

CONTROLE BIOLÓGICO DE *Sclerotinia sclerotiorum* E *Rhizoctonia* sp. POR BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE PLANTAS DANINHAS

BIOLOGICAL CONTROL OF Sclerotinia sclerotiorum AND Rhizoctonia sp. *BY ENDOFITIC BACTERIES OF WEED PLANT*

Lívia Helena de Oliveira ⁽¹⁾

Natália Sarmanho Monteiro Lima ⁽²⁾

Luis Angel Chicoma Rojas ⁽³⁾

Eliana G. Macedo Lemos ⁽⁴⁾

Pedro Luís da Costa Aguiar Alves ⁽⁵⁾

Resumo

Este trabalho avalia o comportamento de bactérias endofíticas quando em contato com os fungos *Sclerotinia sclerotiorum* e *Rhizoctonia* sp. As bactérias endofíticas identificadas pelo sequenciamento 16S rRNA foram *Cytobocillus kochii* e *Bacillus cytotoxicus*, estas encontradas em plantas daninhas do gênero *Cyperus rotundus*, comumente achadas em cultivos de interesse econômico, como o amendoim. Os microorganismos foram avaliados em controle de cultivo dual e metabólitos voláteis. Os resultados demonstram que as bactérias foram capazes de produzir metabólitos voláteis que inibiram ambos fitopatógenos.

Palavras-chaves: Biocontrole; Doenças fitopatológicas; Patógenos; Amendoim.

Abstract

This study evaluates the behavior of endophytic bacteria when in contact with the fungi Sclerotinia sclerotiorum and Rhizoctonia sp. The endophytic bacteria identified by 16S rRNA sequencing were Cytobocillus kochii and Bacillus cytotoxicus, which were found in weeds of the genus Cyperus rotundus, commonly found in economically important crops such as peanuts. The microorganisms were evaluated in dual-culture assays and for volatile metabolites. The results demonstrate that the bacteria were capable of producing volatile metabolites that inhibited both plant pathogens.

Keywords: Biocontrol; Phytopathology diseases; Pathogens; Peanut.

1. Introdução

A cultura do amendoim (*Arachis hypogaea*) possui grande importância na economia brasileira. Dados da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2025) registraram uma produtividade média de 4.176 kg/ha entre as safras de 2024 e 2025, destacando a necessidade de avanços tecnológicos para consolidar a competitividade brasileira no mercado mundial. Porém, a ocorrência de fitopatógenos no cultivo desse grão representa um grande gargalo econômico, comprometendo não apenas a rentabilidade do produtor, mas também cadeias associadas, como a rotação de culturas, a produção de biodiesel e o processamento de rações animais (PALAZIM, M., 2023).

¹Graduanda em Engenharia Agrônoma pela Unesp/FCAV; ² Pós Doutoranda em Microbiologia Agropecuária pela Unesp/FCAV;

³Doutorando do Programa de Genética e Melhoramento de Plantas; ⁴Professora Titular. Departamento de Biotecnologia Agropecuária e Ambiental, Unesp/FCAV; ⁵Professor Titular. Departamento de Biologia, Unesp/FCAV.

Dentre as principais ameaças fúngicas à cultura, destacam-se os fungos *Sclerotinia sclerotiorum* e *Rhizoctonia* sp. (KIMATI, H., et al., 1997), que colonizam a região radicular e comprometem o desenvolvimento das vagens (BETTIOL, W., et al., 2009). O *S. sclerotiorum* é agente causal do mofo-branco, destaca-se pela alta persistência no campo devido à formação de estruturas de resistência, os escleródios. Sob condições de umidade elevada e temperaturas amenas, essas estruturas germinam e liberam ascósporos, infectando a parte aérea da planta e degradando os tecidos vegetais para a obtenção de nutrientes (FRANZ, B. R., 2025).

Paralelamente, o fungo *Rhizoctonia* sp. é um dos principais responsáveis pela transmissão via semente-plântula, provocando a podridão de raízes, vagens e o tombamento (*damping-off*) do vegetal (KIMATI, H., et al.). Os sintomas incluem lesões necróticas escuras no caule e na região do colo, reduzindo drasticamente a germinação e o estande final da lavoura. Apesar de seu elevado impacto econômico, este gênero ainda carece de estudos aprofundados no Brasil, apresentando alta variabilidade patogênica (CARVALHO, R. C. P., 2025).

Como o controle químico tradicional muitas vezes mostra-se um risco ecológico e de baixa eficiência devido à resiliência desses fungos no solo, o controle biológico surge como uma alternativa sustentável (GERALDO, L. C., 2023). Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de bactérias endofíticas isoladas de plantas daninhas do gênero *Cyperus rotundus* no biocontrole in vitro de *S. sclerotiorum* e *Rhizoctonia* sp.

2. Materiais e Métodos

2.1 Identificação molecular e análise filogenética

O DNA total foi extraído usando o TIANamp Genomic DNA kit de acordo com as especificações do fabricante; a integridade do DNA foi determinada por eletroforese em gel de agarosea 1% e a quantificação foi feita utilizando o equipamento Qubit Fluorometer (Thermo® Scientific, Massachusetts, USA). A amplificação do gene 16S rRNA foi realizada pela reação em cadeia da polimerase (PCR) usando oligonucleotídeos FD1 (5'-CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e RD1 (5'-CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC-3') (Weisburg et al., 1991). As reações de PCR foram feitas utilizando o mastermix da PCRBIO Ultra mix de acordo com as recomendações do fabricante; 10 pMol de cada oligonucleotídeo e 40 ng de DNA. O DNA foi amplificado em termociclador ABI7600 (Applied Biosystems) de acordo com o programa: pré-aquecimento a 94 °C por 5 minutos; 35 ciclos de 30 segundos de

desnaturação a 94 °C; 40 segundos de emparelhamento dos oligonucleotídeos a 56 °C; 1 minuto e 30 segundos de elongação a 72 °C e 7 min de etapa de extensão final a 72 °C. Os produtos de PCR foram purificados utilizando o kit “DNA Clean & Concentrator™ - 5” Zymo Research. O sequenciamento do gene 16S rRNA foi realizado na plataforma ABI 3130xl, o protocolo da reação de sequenciamento foi realizado de acordo com o descrito pelo fabricante do BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, utilizando-se para isso os primers FD1, RD1 e os internos 8f, 362f, 786f, 907r e 1203f segundo Inui et al. (2012). As sequências foram analisadas com o programa “Phred/ Phrap/Consed” (Gordon et al., 1998). As sequências com mais de 400 bases e com qualidade Phred acima de 20 foram selecionadas, com auxílio do programa Contgen. As sequências em formato fasta foram comparadas com sequências do GenBank utilizando o programa BLAST (Altschul et al., 1997).

2.2 Ensaio de atividade antagônica de fungos

Foi testada a atividade antagônica dos isolados bacterianos TT07 e TT13 contra os seguintes fungos fitopatogênicos: *Sclerotinia sclerotiorum* e *Rhizoctonia* sp. Disco de ágar (≈5 mm de diâmetro) de cultura fúngica (cultivados por 7 dias) foram colocados no centro de placas de Petri (9 cm de diâmetro) com meio BDA e, em seguida, em um ponto equidistante do disco micelial fúngico, 10 µl dos cultivos bacterianos (TT07 e TT13) foram inoculados. Placas de Petri inoculadas apenas com fungos fitopatogênicos foram usadas como controles. As placas foram incubadas a 25 ± 1 °C por 5 a 7 dias e, em seguida, meio de cultura BDA). As placas foram mantidas na BOD de 7 a 10 dias a 25 ± 1 °C.

2.3 Ensaio de compostos voláteis

Foram utilizadas placas descartáveis com divisória, onde de um lado foi colocado meio LB sólido, e do outro colocado meio BDA sólido, com pH 7. No meio com BDA foi inoculado um disco de ágar (≈5 mm de diâmetro) de cultura fúngica (cultivados por 7 dias), no meio com LB foi inoculado 10µL do cultivo do isolado bacteriano. As placas foram armazenadas na BOD a 28 °C de 5-7 dias.

2.4 Análises estatísticas

A porcentagem de mortalidade do bioensaio com *Sclerotinia sclerotiorum* e *Rhizoctonia* sp. e índice de crescimento micelial nos bioensaios de atividade antagônica e de crescimentos foram calculados e esses dados foram submetidos a um teste estatístico

de Tukey, com um a significância igual a 95%. Os gráficos e demais análises estatísticas resultantes foram processadas pelo programa R Studio.

3. Resultado e Discussões

A partir da análise filogenética do gene 16S rRNA foi possível identificar a nível de gênero os isolados estudados. O isolado previamente chamado de TT13 foi identificado como *Bacillus cytotoxicus*; o isolado TT07 foi caracterizado como *Cytobocillus kochii*.

No cultivo dual percebeu-se pouca diferença na estatística entre a média do controle dos fitopatógenos e a média do meio compartilhado entre os fungos e as bactérias TT07 e TT13, portanto esse cultivo não apresenta relevância no controle biológico de doenças fitopatogênicas do cultivo do amendoim (Figura 1.).

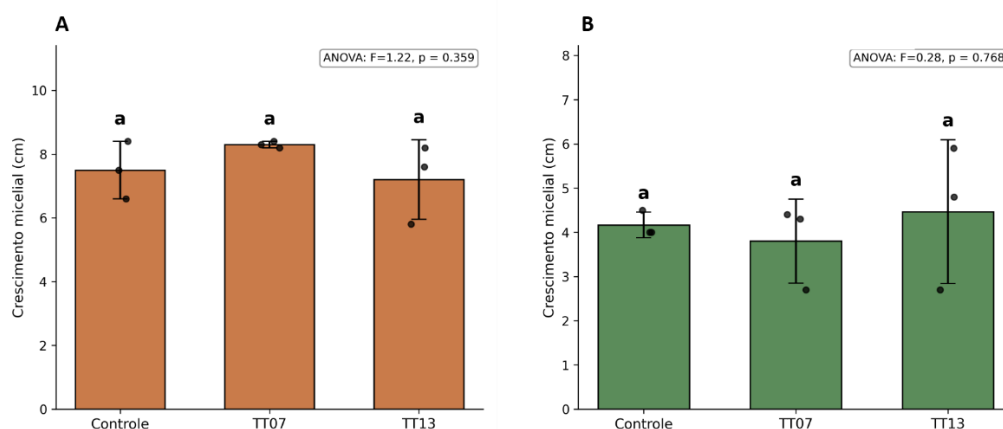


Figura 1. Efeito dos tratamentos bacterianos sobre o crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* e *Rhizoctonia* sp. em ensaio de cultivo dual. Letras iguais sobre as barras indicam ausência de diferença estatística entre os tratamentos pelo teste de Tukey.

O controle do ensaio de metabólitos voláteis do fungo *Rhizoctonia* sp. apresentou crescimento médio 3,5 cm, quando em ambiente compartilhado com a bactéria TT07 *Cytobocillus kochii* teve crescimento médio de 2,4 cm, já com a TT13 *Bacillus cytotoxicus*, teve de 2,5 cm (Figura 2.). Por observação visual foi possível concluir que houve redução da densidade do inóculo fúngico.

O controle do ensaio de metabólitos voláteis do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* apresentou crescimento médio 6,1 cm, quando em ambiente compartilhado com a bactéria TT07 *Cytobocillus kochii* teve crescimento médio de 2,2 cm, já com a TT13 *Bacillus cytotoxicus*, teve de 2,3 cm. Por observação visual foi possível concluir que houve redução da densidade do inóculo fúngico.

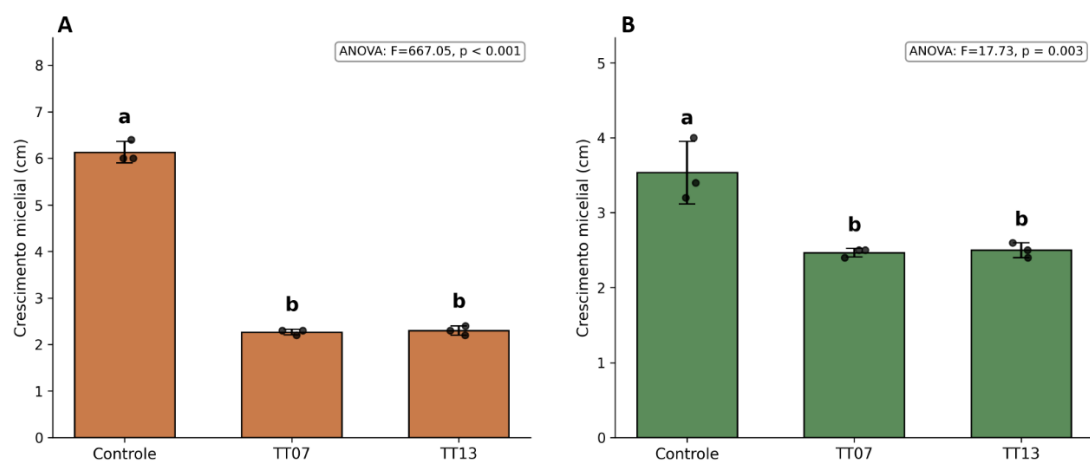


Figura 2. Efeito dos tratamentos bacterianos sobre o crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* e *Rhizoctonia* sp. em ensaio de metabolitos voláteis. Letras iguais sobre as barras indicam ausência de diferença estatística entre os tratamentos pelo teste de Tukey.

4. Conclusões

A partir desse trabalho, foi possível analisar que apenas no ensaio de metabolitos voláteis as bactérias endofíticas estudadas puderam contribuir para a diminuição da colonização dos fungos de forma eficiente. Desse modo, posteriormente, será avaliado o real potencial das bactérias no controle biológico dos fitopatógenos. Portanto, conclui-se que a aplicação de *Cytobocillus kochii* e *Bacillus cytotoxicus* apresenta potencial biotecnológico e agrícola para o controle de doenças ligadas a cultura do amendoim.

5. Apoio Financeiro

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) - 2024/14496-2 e 2019/20825-0.

6. Referências

- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). Acompanhamento da safra brasileira de grãos: safra 2024/2025: décimo levantamento. Brasília: Conab, 2025.
- PALAZIM, M. Inovação na proteção das sementes de amendoim. Campo & Negócios, Uberlândia, 2023.
- KIMATI, H., et al. Manual de Fitopatologia: Volumes 2: Doenças das Plantas Cultivadas. Ceres IV (66). São Paulo: Agronômica Ceres Ltda., 1997.
- BETTIOL, W., et al. Biocontrole de Doenças de Plantas: Uso e Perspectivas. 1. São Paulo: Embrapa Meio Ambiente, 2009.
- FRANZ, B. R. Controle biológico de *Sclerotinia sclerotiorum* in vitro. 2025. Trabalho de Conclusão de Curso – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, Ibirubá, 2025.
- CARVALHO, R. C. P. Patogenicidade, transmissão de fungos associados a sementes de amendoim, caracterização morfológica e molecular de *Colletotrichum fructicola*. 2025. Dissertação (Pós-Graduação em Produção Vegetal) – Universidade Federal do Tocantins Câmpus Universitário de Gurupi Programa de Pós-Graduação, Gurupi, 2025.
- GERALDO, L. C. Prospecção de rizobactérias do gênero *Bacillus* e avaliação do potencial no controle de pragas agrícolas. 2023. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade de Brasília, Brasília, 2023.