no meio de cultura, característica comum de bactérias pertencentes à espécie *Pseudomonas fluorescens*. Mesmo não podendo confirmar que as mesmas são esta espécie se pode aventar esta hipótese pela coloração do meio, além da inibição do crescimento do fungo, uma vez que esta apresenta como peculiaridade a produção de compostos antimicrobianos conhecidos no controle de patógenos.

As *P. fluorescens* são bactérias gram-negativas e produzem um pigmento verde amarelado fluorescente, sendo encontrada tanto no solo quanto na água. As espécies mais importantes são geralmente estudadas com o objetivo de avaliar a promoção de crescimento em plantas (FONSECA et al., 2000).

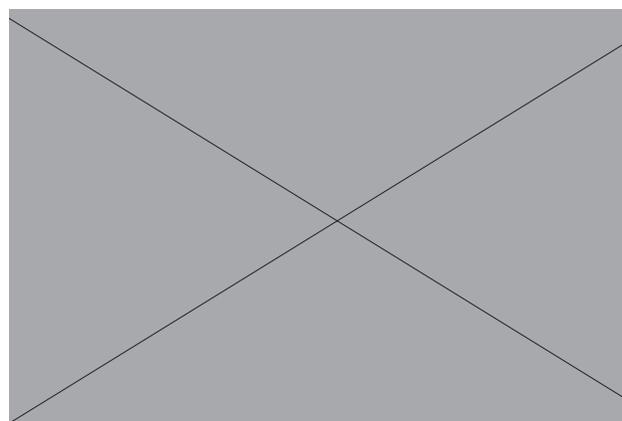
De acordo Ferreira et al., (2009), as bactérias do grupo *P. fluorescens* têm ganhado grande destaque entre as rizobactérias por serem potentes colonizadoras da rizosfera, tendo seu desenvolvimento influenciado por fatores como o tipo de substrato e o ambiente em que se desenvolvem, bem como pela rizosfera em que estão estabelecidos.

Apesar de algumas espécies de *Pseudomonas* apresentarem fitopatogenicidade, a espécie *P. fluorescens* tem sido relacionada a efeitos benéficos observados em plantas (JI et al., 2006), caracterizando-a como promissoras rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCPs). As RPCPs usam diferentes mecanismos para supressão de patógenos de plantas e promoção de crescimento vegetal, como a

competição por nutrientes por meio da produção de sideróforos (DOBBELAERE et al., 2003), antibiose (JETIYANON; KLOEPPER, 2002), síntese de hormônios vegetais como: auxinas (PICARD; BOSCO, 2005), citocininas (ASLANTAS et al., 2007) e giberelinas (PROBANZA et al., 2002) e fornece nutrientes às plantas, como o nitrogênio pela fixação biológica de nitrogênio (DOBBELAERE et al., 2003).

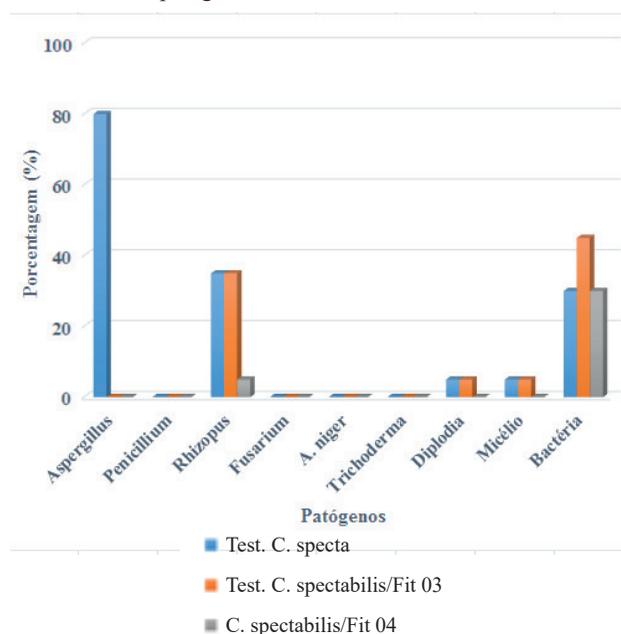
Na avaliação da capacidade de controle de micro-organismos sobre as sementes das duas espécies de *Crotalaria* sp. se pode dizer que estas bactérias apresentam este potencial, pois Fit-03 e Fit-04 reduziram a incidência de fungos como *Aspergillus* e *Penicillium* importantes patógenos pelo fato de que degradam a sementes, principalmente, em condições de armazenamento (ANTONELLO et al., 2009).

**Figura 3** - Microbiolização de sementes de *Crotalaria juncea* e incidência de patógenos



Fonte: Dados da pesquisa.

**Figura 4** - Microbiolização de sementes de *Crotalaria spectabilis* e incidência de patógenos



Fonte: Dados da pesquisa.

**Quadro 2** - Número de folhas (NF), massa seca de folhas (MSF), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca de raízes (MSR) e índice de velocidade de emergência (IVE) de plantas de *Crotalaria juncea* e *C. spectabilis* oriundas de sementes microbiolizadas com as bactérias Fit-03 e Fit-04 isoladas de solo sob cultivo de cana-de-açúcar.

Tratamentos	<i>Crotalaria juncea</i>				
	NF	MSF	MSPA	MSR	IVE
Testemunha	9b	0,09a	0,18b	0,04b	0,86a
Fit-03	32a	0,31a	0,69a	0,11a	1,3a
Fit-04	18ab	0,20a	0,39ab	0,04b	1,1a
Tratamentos	<i>Crotalaria spectabilis</i>				
	NF	MSF	MSPA	MSR	IVE
Testemunha	0b	0b	0b	0b	0,0b
Fit-03	12a	0,26a	0,36a	0,5a	0,21 <sup>a</sup>
Fit-04	12a	0,27a	0,37a	0,4a	0,23a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna foram significativas pelo teste de Tukey a 0,05% de probabilidade.

De modo geral, para a espécie *C. juncea*, apenas o tratamento Fit-03 apresentou diferença estatística em relação a testemunha. Já para avaliações com *C. spectabilis*, o tratamento Fit-03 e Fit-04 diferiu estatisticamente do tratamento testemunha, porém não houve significância entre si.

A formação de coleções de culturas bacterianas é essencial para o desenvolvimento de projetos de controle biológico, tendo em vista que estas oferecem estoque representativo de amostras de isolados, além de possibilitar a oportunidade de gerar informações economicamente importantes para a seleção e utilização destes micro-organismos (MELLO, 2008).

Segundo Grigoletti Junior et al. (2000), a seleção de micro-organismos com potencial antagonista *in vitro* (condições controladas) serve como uma alternativa preliminar para avaliar a capacidade antagonista, e apontam o comportamento do micro-organismo, com relação a sua capacidade de adaptação, de crescimento e de reprodução.

O biocontrole pela aplicação de micro-organismos benéficos tem sido apontado como uma alternativa importante e tecnicamente justificável, pois tem por finalidade manter um equilíbrio no agroecossistema, fazendo com que o hospedeiro, na presença do patógeno, não sofra danos expressivos (BATISTA-JUNIOR et al., 2002). Dentre os micro-organismos utilizados no controle biológico de doenças se encontram as rizobactérias. Nas últimas décadas, estes micro-organismos colonizadores da rizosfera têm recebido atenção especial, pois atuam no controle biológico direto de patógenos de solo e parte aérea e também como inoculantes para incremento na produção agrícola, sendo assim chamadas de rizobactérias de plantas.

#### 4 Conclusão

Pode-se afirmar que os isolados Fit-03, Fit-04, Fit-05, Fit-07, Fit-12 e Fit-27 têm potencial para inibir o desenvolvimento

do fungo *Fusarium solani*. Já nos testes *in vitro* com *Sclerotinia sclerotiorum*, apenas o Fit-04 e Fit-05 reduziram o desenvolvimento do fungo.

Nas avaliações *in vivo*, o Fit-03 e Fit-04 apresentam potencial de uso no controle biológico do mofo branco em plantas de *Crotalaria* sp., bem como amplo espectro de ação frente a outros patógenos.

#### Referências

- AGRIOS, G.N. *Plant pathology*. San Diego: Elsevier Academic, 2005.
- ANTONELLO, L.M. et al. Qualidade de sementes de milho armazenadas em diferentes embalagens. *Ciênc. Rural*, v.39, n.7, 2009.
- ASLANTAS, R.; CAKMAKCI, R.; SAHIN, F. Effect of plant growth promoting rhizobacteria on young apple tree growth and fruit yield under orchard conditions. *Scie. Horticulturae*, v.111, n.4, p.371-377, 2007.
- BATISTA JÚNIOR, C.B. et al. Efeito fungistático de *Bacillus thuringiensis* e de outras bactérias sobre alguns fungos fitopatogênicos. *Pesq. Agrop. Bras.*, v.37, n.8, p.1189-1194, 2002.
- BETTIOL, W. Controle biológico de doenças de plantas. Jaguariúna: Embrapa, 1991.
- BOLTON, M.D.; THOMMA, B.P.H.J.; NELSON, B.D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. *Mol. Plant Pathol.*, v.7, n.1, p.1-16, 2006.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes. Brasília: MAPA, 2009.
- BUENO, C.J.; AMBRÓSIO, M.M.Q.; SOUZA, N.L. Production and evaluation of survival of resistance structures of soilborne phytopathogenic fungi. *Summa Phytopathol.*, v.33, n.1, p.47-55, 2007.
- CALEGARI, A. et al. Caracterização das principais espécies de adubo verde. In: CALEGARI, A. et al. *Adubação verde no sul do Brasil*. Rio de Janeiro: AS-PTA, 1993. p.207-327.
- COSTA, G.R.; COSTA, J.L. da S. Influência do solo e de substratos para produção de escleródios na germinação carpogênica de *Sclerotinia sclerotiorum*. *Pesq. Agrop. Trop.*, v.36, p.83-87, 2006.
- COSTA JÚNIOR, C. R. et al. Isolamento e caracterização morfológica de bactérias em nódulos de leguminosas forrageiras. 1999. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/266415581\\_ISOLAMENTO\\_E\\_CARACTERIZACAO\\_MORFOLOGICA\\_DE\\_BACTERIAS\\_EM\\_NODULOS\\_DE\\_LEGUMINOSAS\\_FORRAGEIRAS](https://www.researchgate.net/publication/266415581_ISOLAMENTO_E_CARACTERIZACAO_MORFOLOGICA_DE_BACTERIAS_EM_NODULOS_DE_LEGUMINOSAS_FORRAGEIRAS)
- CRATO, F.F. Quantificação de escleródios e germinação miceliogênica e carpogênica de *Sclerotinia sclerotiorum* oriundos da cultura da soja tratada química e biologicamente. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, 2013.
- DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Crit. Rev Plant Scie.*, v.22, n.2, p.107-149, 2003.
- FERREIRA, E.P.B. et al. Diversidade de *Pseudomonas fluorescens* em diferentes sistemas de manejo do solo e rotação de culturas. *Rev Bras. Ciênc. Agrárias*, v.4, n.2, p.140-148, 2009.
- FLORES, A.S.; MIOTTO, S.T.S. 2005. Aspectos fitogeográficos das espécies de *Crotalaria* L. (Leguminosae – Faboideae) na região Sul do Brasil. *Acta Bot. Bras.*, v.19, n.2, p.245-249, 2005

- FONSECA, M.C.C. et al. Isolamento e caracterização morfológica de *Pseudomonas* spp. *fluorescentes* nativas em sistemas de produção agrícola. Comunicação Técnico, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Embrapa Agrobiologia Nº 43, 12/2000, p. 1-4.
- GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; SANTOS, A.F.; AUER, C.G. Perspectivas do uso do controle biológico contra doenças florestais. *Rev Floresta*, v.30, p.155-165, 2000.
- JETIYANON, K.; KLOPPER, J. W. Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria for induction of systemic resistance against multiple plant diseases. *Biol. Control.*, v.24, n.3, p.285-291, 2002.
- JI, P.; CAMPBELL, H. L.; KLOPPER, J. W.; JONES, J. B.; SUSLOW, T. V.; WILSON, M. Integrated biological control of bacterial speck and spot of tomato under field conditions using foliar biological control agents and plant growth-promoting rhizobacteria. *Biological Control*, v.36, n.3, p.358-367, 2006.
- KIMATI, H. Doenças do feijoeiro: *Phytophthora vulgaris* L. In: GALLI, F. *Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas*. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. p.297-318.
- LATHA, P. et al. Combining *Pseudomonas*, *Bacillus* and *Trichoderma* strains with organic amendments and micronutrient to enhance suppression of collar and root rot disease in physic nut. *Appl. Soil Ecol.*, v.49, p.215-223, 2011.
- LEITE, R.M.V.B.C. Ocorrência de doenças causadas por *Sclerotinia sclerotiorum* em girassol e soja. Londrina: Embrapa Soja, 2005.
- LUGINBUHL, S.A class Project for PP728 Soil borne Pathogens, Fall 2010. Disponível em: <[http://www.cals.ncsu.edu/course/pp728/Fusarium%20solani/Fusarium\\_solani.htm](http://www.cals.ncsu.edu/course/pp728/Fusarium%20solani/Fusarium_solani.htm)>. Acessado em: 6 jun. 2017.
- LUGTENBERG, B.; KAMILOVA, F. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annual Rev Microbiol.*, v.63, p.541-556, 2009.
- MELLO, S.C.M. Recursos genéticos de microrganismos. In: ALBUQUERQUE, A.C.S.; SILVA, A.G. *Agricultura tropical: quatro décadas de inovações tecnológicas, institucional e políticas*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2008.
- MORANDI, M.A.B.; BETTIOL, W.G. Controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. *Biocontrole de doenças de plantas: usos e perspectivas*. Jaguariúna, 2009. p.7-14.
- PICARD, P.; BOSCO, M. Maize heterosis affects the structure and dynamics of indigenous rhizospheric auxins-producing *Pseudomonas* populations. *FEMS Microbiol. Ecol.*, v.53, n.3, p.349-357, 2005.
- POLETO, I. et al. Zoneamento e identificação de *Fusarium* spp. Causadores da podridão de raízes em plantios de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil) na região do Vale do Taquari, RS. *Ciênc. Florestal*, v.16, n.1, p.1-10, 2006.
- PROBANZA, A. et al. *Pinus pinea* L. seedling growth and bacterial rhizosphere structure after inoculation with PGPR *Bacillus* (B. licheniformis CECT 5106 and B. pumilus CECT 5105). *Appl. Soil Ecol.*, v.20, n.2, p.75-84, 2002.
- REIS, E.M.; CASA, R.T.; GAVA, F. Indução da germinação carpogênica de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* sob diferentes substratos. *Rev Ciênc. Agrovet.*, v.10, n.2, p.145-150, 2011.
- REIS, E.M.; TOMAZINI, S.L. Viabilidade de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* em duas profundidades no solo. *Summa Phytopathol.*, v.31, p.97-99, 2005.
- ROMEIRO, R.S. et al. Seleção de bactérias residentes de filoplano de tomateiro como agentes de biocontrole de enfermidades da parte aérea da cultura. *Summa Phytopathol.*, v.26, p.220-224, 2000.
- SALGADO, A.L.B. et al. Efeito da adubação NPK na cultura da crotalária. *Bragantia*, v.41, p.21-33, 1982.
- SILVEIRA, E.B. Bactérias promotoras de crescimento de plantas e biocontrole de doenças. In: Proteção de plantas na agricultura sustentável. MICHEREFF, S.J.; BARROS, R. Recife, UFRPE. 368p. 2001.
- SOUZA, C.M.; PIRES, F.R. *Adubação verde e rotação de culturas*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2002.
- WU, Y. Biocontrol traits and antagonistic potential of *Bacillus amyloliquefaciens* Strain NJZSB3 against *Sclerotinia sclerotiorum*, a causal agent of canola stem rot. *J. Microbiol. Biotechnol.*, v.24, n.10, p.1327-1336, 2014.