

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**EFEITO DE PRODUTOS ALTERNATIVOS NO CONTROLE DE OÍDIO
E *Bacillus* spp. COMO PROMOTORES DE CRESCIMENTO DA SOJA**

REGIANE MEDICE

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas Unesp, Câmpus de Botucatu,
para obtenção do título de Doutor em
Agronomia - Proteção de Plantas.

BOTUCATU-SP
Agosto -2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**EFEITO DE PRODUTOS ALTERNATIVOS NO CONTROLE DE OÍDIO
E *Bacillus* spp. COMO PROMOTORES DE CRESCIMENTO DA SOJA**

REGIANE MEDICE

Orientador: Dr. Wagner Bettiol

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas Unesp, Câmpus de Botucatu,
para obtenção do título de Doutor em
Agronomia - Proteção de Plantas.

BOTUCATU-SP
Agosto -2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA
INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA
- LAGEADO - BOTUCATU (SP)

M489e Medice, Regiane 1976-
Efeitos de produtos alternativos no controle de oídio e
Bacillus spp. como promotores de crescimento da soja / Regiane
Medice.- Botucatu :[s.n.], 2012
xi, 90 f. : il., color., grafs., tabs.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista Fa-
culdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2012

Orientador: Wagner Bettiol

Inclui bibliografia

1. Oídio - Controle. 2. Soja. 3. Potássio na agricultu- ra. 4.
Bacillus spp. I. Bettiol, Wagner. II. Universidade Estadual
Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Bo-
tucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas. III. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "EFEITO DE PRODUTOS ALTERNATIVOS NO CONTROLE DE OÍDIO E
Bacillus spp. COMO PROMOTORES DE CRESCIMENTO DA SOJA"

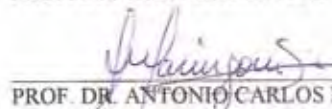
ALUNA: REGIANE MEDICE

ORIENTADOR: PROF. DR. WAGNER BETTIOL

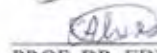
Aprovado Pela Comissão Examinadora



PROF. DR. WAGNER BETTIOL



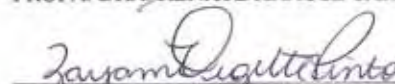
PROF. DR. ANTONIO CARLOS MARINGONI



PROF. DR. EDUARDO ALVES



PROFA. DRA. RENATE KRAUSE SAKATE



PROFA. DRA. ZAYAMÉ VEGETTE PINTO

Data da Realização: 03 de outubro de 2011.

BIOGRAFIA DO AUTOR

REGIANE MEDICE – Nascida em 02 de julho de 1976, em Tatuí, SP. Filha de Maria Leonora Medice. Ingressou no Curso de Engenharia Agrônômica da Universidade Federal de Lavras em julho de 1999 e graduando-se em dezembro de 2004. Em julho de 2005 iniciou o Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia, na Universidade Federal de Lavras, obtendo o título em julho de 2007. Em agosto de 2007 iniciou o doutorado no Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Proteção de Plantas), na Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, em Botucatu, SP, realizando Doutorado. Atualmente é professora titular das disciplinas de Fitopatologia Agrícola e Microbiologia e Biotecnologia pela Faculdade de Ciências Sociais e Agrárias de Itapeva- FAIT-SP.

À minha mãe, Maria Leonora Medice, pelo
amor e apoio em todas as etapas da minha vida.
Minha avó, Maria Stefani, pela confiança,
Ao meu avô Benedito Medice (*in memoriam*)
A todas as pessoas que confiaram em meu potencial.

OFEREÇO

A Deus e ao maior presente que Ele me concedeu,
minha filha Emanuelle Medice Lobato Une,

DEDICO

QUERER É PODER E CONSEGUIR!

Maria das Graças Meneghel
(XUXA)

AGRADECIMENTOS

A Deus que sempre me amparou em todos os momentos da minha vida.

À Faculdade de Ciências Agrárias- FCA/UNESP, pela oportunidade da concretização de mais um sonho.

Ao professor Dr. Wagner Bettiol, pela orientação, paciência e amizade. Sua confiança e perseverança foram essenciais para a realização do meu trabalho.

À CAPES, pela concessão da bolsa para a realização do trabalho.

À Embrapa Meio Ambiente pela infra-estrutura oferecida.

Ao professor Dr. Eduardo Alves pela colaboração neste trabalho.

À minha mãe e minha avó, por se preocuparem com minha saúde e bem-estar.

À minha filha Emanuelle que me incentivou e me deu forças para concluir mais esta etapa da minha vida.

À Maria Celina Lobato Une e Dauto Jaime Une, pelo carinho, apoio e incentivo.

Ao Rafael Lobato Une, pelo maior presente da minha vida: nossa filha.

À minha amiga Uli Quirino de Mello, pelos momentos de amizade, descontração, trabalho e dedicação para a realização desta pesquisa.

À minha amiga Reni Saath, pelo carinho e compreensão nos momentos em que a distância nos separou.

A uma pessoa muito especial e amiga, Marlene Naves, pela sua paciência, pelo entusiasmo, dedicação, amizade, atenção e carinho, enfim, pelo seu bom coração.

À minha amiga Carolina Pirajá Oliveira, pelo incentivo, amizade e carinho.

Aos meus colegas de trabalho, professores, funcionários e estagiários da Faculdade de Ciências Sociais e Agrárias de Itapeva, pelo apoio.

Aos técnicos do Laboratório de Microbiologia Ambiental, em especial a Rosely, Elke e Márcia e da área de campos experimentais da Embrapa, pelo coleguismo e auxílio.

A todos meus colegas de turma de doutorado e “estagiários” da Embrapa, que sempre estarão presentes em minhas recordações.

Ao professor e amigo Ednaldo Andrade, pela ajuda na parte estatística.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a minha formação e a conquista de mais um sonho, meu muito obrigada!

SUMÁRIO

1. RESUMO.....	1
2. SUMMARY.....	3
3. INTRODUÇÃO.....	5
4 REVISÃO DE LITERATURA.....	8
4.1. Oídio da soja.....	8
4.2. Sais inorgânicos no controle de fitopatógenos.....	10
4.3. Produtos naturais no controle de fitopatógenos.....	12
4.4. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas.....	13
4.5. Características do gênero <i>Bacillus</i>	16
CAPÍTULO I - EFEITO DE BICARBONATO DE POTÁSSIO SOBRE A SEVERIDADE DE <i>Erysiphe diffusa</i> EM PLANTAS DE SOJA; REDIGIDO SEGUNDO AS NORMAS DA TROPICAL PLANT PATHOLOGY.....	18
RESUMO.....	19
ABSTRACT.....	20
INTRODUÇÃO.....	21
MATERIAL E MÉTODOS.....	22
RESULTADO E DISCUSSÃO.....	24
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26
CAPÍTULO II - Efeito de óleos de grãos de café torrado e cru na redução do oídio (<i>Erysiphe diffusa</i>) da soja em casa de vegetação; redigido segundo as normas da Tropical Plant Pathology.....	35
RESUMO.....	36
ABSTRACT.....	37
INTRODUÇÃO.....	38
MATERIAL E MÉTODOS.....	39
Análise estatística.....	41

RESULTADO E DISCUSSÃO.....	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
CAPÍTULO III - Interação de bactérias promotoras de crescimento de plantas x rizóbios x soja; redigido segundo as normas da Tropical Plant Pathology.....	54
RESUMO.....	55
ABSTRACT.....	56
INTRODUÇÃO.....	57
MATERIAL E MÉTODOS.....	59
Efeito de <i>Bradyrhizobium elkanii</i> , associada com <i>Bacillus</i> , sobre o desenvolvimento de plantas de soja e nodulação em casa de vegetação.....	59
Efeito de <i>Bradyrhizobium elkanii</i> , associada com <i>Bacillus</i> , sobre o desenvolvimento de plantas de soja e nodulação em campo.....	61
Efeito de <i>Bradyrhizobium elkanii</i> , associada com <i>Bacillus</i> , sobre germinação de sementes de soja.....	62
RESULTADO E DISCUSSÃO.....	63
Efeito de <i>Bradyrhizobium elkanii</i> , associada com <i>Bacillus</i> , sobre o desenvolvimento de plantas de soja e nodulação em casa de vegetação.....	63
Efeito de <i>Bradyrhizobium elkanii</i> , associada com <i>Bacillus</i> , sobre o desenvolvimento de plantas de soja e nodulação em campo.....	67
Efeito de <i>Bradyrhizobium elkanii</i> , associada com <i>Bacillus</i> , sobre germinação de sementes de soja.....	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
5. CONCLUSÕES GERAIS.....	80
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1 (Capítulo 1). Efeito do bicarbonato de potássio (Kaligreen[®]) sobre a porcentagem de área foliar afetada por *Erysiphe diffusa* em plantas de soja mantidas em casa de vegetação.....31

CAPÍTULO II

Tabela 1. Efeito dos óleos de grãos de café torrado e cru sobre a porcentagem de área foliar lesionada por *Erysiphe diffusa* em plantas de soja sob condições controladas.....48

Tabela 2. Redução da severidade do oídio da soja em relação à testemunha (%) por óleos de café torrado e cru.....49

CAPÍTULO III

Tabela 1. Efeito da concentração de *Bacillus subtilis* (Bs e AP-3) e *Bacillus licheniformis* (Bl) sobre o número de nódulos (1^o experimento), dependente ou independentemente da presença de *Bradyrhizobium elkanii* (Be).....75

Tabela 2. Efeito da concentração de *Bacillus subtilis* (Bs e AP-3) e *Bacillus licheniformis* (Bl) sobre a área foliar (1^o experimento), dependente ou independentemente da presença de *Bradyrhizobium elkanii* (Be).....76

Tabela 3. Efeito da concentração de *Bacillus subtilis* (Bs e AP-3) e *Bacillus licheniformis* (Bl) sobre o peso seco da parte aérea (1^o experimento), dependente ou independentemente da presença de *Bradyrhizobium elkanii* (Be).....77

Tabela 4. Efeito de *Bacillus subtilis* (Bs) e *Bacillus licheniformis* (Bl), co-inoculados com *Bradyrhizobium elkanii*, sobre altura, área foliar, peso de grãos, número de plantas por metro linear, número e peso de nódulos de soja desenvolvida no campo.....78

Tabela 5. Efeito do tratamento de sementes de soja com *Bacillus subtilis* (AP-3), *Bacillus subtilis* (BS) e *Bacillus licheniformis* (BL) no desenvolvimento (cm) do hipocótilo e da radículas.....79

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Efeito do bicarbonato de potássio (Kaligreen®) nas concentrações de 0,25% (A), 0,5% (B), 0,75% (C) e 1% (D) no controle de *Erysiphe diffusa* na cultivar MG/BR 46 (Conquista) de soja.....32

Figura 2. Efeito do Kaligreen® sobre a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) causada pelo oídio (*Erysiphe diffusa*) em soja.....33

Figura 3. Eletromicrografias de varredura de folhas de soja infectadas com *Erysiphe diffusa*, mantidas em casa de vegetação, e tratadas com água (A e B) e com bicarbonato de potássio (Kaligreen®) nas concentrações de 0,25 (C); 0,50 (D); 0,75 (E) e 1% (F) (v/v).....34

CAPÍTULO II

Figura 1. Área abaixo da curva de progresso da doença causada por *Erysiphe diffusa* em plantas de soja cultivar Conquista tratadas com óleos oriundos de grãos de café torrado e cru. CT- café torrado; CC- café cru: Fungicida: piraclostrobina e epoxiconazole. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ($p > 0,05$) – Teste de Scott Knott.....50

Figura 2. Sintomas de oídio (*Erysiphe diffusa*) da soja em (A) folíolos de plantas que tratadas com óleos de grãos de café torrado (CT) e cru (CC), fungicida e testemunha. (B) Plantas que receberam apenas óleo de café cru (CC); (C) plantas que receberam tratamento com óleo de café torrado (CT).....51

Figura 3. Eletromicrografias de varredura em folíolos de soja infectados por *Erysiphe diffusa* e tratados com óleo fixo de café cru. Tratamentos constituídos por: água destilada (A), fungicida (B), óleo de café cru a 0,5% (C), 1% (D) e 2% (E).....52

Figura 4. Eletromicrografias de varredura em folíolos de soja infectados por *Erysiphe diffusa* e tratados com óleo fixo de café torrado. Tratamentos constituídos por: água destilada (A), fungicida (B), óleo de café torrado 0,5% (C), 1% (D) e 2% (E).....53

EFEITO DE PRODUTOS ALTERNATIVOS NO CONTROLE DE OÍDIO E *Bacillus* spp. COMO PROMOTORES DE CRESCIMENTO DA SOJA. Botucatu, 2012. 90f.

Tese (Doutorado em Agronomia/Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista

Autor: REGIANE MEDICE

Orientador: Wagner Bettiol

1.RESUMO

O presente trabalho teve por objetivos avaliar o produto comercial Kalegreen[®], à base de bicarbonato de potássio, e óleos fixos de café para o controle do oídio da soja; e *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformes*, em tratamento de sementes, como promotores de crescimento de plantas, associado ou não a *Bradyrhizobium elkanii*. Para avaliar a eficiência de bicarbonato de potássio (Kaligreen[®]) no controle do oídio da soja cultivar MGBR-46 (Conquista), as pulverizações do bicarbonato, nas concentrações de 0; 0,25%, 0,5%, 0,75% e 1,0%, e do fungicida (piraclostrobina e epoxiconazole) e as avaliações foram semanais. Folhas foram coletadas para análise ultraestrutural através da microscopia eletrônica de varredura. O bicarbonato de potássio controlou a doença em todas as concentrações, mas causou fitotoxicidade a partir de 0,5%. O produto apresentou ação direta sobre o patógeno ocasionando murchamento e redução na germinação dos conídios. O produto apresenta potencial para controlar a doença, porém deve ser adequada a concentração a ser recomendada, bem como a frequência de aplicação para evitar os problemas de fitotoxicidade. Nos estudos com óleos extraídos de grãos de café torrado e cru no controle do oídio da soja, as metodologias e os materiais foram semelhantes, sendo que os óleos foram pulverizados semanalmente nas concentrações de 0%, 0,5%, 1% e 2%. Os óleos controlaram a doença na faixa de 84,8% a 99,8%, sendo superior ao fungicida padrão. Nas observações em MEV, constatou-se a presença de uma camada protetora na superfície das folhas, impedindo a ação

do patógeno. Com isso, pode-se inferir que os produtos utilizados neste trabalho apresentam potencial para proteção de plantas de soja contra oídio. Os experimentos para avaliar o efeito de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*, quando co-inoculados com *Bradyrhizobium elkanii*, no desenvolvimento da planta e no estímulo à nodulação, foram conduzidos em laboratório, casa de vegetação e campo experimental na Embrapa Meio Ambiente utilizando soja CD 230. A maioria dos produtos biológicos, quando associados com a co-inoculação de *B. elkanii*, apresentou ação como promotores de crescimento em soja avaliados pelo número de nódulos, a área foliar e peso seco da parte aérea das plantas, destacando a mistura *Bacillus subtilis* + *Bacillus licheniformis* com maior potencial na promoção de crescimento.

Palavras-chaves: *Glycine max*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, oídio, bicarbonato de potássio, óleo de café.

EFFECT OF ALTERNATIVE PRODUCTS FOR THE CONTROL OF POWDERY MILDEW AND SOYBEAN GROWTH PROMOTION WITH *Bacillus* spp. Botucatu, 2012. 90f.

Tese (Doutorado em Agronomia/Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista

Author: REGIANE MEDICE

Adviser: Wagner Bettiol

2 SUMMARY

This study aimed to evaluate the commercial product Kalegreen ®, based on potassium bicarbonate, and fixed oils of coffee for the control of powdery mildew of soybeans, and *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformes* in seed treatment, as growth promoters in plants, with or without *Bradyrhizobium elkanii*. To evaluate the efficiency of potassium bicarbonate to control powdery mildew of soybean cultivar MGBR-46 (Conquest), the bicarbonate sprays, at concentrations of 0, 0.25%, 0.5%, 0.75% and 1.0%, and the fungicide (pyraclostrobin and epoxiconazole) and ratings were weekly. Leaves were collected for ultrastructural analysis by scanning electron microscopy. The potassium bicarbonate controlled the disease in all concentrations, but caused phytotoxicity from 0.5%. The product has a direct effect on the pathogen causing wilting and reduction in spore germination. The product has the potential to control the disease, but should be adequate concentration to be recommended, and the frequency of application to avoid phytotoxicity problems. With the same methodology we evaluate the potential of coffee oils to control soybean powdery mildew. The oils were weekly sprayed at concentrations of 0%, 0.5%, 1% and 2%. For four weeks we evaluated the severity of the disease in a pair of clover in the middle third of the plants, using diagrammatic scale of notes. Oils controlled the disease in the range of 84.8% to 99.8%, higher than the standard fungicide. In MEV observations, it was found the presence of a protective layer on the surface

of the leaves, preventing the action of the pathogen. We conclude that the products used in this study have potential for protection of soybean plants against powdery mildew. The bioassays to evaluate the effect of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*, when co-inoculated with *Bradyrhizobium elkanii* in plant development and to stimulate nodulation, were conducted in laboratory, greenhouse and field trials on the Embrapa Environment using soybean cultivar CD 230. Most biological products, when combined with the co-inoculation with *B. elkanii* presented action as growth promoters in soybean evaluated by the number of nodes, leaf area and shoot dry weight of plants, highlighting the mixture *B. subtilis* + *B. licheniformis* with greater potential in promoting growth.

Keywords: *Glycine max*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, powdery mildew, potassium bicarbonate, coffee oil.

3 INTRODUÇÃO

A soja é uma leguminosa domesticada pelos chineses há cerca de cinco mil anos. Seu ancestral mais antigo, a soja selvagem (*Glycine soja*), crescia principalmente nas terras baixas e úmidas, junto aos juncos, nas proximidades dos lagos e rios da China Central. Há três mil anos a soja se espalhou pela Ásia, onde começou a ser utilizada como alimento. Foi no início do século XX que passou a ser cultivada comercialmente nos Estados Unidos. A partir de então, houve um rápido crescimento na produção, com o desenvolvimento das primeiras cultivares comerciais (EMBRAPA, 2001).

A expansão da cultura aconteceu no Brasil apenas nos anos 70, em decorrência da sucessão do plantio do trigo, no Rio Grande do Sul, com o interesse crescente da indústria de óleo e a demanda do mercado internacional pelo produto. Seu cultivo se expandiu mundialmente, sendo hoje uma das principais plantas cultivadas pelo Brasil.

A estimativa da produção mundial de soja para a safra 2010/2011, feita pelo USDA (Departamento de Agricultura dos Estados Unidos), foi de 253,69 milhões de toneladas. Os Estados Unidos ocupam a primeira posição entre os países produtores, respondendo por 83,17 milhões de toneladas na safra 2010/2011 (NOTÍCIAS AGRÍCOLAS, 2011), enquanto o Brasil continua como o segundo maior produtor. Segundo a CONAB (2011), houve um crescimento de 2,6%, ou 611,0 mil hectares superiores a da safra 2009/10, quando foram cultivados 23,47 milhões de hectares, constituindo-se na maior área cultivada

com a oleaginosa. Esses valores superam o recorde da safra 2004/05, com 23,3 milhões de hectares. A produção nacional em 2011 alcançou o patamar de 72,3 milhões de toneladas de grãos.

Dentre os fatores que interferem no rendimento, lucratividade, sucesso da produção e que limitam a exploração máxima do potencial de produtividade da soja, as doenças apresentam-se como um dos componentes mais importantes, sendo conhecidas mais de 100 delas em todo o mundo (Hartman et al., 1999). Algumas passam despercebidas, mas outras atingem níveis de danos econômicos. Destas, aproximadamente 40 causadas por fungos, bactérias, nematoides ou vírus já foram identificadas no Brasil e esse número continua aumentando com a expansão da soja para novas áreas e como consequência da monocultura (Yorinori, 2002).

A importância econômica de cada doença varia de acordo com o ano e a região, dependendo da condição climática de cada safra. No Brasil, o valor das perdas anuais por doenças é relativamente alto, e tende a aumentar pelo microclima favorável proporcionado pelo sistema plantio direto (menor temperatura e aumento do teor de umidade no solo), facilitando a disseminação dos patógenos (BOKERT et al., 1994). Diante deste fator o produtor sente a necessidade de fazer uso de fungicidas, e muitas vezes de maneira equivocada, favorecendo o aparecimento de patógenos com resistência aos produtos..

Uma das alternativas pesquisadas para reduzir a aplicação dos fungicidas envolve o uso de produtos alternativos, tais como óleos essenciais e extratos vegetais, buscando explorar suas propriedades fungitóxicas. A literatura tem registrado a eficiência de extratos obtidos de diversas espécies botânicas em promover a inibição do desenvolvimento de vários fitopatógenos de natureza fúngica (WILSON et al., 1997; KURITA et al., 1981).

Trabalhos desenvolvidos com extrato bruto ou óleo essencial, obtidos de plantas e sais inorgânicos, têm indicado o potencial dos mesmos no controle de fitopatógenos, tanto por sua ação fungitóxica direta, inibindo o crescimento micelial e a germinação de esporos, quanto a proteção das mesmas por meio de barreiras protetoras formadas pela deposição destes produtos sobre as partes das plantas impedindo a penetração do patógeno.

Além disso, nos últimos anos, algumas estratégias como o controle biológico vêm se tornando uma importante alternativa no combate a diversos fitopatógenos associados a culturas de importância econômica (MENEZES, 2006), como por exemplo, o uso de bactérias associadas à rizosfera e as colonizadoras de raízes de plantas, que podem promover efeitos benéficos às plantas, impedindo assim que a planta se torne suscetível ao ataque de fitopatógenos. Portanto, torna-se necessário a realização de estudos para o desenvolvimento de novas estratégias de manejo de doenças. Uma dessas alternativas seria a utilização de óleos essenciais e agentes biopromotores de crescimento de plantas que tem mostrado resultados promissores no controle de doenças e proteção de plantas.

Para tanto, o presente trabalho teve por objetivos avaliar o produto comercial Kalegreen[®], à base de bicarbonato de potássio, e óleos fixos para o controle do oídio da soja; e *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformes*, em tratamento de sementes, como promotores de crescimento de plantas, associado ou não a *Bradyrhizobium elkanii*.

Essa tese foi redigida na forma de três capítulos independentes, sendo 1 - Efeito de bicarbonato de potássio sobre a severidade de *Erysiphe diffusa* em plantas de soja; 2 - Efeito de óleos de grãos de café torrado e cru na redução do oídio (*Erysiphe diffusa*) da soja em casa de vegetação; 3 - Interação de bactérias promotoras de crescimento de plantas x rizóbios x soja; redigidos segundo as normas da Tropical Plant Pathology. Entretanto, todos são focados na cultura da soja e em técnicas para reduzir o uso de agrotóxicos.

1 4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1. Oídio da soja

Inicialmente, o oídio da soja foi atribuído ao fungo *Erysiphe polygoni* Dc. ex. Merat, a *Microsphaera diffusa* Cook e Peck, porém, atualmente *Erysiphe diffusa* é considerado como principal causador do oídio nesta cultura (TAKAMATSU et al., 2002). Almeida et al. (2008), através de estudos da filogenia molecular e a microscopia eletrônica de varredura, propuseram combinar os gêneros *Erysiphe*, *Microsphaera* e *Uncinula* em um único gênero.

Entre as doenças da soja de maior importância destaca-se o oídio, doença causada por um fungo altamente evoluído considerado um patógeno obrigatório. Este tipo de fungo se situa entre os principais fitopatógenos, ocorrendo em todas as regiões do globo das espécies vegetais cultivadas. Embora raramente causem a morte da planta, eles exaurem as suas reservas nutricionais, que poderiam ser utilizadas para fins produtivos, além de diminuir drasticamente o potencial de reprodução das plantas, eles também podem afetar a qualidade do produto colhido (STADNIK et al., 2001).

A doença desenvolve-se em toda a parte aérea da soja, incluindo haste, pecíolo e vagem (raramente observada), porém, é mais visível em folhas e hastes (YORINONI, 1986; YORINONI et al., 1993). Na parte aérea da planta, é caracterizado pela

presença de uma fina camada de micélio e esporos (conídios) pulverulentos do fungo, que podem evoluir de pequenos pontos brancos para a cobertura total das partes infectadas, impedindo a fotossíntese e provocando queda prematura das folhas, nas quais, a coloração branca do fungo pode se alterar para castanho-acinzentada e, nas hastes, podendo ocorrer rachaduras e cicatrizes superficiais.

Embora, considerado de pouca importância há alguns anos (YORINONI, 1997), ultimamente vem aumentando em prevalência. A partir de 1996/1997, desde a região Sul até as regiões Sudeste e Centro Oeste do Brasil, foram relatados diversos surtos epidêmicos desta doença (REIS et al., 1997; SAWADA e AZEVEDO, 1997; MICHEL et al., 1998). Algumas vezes, nos casos de elevada colonização dos tecidos superficiais da planta por oídio, é possível ocorrer uma redução no rendimento da soja devido à redução da área fotossinteticamente ativa, conforme demonstrado por Blum et al. (2002).

A infecção pode ocorrer em qualquer estágio de desenvolvimento da planta, porém, é mais visível por ocasião do início da floração. Quanto mais cedo iniciar a infecção, maior será o efeito da doença sobre o rendimento. A infecção pode ocorrer entre as temperaturas de 18 °C a 30 °C, todavia, o desenvolvimento micelial é mais rápido à temperatura de 18 °C do que à de 24 °C ou 30 °C, conforme descreve Mignucci et al. (1977). Cada ciclo desta doença, sob condições favoráveis, dura cerca de sete a dez dias (PICININI e FERNANDES, 1998).

Seu primeiro relato foi nos Estados Unidos em 1947 (LEHMAN, 1947), desde então, neste país, perdas de até 35% de produtividade foram relatadas nos plantios com cultivares suscetíveis (PHILLIPS, 1984).

No Brasil, até a safra de 1995/96, o oídio era considerado doença de pequena expressão, observada com maior frequência em final de ciclo (abril-maio) de cultivares tardios de soja na Região Sul, em regiões altas do Cerrado ou em cultivos de inverno sob irrigação com pivô central para multiplicação de sementes na entressafra. No entanto, na safra 1996/97 ocorreu severa incidência da doença em várias cultivares, atingindo todas as regiões produtoras, desde os Cerrados até o Rio Grande do Sul, com perdas entre 30 a 40% da produção (GAZZONI e YORINORI, 1995). Por sua ocorrência repentina, atingiu, de forma epidêmica, todas as lavouras de cultivares suscetíveis nas principais regiões produtoras

de soja do Brasil, sendo constatados danos na ordem de 40%, equivalentes a 1,4 milhões de toneladas de grãos, segundo Sartorato e Yorinori (2001).

No Brasil, os fungicidas utilizados para o controle de oídios representam uma parcela considerável no mercado, por outro lado, a importância de métodos alternativos para o controle dessa doença tem aumentado significativamente frente às pressões para a utilização de produtos com menores riscos de contaminação do ambiente. Porém, a aplicação de fungicidas ainda consiste num dos principais métodos de controle de oídios, e nem sempre associado a outras medidas (STADNIK, et al., 2001).

Apesar de métodos alternativos serem utilizados há muito tempo, pesquisas nessa área são extremamente importantes e necessárias à medida que cresce a restrição ao controle químico devido aos potenciais problemas à saúde pública. Além disso, no caso de oídios, fungos que facilmente são selecionados isolados resistentes a fungicidas, os métodos alternativos podem ser utilizados visando minimizar esse problema (STADNIK, et al., 2001).

Em função destes fatores, a procura por produtos alternativos que sirvam como defensivos, e que ocasionem menos danos ao ambiente, sejam estes químicos, biológicos, orgânicos ou naturais, vem crescendo devido às seguintes características: baixa ou nenhuma agressividade ao homem e à natureza, eficiência no combate aos insetos e aos microrganismos nocivos, não favorecendo a ocorrência de formas de resistência em pragas e patógenos, custo reduzido para aquisição e emprego, simplicidade quanto ao manejo e aplicação e a alta disponibilidade para aquisição.

4.2. Sais inorgânicos no controle de fitopatógenos

O aumento da contaminação do ambiente pelos pesticidas utilizados na agricultura causa problemas, como redução da biodiversidade, alterações na ciclagem de matéria orgânica e dos nutrientes, no controle biológico natural de doenças e de pragas, nas atividades microbianas no solo, na seleção de organismos resistentes aos pesticidas e alterações das populações de organismos do solo e água, entre outros. Assim, é necessária a

busca por métodos alternativos para a proteção de plantas sem o uso de pesticidas (BETTIOL et al., 1997; BETTIOL et al., 2005).

Segundo Venzon & Pallini (2005), o uso do controle direto de patógenos pela ação de produtos de origem natural, de baixo impacto ambiental e inócuos ao homem e animais, está aumentando, principalmente em hortaliças e frutíferas. Produtos alimentares e aditivos de alimentos tais como, lecitina de soja, glutamatos, bicarbonato de sódio, ácido tartárico, ácido fumárico, ácido sórbico, polifosfato de sódio, éster de açúcar e leite entre outros, vêm sendo pesquisados como alternativa viável para o controle de doenças de plantas, com resultados eficazes (MEDEIROS, 2006; SANTOS & BETTIOL, 2008; BIZI, 2006; CARNEIRO, 2003; BETTIOL & ASTIARRAGA, 1998).

Bettiol (2006) relata que o bicarbonato, por ser um produto utilizado na indústria alimentícia, não apresenta problemas de contaminação. Além de apresentar baixo custo, pode ser utilizado sem restrições, por apresentar um amplo espectro de atividade antifúngica (MIYASAKI et al., 1986).

Alguns autores (HORST et al., 1992; ZIV & ZITTER, 1992; ZIV & HAGILADI, 1993; PEREIRA et al., 1995; REUVENI et al., 1996), utilizando bicarbonato de sódio, em doses de 0,15 a 2% (p/v), verificaram a eficiência no controle de oídios em algumas culturas. Krugner e Auer (2005) observaram que a solução de bicarbonato de sódio pode ser empregada como produto alternativo para controlar oídio em eucalipto.

Em estudos realizados por Kimura et al. (1997) foram verificados altos índices de controle do oídio (*Erysiphe cichoracearum*) em pimentão (*Capsicum annum* L.) com o uso deste produto mais espalhante. Já Blat et al. (2005), demonstraram que fosfato monopotássico, quando aplicado em ambiente protegido, foi eficiente no controle do oídio da pimenta. Bettiol et al. (1999) relatam que pulverizações de leite de vaca cru controlou eficientemente o oídio da abobrinha e do pepino. Oliveira et al. (2002) concluíram em seus ensaios que o leite de vaca *in natura* e o bicarbonato de sódio são substâncias com potencial para o controle de oídio em moranga-híbrida.

O bicarbonato pode inibir a germinação de conídios, reduzir o número de conídios formados nos conidióforos, causar ruptura da parede celular dos conídios e anomalias morfológicas nos mesmos, inibir a formação de conidióforos, e controlar a

elongação das hifas de *Sphaerotheca fuliginea* (Schlecht ex. Fr.) Poll, quando aplicado a 2.000 ppm. Agindo por esses diferentes mecanismos, vem sendo demonstrado que o bicarbonato é efetivo no controle do oídio do pepino e da abobrinha (BETTIOL, GHINI e MORANDI, 2005).

4.3. Produtos naturais no controle de fitopatógenos

A partir da última década, a conscientização sobre o uso indiscriminado e incorreto de defensivos agrícolas no ambiente rural e urbano, causando prejuízos aos ecossistemas e ao homem, tem motivado o desenvolvimento de métodos e produtos alternativos no controle de doenças de plantas (FERNANDES, 2000).

Alguns trabalhos demonstram que extratos e óleos extraídos de plantas têm apresentado resultados significativos na redução da severidade de doenças. Alguns autores corroboram que os óleos essenciais, por apresentarem uma grande aplicação biológica como agentes antimicrobianos, acabam defendendo as plantas de bactérias e fungos fitopatogênicos. Assim, muitos destes utilizam diversos destes produtos no controle alternativo de doenças em plantas (SCHWAN-ESTRADA, STANGARLIN e CRUZ, 2000; SILVA et al., 2005). Resultados promissores com o uso de óleos essenciais no controle da ferrugem da soja foram obtidos por Medice (2007), a qual verificou a inibição da germinação e murchamento de esporos de *Phakopsora pachyrhizi* quando submetidos aos tratamentos com óleos essenciais de citronela, tomilho, melaleuca, nim e eucalipto citriodora.

Resultados obtidos por Zambonelli et al. (1996), ao testarem o efeito de óleo essencial de tomilho, também demonstraram degeneração de hifas e o extravasamento celular de *Colletotrichum lindemuthianum* e *Pythium ultimum*. De forma análoga, Medice et al. (2005), ao utilizarem a MEV no estudo dos óleos essenciais aplicados a folíolos de soja infectados por *P. pachyrhizi*, também evidenciaram a murcha de urediniósporos. Pereira et al. (2008), ao estudarem o efeito da aplicação de óleo essencial de tomilho e extrato de casca de café sobre *Cercospora coffeicola* em folhas de cafeeiro, observaram redução na germinação de conídios, 48 horas após a inoculação. Pierre et al. (2008) comprovaram que o extrato de cravo

a 10% apresentou efeito fungicida inibindo em 100% o crescimento micelial de *C. gloeosporioides* isolado de frutos de goiaba.

O potencial do óleo essencial de pimenta-de-macaco (*Piper aduncum*) no tratamento de sementes de feijão caupi (*Vigna unguiculata*), pela técnica da imersão por cinco minutos, foi estudado por Lobato et al. (2007) os quais verificaram redução da incidência de *Aspergillus flavus*, *Penicillium* spp., *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani* e *Fusarium* spp. Não houve interferência na germinação das sementes, mesmo na maior concentração (1,0%).

De acordo com Celoto et al. (2008), a diversidade dessas substâncias poderia possibilitar a utilização direta pelo produtor, por meio do cultivo da planta possuidora dos compostos secundários, preparo e aplicação direta do extrato nas culturas comerciais. Dessa forma, os extratos e óleos essenciais extraído de plantas demonstram alto potencial no controle de patógenos.

4.4. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas

As rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCPs) habitam o solo e com frequência são isoladas da rizosfera de diversas plantas cultivadas, podendo ser consideradas como agentes potenciais para controle biológico de fitopatógenos (KLOEPPER, 1999). Segundo Silveira (2008), as bactérias que beneficiam as plantas são de dois tipos: as que estabelecem uma relação simbiótica com a planta hospedeira e as que vivem livremente no solo, mas que frequentemente são encontradas perto ou até mesmo dentro das raízes das plantas. Os simbios, especialmente rizóbios, têm sido extensivamente estudados e desenvolvidos como alternativa para aumentar a produção das lavouras.

As bactérias benéficas de vida livre no solo são geralmente chamadas de rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (plant growth promoting rhizobacteria ou PGPR), ou, como definido por um grupo de pesquisadores da China, bactérias que aumentam a produção (yield increasing bacteria ou YIB) (PIAO et al., 1992). Porém, para Gray e Smith (2005), PGPRs também incluem os rizóbios, devido a bem caracterizada

simbiose legumerizóbio. Independentemente dos mecanismos de promoção do crescimento vegetal, as PGPRs têm que colonizar a rizosfera em volta das raízes, o rizoplano ou a raiz.

As pesquisas RPCPs inicialmente focaram *Bacillus* e *Anthrobacter* spp. (BROWN, 1974). Aplicações destas associações foram investigadas em milho, trigo, aveia, cevada, ervilha, canola, soja, batata, tomate, lentilha, radite e pepino (GRAY e SMITH, 2005). Entre os *Bacillus* mais estudados como RPCPs estão *Bacillus cereus* (HANDELSMAN et al., 1990; RYDER et al., 1999), *Bacillus firmus*, *Bacillus licheniformis* (CHEN et al., 1996), *Bacillus subtilis* (TURNER e BLACKMAN, 1991; ZHANG e SMITH, 1996) e *Bacillus thuringiensis* (BAI et al., 2002a,b).

A promoção de crescimento de plantas pela diminuição da incidência de doenças pode ocorrer pela inibição direta do crescimento do patógeno (OWEN e ZDOR, 2001) e pela indução de resistência sistêmica (FRIDLENDER et al., 1993; NANDAKUMAR et al., 2001), entre outras maneiras. Entre os melhores exemplos de utilização de rizobactérias utilizadas para biocontrole estão *Agrobacterium radiobacter*, para o controle da galha causada por *Agrobacterium tumefaciens*, *Bacillus subtilis* para o controle de tombamento de plântulas e *Pseudomonas fluorescens* para o controle de *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Pythium* e *Rhizoctonia solani*. Segundo Anter et al. (1995), os dois últimos antagonistas também promovem o crescimento e a produtividade das plantas por produzirem hormônios de crescimento vegetal.

A associação de plantas com rizobactérias benéficas vem adquirindo importância crescente por ter efeitos na promoção de crescimento e no biocontrole de doenças radiculares e foliares, reduzindo custos de produção e diminuindo o impacto dos agrotóxicos no ambiente (ROMEIRO & BATISTA, 2002). Em sistemas sustentáveis, o uso de rizobactérias promotoras de crescimento pode ser uma das alternativas tecnológicas viáveis para aumentar a produção, sendo implementada pela microbiolização de sementes com microrganismos. Portanto, a utilização de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas traz benefícios diretos para a produção agrícola e, ao mesmo tempo, uma alternativa de cultivo com menor uso de insumos agrícolas (SCHROTH et al., 1982; LAVIE e STOTZKY, 1986).

Os benefícios das RPCPs podem ser observados nas mais variadas espécies vegetais como grão de bico e berinjela (KUMAR, 1998), alfafa (OLSEN e

MISAGHI, 1981), beterraba (THRANE et al., 2000), rabanete (LEEMAN et al., 1995), sorgo (CHIARINI et al., 1998), batata e alface (BAKKER et al., 1986; GASONI et al., 2001; FREITAS et al., 2003); tomate (FREITAS e PIZZINATTO, 1991; HOFFAMANN-HERGARTEN, 1998) e várias plantas ornamentais (YUEN e SCHROTH, 1986).

Em relação ao mecanismo de promoção de crescimento vegetal por bactérias pode-se considerar que é um processo complexo que pode ser influenciado por diversos fatores abióticos (temperatura, pH, radiação, umidade, íons e elementos minerais e orgânicos do solo) e bióticos (características do hospedeiro, presença de patógenos e outros microrganismos associados à planta) (SILVEIRA, 2001; BLOEMBERG & LUGTENBERG, 2001; ARAÚJO et al., 2002). Segundo Araújo et al. (2005), um dos mecanismos fundamentais de ação das rizobactérias no controle de fitopatógenos ocorre pela produção de compostos antibióticos, que atuam na supressão desses parasitas na rizosfera.

Como exemplos dos efeitos de BPCPs na produção podem ser citados: aumentos de até 48% na produção de cenoura e de até 37% na produção e nodulação do amendoim com a inoculação de *Bacillus subtilis* (MERRIMAM et al., 1974; TURNER; BACKMAN, 1991). Li e Alexander (1988) conseguiram incrementar a colonização e a nodulação de soja, através da co-inoculação de *Bradyrhizobium japonicum* com bactérias do gênero *Bacillus*, produtoras de antibióticos. Outros relatos demonstram efeitos positivos na nodulação pela co-inoculação de rizóbio com outras espécies de bactérias (STAMFORD et al., 2003; SILVA et al., 2006, 2007; FIGUEIREDO et al., 2007).

Segundo Van Loon et al. (1998), alguns microrganismos podem atuar indiretamente sobre patógenos, ou seja, ativando mecanismos latentes de defesa em plantas. O tratamento de plantas com componentes ou produtos microbianos pode atuar, na indução desses mecanismos latentes de resistência de plantas. Em contrapartida Kuc (2001), descreve que o controle propriamente dito, não é devido à ação direta de fatores antimicrobianos, mas sim, na capacidade do indutor em sensibilizar a planta, e esta ser capaz de ativar mecanismos de defesa estruturais e bioquímicos latentes em resposta ao ataque de um patógeno potencial.

Diante dos pontos positivos apresentados, a utilização de BPCPs em cultivos agrícolas pode trazer ganhos adicionais ao desenvolvimento das plantas. Entretanto, a utilização desses microrganismos nem sempre apresenta bons resultados, sendo que um dos

obstáculos para sua utilização comercial é que os isolados têm dificuldades de se estabelecerem e sobreviverem em condições de campo (ATKINSON; WATSON, 2000). Foram encontrados alguns casos de inconsistência nos resultados. Por exemplo: o isolado Ps 91, do grupo fluorescente do gênero *Pseudomonas*, foi utilizado em experimentos com plantas de alface (FREITAS et al., 2003). No experimento em areia esterilizada, mostrou-se patogênico, matando todas as plantas. Entretanto, em outro experimento em solo com adição de esterco, o mesmo isolado comportou-se como promotor de crescimento (SOTTERO, 2003). Essa inconsistência é a principal limitação para o emprego comercial dessas bactérias. Um fator que poderia explicar esses resultados seria a baixa colonização das raízes pelas bactérias, talvez pela liberação diferenciada de exsudatos radiculares, que varia com a espécie da planta, com os fatores ambientais ou até mesmo pela competição com algum outro microrganismo.

4.5. Características do gênero *Bacillus*

Há mais de 191 espécies e quatro subespécies descritas no gênero *Bacillus* das quais muitas possuem características semelhantes ao *Bacillus anthracis* (MELO, 1998). Entretanto, a maioria das espécies não é patogênica a seres humanos e plantas. A maioria das espécies do gênero *Bacillus* é saprófita, estando amplamente distribuídas no ar, solo e água (BOER; DIDERICHSEN, 1991). As características principais do gênero *Bacillus* são: gram positivos, células com a forma de bastonetes retos, aos pares ou cadeias com extremidades arredondadas ou em ângulo reto; são móveis por meio de flagelos peritríquios, formam endósporos ovais ou, algumas vezes, redondos ou cilíndricos, sendo muito resistentes às condições adversas, tais como calor e baixos níveis de umidade; são aeróbios ou aeróbios facultativos e a maioria das espécies encontradas é saprófita (MELO, 1998).

A maioria dos trabalhos desenvolvidos com a utilização de *B. subtilis* está relacionada ao controle biológico de fitopatógenos na rizosfera o qual tem sido atribuído, com frequência, à produção de antibiótico (GUERREIRO, 2008). Contudo, esta espécie bacteriana, também classificada como rizobactéria promotora de crescimento de plantas, pode suprimir as doenças por outros modos de ação como: competição por espaço, nutrientes e indução de resistência sistêmica em plantas (KLOEPPER, 1999). As perspectivas do uso de

espécies do gênero *Bacillus* como promotoras de crescimento da rizosfera, trabalhos com inoculação de sementes de diversas culturas, vem ganhando uma maior importância (LIU & SINCLAIR, 1990; TURNER & BACKMAN, 1991).

Dentro desta linha, alguns estudos visam identificar qual é o mecanismo de ação, ao nível da rizosfera que proporciona um melhor desenvolvimento das plantas. Alguns trabalhos buscam, dentro deste contexto, identificar como *B. subtilis* ou seus metabólitos interagem com a flora ou sistema radicular em nível de solo (CHANWAY & NELSON, 1990; MAHAFFEE & BACKMAN, 1993).

CAPÍTULO I

EFEITO DE BICARBONATO DE POTÁSSIO SOBRE A SEVERIDADE DE

Erysiphe diffusa EM PLANTAS DE SOJA

1 **Efeito de bicarbonato de potássio sobre a severidade de *Erysiphe***
2 ***diffusa* em plantas de soja**

3 Regiane Medice¹ & Wagner Bettiol²

4 ¹Departamento de Produção Vegetal, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita
5 Filho”, CP 237, Botucatu, SP. ²Embrapa Meio Ambiente CP 69, 13820-000 Jaguariúna SP. E-
6 mail: regiane76br@yahoo.com.br

7

8 **RESUMO**

9 O oídio da soja, causado por *Erysiphe diffusa*, é considerado uma doença esporádica podendo
10 ocasionar perdas quando atinge proporções epidêmicas. O trabalho teve por objetivo avaliar a
11 eficiência de bicarbonato de potássio (Kaligreen[®]) no controle do oídio da soja. As
12 pulverizações do bicarbonato de potássio nas concentrações de 0; 0,25%, 0,5%, 0,75% e 1,0%
13 e do fungicida (piraclostrobina e epoxiconazole) e as avaliações foram semanais. Folhas foram
14 coletadas para análise ultraestrutural através da microscopia eletrônica de varredura. O
15 bicarbonato de potássio controlou a doença em todas as concentrações, mas causou
16 fitotoxicidade a partir de 0,5%. Na análise ultraestrutural pode-se observar que o produto
17 apresentou ação direta sobre o patógeno ocasionando murchamento e redução na germinação
18 dos conídios. O produto apresenta potencial para controlar a doença, porém deve ser adequada
19 a concentração a ser recomenda, bem como a frequência de aplicação para evitar os problemas
20 de fitotoxicidade.

21 **Palavras-chave: bicarbonato, produtos biocompatíveis, doenças da soja, oídio.**

22 **ABSTRACT**23 **Effect of potassium bicarbonate on the control of powdery mildew in soybean**

24 The soybean powdery mildew, caused by *Erysiphe diffusa*, is considered a sporadic disease
25 can cause losses when it reaches epidemic proportions. The study aimed to evaluate the
26 efficiency of potassium bicarbonate (Kaligreen ®) to control of soybean powdery mildew.
27 Sprays of potassium bicarbonate at concentrations of 0, 0.25%, 0.5%, 0.75% and 1.0% and the
28 fungicide (pyraclostrobin and epoxiconazole) and assessments were weekly. Leaves were
29 collected for ultrastructural analysis by scanning electron microscopy. The potassium
30 bicarbonate controlled the disease in all concentrations, but caused phytotoxicity from 0.5%.
31 In ultrastructural analysis can be observed that the product has a direct effect on the pathogen
32 causing wilting and reduction in spore germination. The product has the potential to control
33 the disease, but should be adequate concentration to be recommended, and the frequency of
34 application to avoid phytotoxicity problems.

35 **Key words: bicarbonate, biocompatible products, soybean disease, powdery mildew,**
36 ***Erysiphe diffusa*.**

37

38 INTRODUÇÃO

39 Na cultura da soja, aproximadamente, 50 doenças causadas por fungos, bactérias,
40 nematóides e vírus foram identificadas no Brasil (Yorinori, 2002) e mais de 100 doenças
41 foram listadas mundialmente (Sinclair & Backman, 1989). Dentre as doenças, o oídio, causado
42 por *Erysiphe diffusa*, requer, em algumas condições, a utilização de fungicidas para garantir a
43 produção, caso contrário as perdas podem atingir até 40% (Embrapa, 2003).

44 Dentre os principais produtos alternativos testados, alguns são compostos de um ou
45 vários sais de potássio, fosfato, sódio, silício, cálcio, argila e materiais anti-transpirantes (Ziv
46 & Zitter, 1992; Reuveni et al., 1995; Garibaldi et al., 1994; Marco et al., 1994), biofertilizantes
47 (Bettiol, 1996; Bettiol et al., 1998; Ishida et al., 2001), extratos de planta (Pasini et al., 1997;
48 Stadnik et al.; 2003), óleos vegetais e sintéticos (Pasini et al., 1997) e leite e soro de leite
49 (Bettiol et al., 1999; Bettiol et al., 2008). A combinação de mais de um método alternativo
50 pode ter efeito aditivo ou sinérgico como foi observado por Ziv & Zitter (1992). Um dos
51 produtos biocompatíveis para o controle de alguns oídios é o uso de alguns tipos de
52 bicarbonato. O bicarbonato de sódio foi eficiente no controle de oídios (Homma et al., 1981,
53 Horst et al., 1992; Ziv & Zitter, 1992; Ziv & Hagiladi, 1993; Pereira et al., 1995; Reuveni et
54 al., 1996). Também o bicarbonato de potássio é recomendado para o controle de oídio, tendo
55 um produto registrado em diversas partes do mundo, inclusive no Brasil, denominado de
56 Kaligreen®.

57 Alternativas de controle e manejo da doença com produtos menos agressivos ao
58 ambiente ou inócuos ao homem tornam-se relevantes, havendo a necessidade de buscar
59 alternativas de baixo custo e que sejam eficientes no controle da doença. Assim, esse trabalho

60 teve como objetivo avaliar a eficiência do bicarbonato de potássio, princípio ativo do produto
61 Kaligreen[®], para o controle do oídio da soja.

62

63 MATERIAL E MÉTODOS

64 O ensaio foi conduzido em casa de vegetação do campo experimental da Embrapa
65 Meio Ambiente, localizado em Jaguariúna-SP, no período de agosto a dezembro de 2008. No
66 experimento foi utilizada a cultivar MGBR-46, denominada Conquista, por ser susceptível ao
67 oídio. Em vasos plásticos de 5 litros de volume, contendo uma mistura de latossolo vermelho e
68 substrato de casca de pinus (80%:20%, respectivamente), foram semeadas quatro sementes
69 deixando-se desenvolver duas plantas por vaso. O delineamento experimental constou com
70 seis tratamentos e cinco repetições, totalizando 30 vasos. Estes foram dispostos em blocos
71 casualizados. As plantas foram mantidas em casa de vegetação e no 30º dia, quando as plantas
72 apresentavam-se no estágio V4, foi realizada a primeira aplicação dos produtos.

73 Os tratamentos analisados consistiram das concentrações de 0; 0,25; 0,50; 0,75 e 1%
74 (p/v) de bicarbonato de potássio, princípio ativo do produto Kaligreen[®], e um fungicida
75 (piraclostrobina e epoxiconazole) na dosagem recomendada. Os produtos foram devidamente
76 pesados e diluídos em água, conforme a recomendação técnica do fabricante, e, em seguida,
77 pulverizados. As pulverizações ocorreram semanalmente com o auxílio de uma pistola de
78 pintura acoplada a um compressor de ar, a uma pressão de 10 lb pol⁻² (Toagosei Chemical
79 Industry Co. Ltd. Japão), sendo realizadas ao final da tarde, quando a temperatura se
80 encontrava em torno de 25 °C. Durante o período de condução do experimento foi observada a

81 incidência de mosca branca e tripes e uma pequena incidência de ferrugem asiática, mas que
82 não comprometeram o desenvolvimento do estudo.

83 A inoculação do patógeno foi realizada transferindo plantas de soja infectadas com
84 oídio para a casa de vegetação onde o ensaio estava sendo conduzido, para que ocorresse a
85 inoculação por meio da dispersão natural das plantas infectadas para as sadias. As avaliações
86 da severidade da doença foram realizadas semanalmente, antes das pulverizações, sempre no
87 período da manhã, utilizando uma escala diagramática proposta por Stadnik et al. (2001). Para
88 tanto, foram avaliadas as folhas centrais do terço médio das plantas.

89 Além da avaliação da severidade foi realizado estudo em microscópio eletrônico de
90 varredura (MEV) para verificar os possíveis mecanismos de ação do bicarbonato de potássio.
91 Foram coletadas cinco folhas de cada amostra, retirados fragmentos com 0,5 X 0,5 cm que
92 foram imersos em solução fixadora (Karnovisk's modificado), pH 7,2 e armazenado em freezer
93 a -10 °C até ser levado para a realização da observação das amostras em microscópio eletrônico
94 de varredura no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultra-estrutural (LME) do
95 Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras - MG.
96 Após o período de fixação o material foi imerso em solução de cacodilato por três vezes por um
97 tempo de 10 minutos em cada imersão, e após este processo foram transferidas para uma
98 solução de tetróxido de ósmio 1% em água por 1 hora e subsequentemente desidratadas em
99 uma série de acetona (25, 50, 75, 90 e 100% por três vezes) e depois levadas para o aparelho de
100 ponto crítico. Os espécimes obtidos foram montados em suportes de alumínio ("stubs") com a
101 ajuda de uma fita de carbono dupla face colocada sobre uma película de papel alumínio,
102 cobertos com ouro e observados em microscópio eletrônico de varredura LEO EVO 40XVP.

103 A análise estatística do experimento foi realizada com base nas médias dadas em cada
104 tratamento por avaliação. Com a média das cinco avaliações foi calculada a área abaixo da
105 curva de progresso da doença (AACPD). Esses dados foram submetidos ao teste de Scott-
106 Knott, realizado no programa Sisvar[®] (Ferreira, 2000), para a comparação de efetividade entre
107 os tratamentos.

108

109 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

110 O bicarbonato de potássio, princípio ativo do produto Kaligreen[®], foi eficiente em
111 todas as concentrações, destacando-se as de 0,75 e 1,0% do princípio ativo no controle do
112 oídio da soja em casa de vegetação (Tabela 1, Figuras 1 e 2). Ao longo do ciclo da cultura foi
113 observado que a intensidade da doença diminuiu gradativamente (Tabela 1). Entretanto, as
114 plantas que receberam 0,5; 0,75 e 1% do produto apresentaram fitotoxidez (Figura 2).

115 Tamm et al. (2006), utilizando 0,5% (v/v) de bicarbonato de potássio no controle da
116 sarna da macieira, observaram que houve redução da doença. Entretanto, quando utilizaram a
117 dosagem de 1% (v/v) do produto também verificaram a ocorrência de fitotoxidez. Todavia em
118 trabalhos envolvendo outros patossistemas, o bicarbonato não causou fitotoxicidade,
119 mostrando-se eficaz na redução de doenças em plantas. Oliveira et al. (2002) concluíram que a
120 aplicação de leite de vaca *in natura* na concentração de 5.000 mL/hL e 10.000 mL/hL e o
121 bicarbonato de sódio na concentração de 400 g/hL foram eficientes no controle do oídio em
122 moranga, sendo que a severidade da doença permaneceu baixa durante o ciclo da cultura.

123 Santos (2009) verificou que as concentrações de 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1,5 e 3,0% (p/v) do
124 produto Kaligreen[®] reduziram o oídio causado por *Podosphaera fusca* em abobrinha. As

125 melhores concentrações foram de 1,5 e 0,8%, que controlaram a doença em 87,4% e 85,1%,
126 respectivamente, quando comparado à testemunha, sendo tão eficientes quanto o fungicida
127 padrão utilizado, que apresentou 81% de controle da doença. Entretanto, quando se empregou
128 a concentração de 3% (v/v), as plantas de abobrinha apresentaram fitotoxidez. O mesmo autor,
129 utilizando sal puro de bicarbonato de potássio (KHCO_3), nas concentrações de 1% e 2%,
130 relatou que o sal apresentou controle da doença de 42,8% e 30,5%, respectivamente.
131 Entretanto, quando se empregou a concentração de 0,5% do sal, não houve controle da doença.
132 Esses resultados estão de acordo com os obtidos no presente estudo. Lahoz et al. (2001)
133 também verificaram redução da severidade de oídio (*Erysiphe orontii*) em tabaco com o uso
134 de bicarbonato de sódio na dosagem de 1000 g/100 L, mas não com 500 g/100 L. Silicato de
135 potássio líquido pulverizado sobre plantas de morango controlou o oídio. Essa informação é
136 importante, pois demonstra que esse sal combinado com outra substância pode apresentar um
137 resultado satisfatório como o observado por Kanto et al. (2006).

138 Os resultados obtidos com os bicarbonatos indicam que apresentam potencial para
139 controlar oídios. Entretanto, mesmo utilizando dosagens reduzidas, pode ocorrer problemas de
140 fitotoxicidade. Mesmo diante do problema da fitotoxicidade, os carbonatos e bicarbonatos tem
141 se mostrado eficazes contra várias doenças, como por exemplo, os observados por Anon
142 (1999) que verificou que os carbonatos foram eficazes no controle do mofo cinzento da
143 videira, reduzindo a germinação dos esporos de *Botrytis cinerea*, enquanto que, o bicarbonato
144 de sódio e bicarbonato de amônio foram mais eficazes que o bicarbonato de potássio na
145 redução da doença. Assim, é importante realizar estudos determinando as concentrações
146 adequadas e a frequência de aplicação desses produtos que controlem a doença sem causar

147 problemas de fitotoxicidade. Deve-se também considerar que os estudos foram realizados em
148 cultivo protegido, sendo que nessas condições os problemas de fitotoxicidade são assentados.
149 Assim, os estudos devem ser repetidos em condição de campo.

150 Nas observações realizadas em microscopia eletrônica de varredura, verificou-se que
151 nas folhas provenientes das plantas testemunhas (Figura 3A e 3B) os conídios germinaram
152 normalmente, enquanto que o bicarbonato de potássio, nas diversas concentrações, apresentou
153 efeito direto sobre o patógeno, ocasionando murchamento dos conídios (Figuras 3C, 3D e 3E).
154 Todavia, verificou-se que na concentração a 1% de bicarbonato de potássio (Figura 3F) houve
155 redução na formação de conídios, observando, nas folhas dessas plantas, diminuição na
156 esporulação e ausência de germinação quando comparados à testemunha (Figura 3A e 3B).
157 Esses resultados indicam que o possível modo de ação do bicarbonato seja na inibição direta
158 do patógeno.

159 Diante dos resultados deste trabalho, o que se conclui é que o bicarbonato de potássio é
160 eficiente no controle de oídio em soja. Entretanto, futuras pesquisas deverão ser realizadas no
161 intuito de adequar dosagens e frequência de aplicação para que não causem fitotoxicidade e
162 controlem adequadamente a doença.

163

164 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

165 Anonimo (1999). Baking soda and gray mold. Conference notes: ESA and APS joint meeting.
166 IPM Practitioner. April. p. 10–11.

- 167 Bettiol W (1996) Productos alternativos para el control del oídio (*Sphaerotheca fuliginea*) de
168 la calabaza. In: CONGRESSO NACIONAL DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE
169 FITOPATOLOGIA, 8., 1996, Córdoba. Anais... Córdoba p.232.
- 170 Bettiol W, Silva SHA, Ronielli RC (2008) Effectiveness of whey against zucchini squash and
171 cucumber powdery mildew. Scientia Horticulturae 117:82-84.
- 172 Bettiol W, Astiarraga BD (1998) Controle de *Sphaerotheca fuliginea* em abobrinha com
173 resíduo da fermentação glutâmica do melão e produto lácteo fermentado. Fitopatologia
174 Brasileira, 22:431-435.
- 175 Bettiol W, Astiarraga BD, Luiz AJB (1999) Effectiveness of cow's milk against zucchini
176 squash powdery mildew (*Sphaerotheca fuliginea*) in greenhouse conditions. Crop Protection
177 18:489-492.
- 178 CONAB (2010) Disponível no site: <http://www.conab.gov.br>. Acesso em outubro de 2010.
- 179 Embrapa (2003) Disponível no site:
180 <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Soja/SojaCentralBrasil2003/doenc>
181 [a.htm](#). Acesso em outubro de 2010.
- 182 Ferradino FJ, Smith VL (2007) The effect of milk-based foliar sprays on yield components of
183 field pumpkins with powdery mildew. Crop Protection 26:657-663.

- 184 Ferreira DF (2000) Análise estatística por meio do SISVAR para Windows versão 4.0. In:
185 Reunião anual da região brasileira da sociedade internacional de biometria, 45, 2000, São
186 Carlos. Programas e Resumos... São Carlos, SP: UFSCar. p.235.
- 187 Garibaldi A, Aloii A, Minuto A (1994) Osservazioni sull'attività di prodotti fosfatici nei
188 riguardi di *Erysiphe* sp. su pomodoro in coltura protetta. ATTI Giornale Fitopatologiche
189 3:245-250.
- 190 Homma Y, Arimoto Y, Misato T (1981) Effect of sodium bicarbonate on each growth stage
191 cucumber powdery mildew fungus (*Sphaerotheca fuliginea*) in its life cycle. Journal of
192 Pesticide Science 6:201-209.
- 193 Horst RK, Kawamoto SO, Porter LL (1992) Effect of sodium bicarbonate and oils on the
194 control of powdery mildew and black spot of roses. Plant Disease 76:247-251.
- 195 Kanto T, Miyoshi A, Ogawa T, Maekawa K, Aino M (2006) Suppressive effect of liquid
196 potassium silicate on powdery mildew of strawberry in soil. Journal General Plant Pathology
197 72:137-142.
- 198 Lahoz E, Contillo R, Porrone F, Avigliano M, Iovieno P (2001) Efficacy of rue extract,
199 sodium bicarbonate and fungicides at reduced rates to control of powdery mildew on tobacco.
200 Il Tabacco 9:57-65.
- 201 Marco S, Ziu O, Cohen R (1994) Suppression of powdery mildew in squash by applications of
202 whitewash, clay and antitranspirant materials. Phytoparasitica 22:19-29.

- 203 Oliveira VR, Gianasi L, Mascarenhas MHT, Pires NM, Filho JAA, Viana MCM, Lara JFR
204 (2002) Controle de oídio em moranga híbrida. Horticultura Brasileira 20.
- 205 Pasini C. et al. (1997) Effectiveness of antifungal compounds against rose powdery mildew
206 (*Sphaerotheca pannosa* var. *rosae*) in glasshouses. Crop Protection 16:251-256.
- 207 Pereira JCR, Zambolim L, Chaves GM, Costa H, Ribeiro do Vale FXR (1995) Controle de
208 oídio do pepino pelo uso de bicarbonato de sódio em condições de casa de vegetação.
209 Fitopatologia Brasileira 20:359.
- 210 Reuveni M, Agapov V, Reuveni R (1995) Suppression of cucumber powdery mildew
211 (*Sphaerotheca fuliginea*) by foliar sprays of phosphate and potassium salts. Plant Pathology
212 44:31-39.
- 213 Reuveni M, Agapov V, Reuveni R (1996) Controlling powdery mildew caused by
214 *Sphaerotheca fuliginea* in cucumber by foliar sprays of phosphate and potassium salts. Crop
215 Protection 15:49-53.
- 216 Santos AP (2009) Controle do oídio da abobrinha com antagonistas e produtos
217 biocompatíveis. 2009. 55 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal
218 de Lavras.
- 219 Sinclair JB, Backman PA (1989) Compendium of soybean disease. 3 ed. St Paul: APS Press,
220 106p.
- 221 Stadnik MJ, Rivera MC (2001) Oídios. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna- SP.

- 222 Stadnik MJ, Bettiol W, Saito ML (2003) Bioprospecting for plant and fungus extracts with
223 systemic effect to control the cucumber powdery mildew. *Journal of Plant Diseases and*
224 *Protection* 110:383-393.
- 225 Tamm L, Amsler T, Scharer H, Refardt HM (2006) Efficacy of Armicarb (potassium
226 bicarbonate) against scab and sooty blotch on apples. *Proceedings of the 12th International*
227 *Conference on cultivation technique and phytopathological problems in organic fruit-growing,*
228 *ed. (FÖKO and Weinsberg) 87-92*
- 229 Yorinori JT (2002) Situação atual das doenças potenciais no Cone Sul. In: CONGRESSO
230 BRASILEIRO DE SOJA, 2., Foz do Iguaçu, PR. *Anais, Congresso Brasileiro de Soja,*
231 *Londrina: Embrapa Soja.*
- 232 Ziv O, Hagiladi A (1993) Controlling powdery mildew in euonymus with polymer coatings
233 and bicarbonate solutions. *HortScience* 28:124-126.
- 234 Ziv O, Zitter TA (1992) Effects of bicarbonates and film-forming polymers on cucurbit foliar
235 diseases. *Plant Disease* 76: 513-517.
- 236

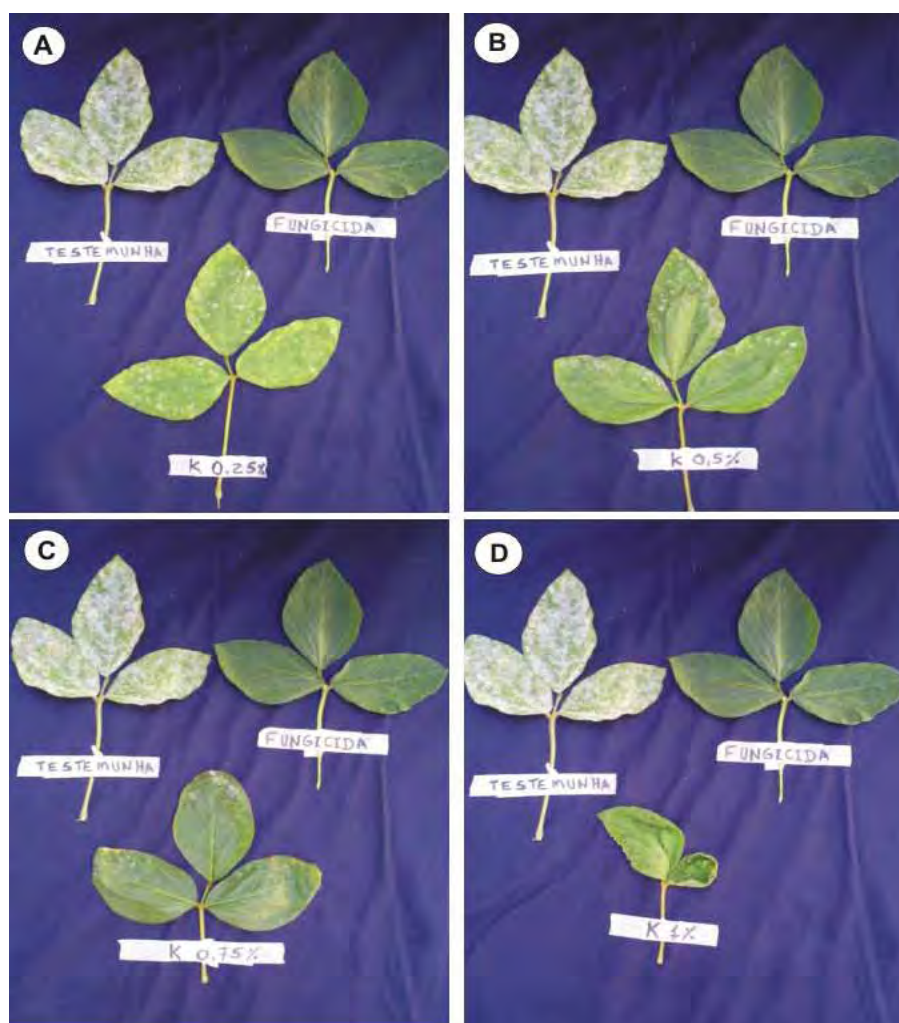
237 **TABELA 1:** Efeito do bicarbonato de potássio (Kaligreen[®]) sobre a porcentagem de área
 238 foliar afetada por *Erysiphe diffusa* em plantas de soja mantidas em casa de vegetação.

	1ª avaliação	2ª avaliação	3ª avaliação	4ª avaliação	5ª avaliação
Tratamento	30° dia após	38° dia após	44° dia após	51° dia após	58° dia após
0	20,85 a D	31,50 a C	41,67 a B	86,25 a A	84,17 a A
0,25%	9,08 b B	11,30 b B	23,25 b A	28,08 b A	31,33 b A
0,50%	3,43 b A	4,65 b A	10,75 c A	7,43 c A	10,55 c A
0,75%	4,22 b A	5,23 b A	2,50 c A	2,75 c A	0,60 d A
1,00%	2,98 b A	4,13 b A	6,33 c A	0,62 c A	0,10 d A
Fungicida	0,98 b A	0,95 b A	2,21 c A	2,63 c A	1,63 d A

239 Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e pela mesma letra maiúscula na linha não
 240 diferem estatisticamente ($p > 0,05$) – Teste de Scott Knott. A primeira avaliação foi realizada no 30° dia
 241 após a emergência e as demais no 38°, 44°, 51° e 58° dia após a emergência.

242

243

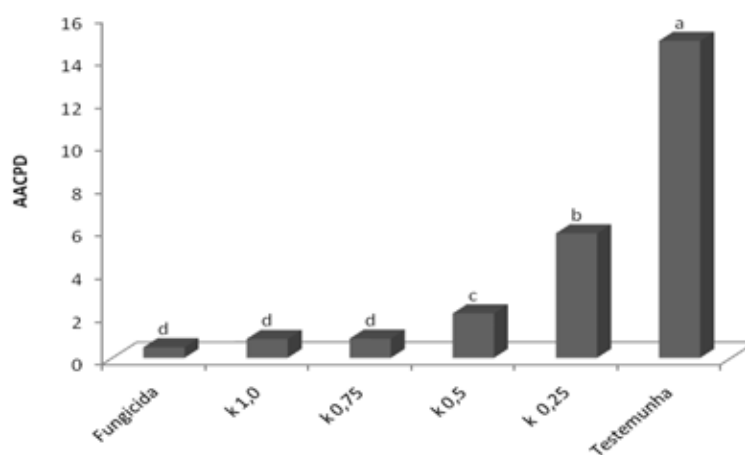


244

245 **FIGURA 1** - Efeito do bicarbonato de potássio (Kaligreen[®]) nas concentrações de 0,25% (A),246 0,5% (B), 0,75% (C) e 1% (D) no controle de *Erysiphe diffusa* na cultivar MG/BR 46

247 (Conquista) de soja.

248



249

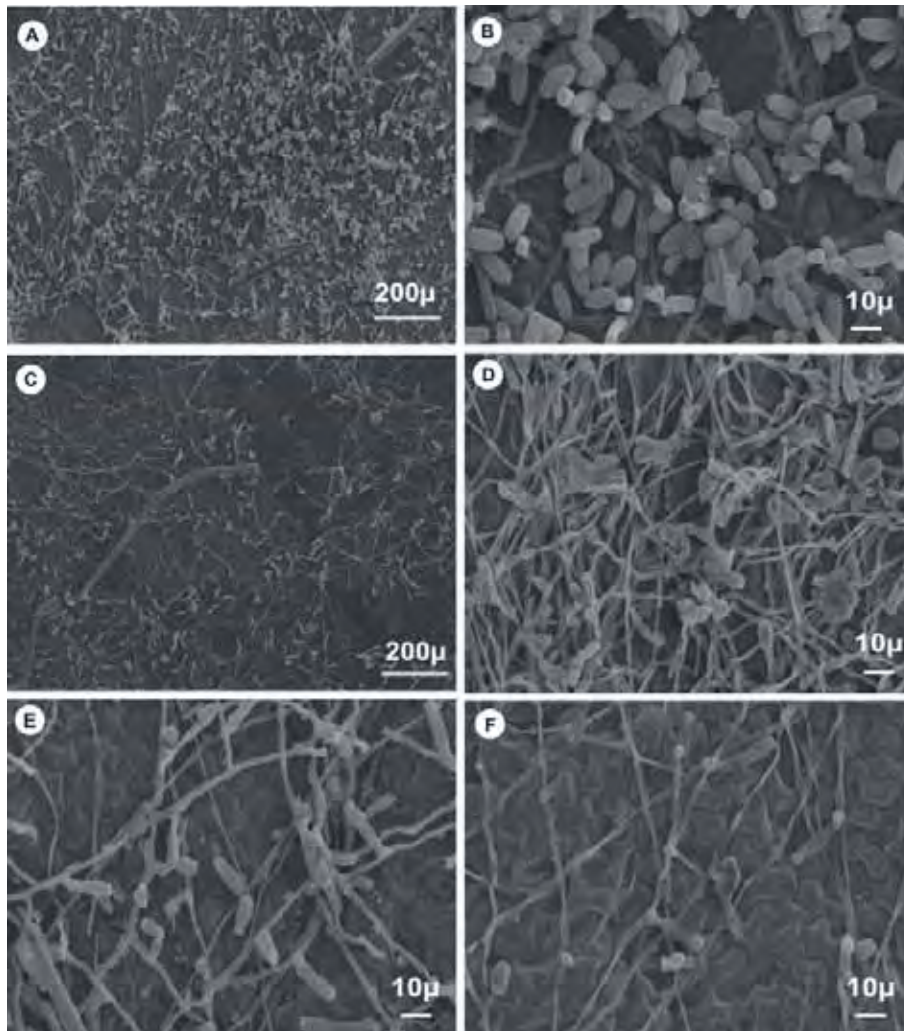
250

251 **FIGURA 2** - Efeito do Kaligreen® sobre a área abaixo da curva de progresso da doença252 (AACPD) causada pelo oídio (*Erysiphe diffusa*) em soja. Médias seguidas de mesma letra não

253 diferem entre si.

254

255



256

257

258 **FIGURA 3** - Eletromicrografias de varredura de folhas de soja infectadas com *Erysiphe*
259 *diffusa*, mantidas em casa de vegetação, e tratadas com água (A e B) e com bicarbonato de
260 potássio (Kaligreen[®]) nas concentrações de 0,25 (C); 0,50 (D); 0,75 (E) e 1% (F) (v/v).

261

262

CAPÍTULO II

EFEITO DE ÓLEOS DE GRÃOS DE CAFÉ TORRADO E CRU NA
REDUÇÃO DO OÍDIO (*Erysiphe diffusa*) DA SOJA EM CASA DE
VEGETAÇÃO

1 **Efeito de óleos de grãos de café torrado e cru na redução do oídio**
2 **(*Erysiphe diffusa*) da soja em casa de vegetação**

3

4 Regiane Medice¹ & Wagner Bettiol²

5

6 ¹Departamento de Produção Vegetal, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita
7 Filho”, CP 237, Botucatu, SP. ²Embrapa Meio Ambiente CP 69, 13820-000 Jaguariúna SP. E-
8 mail: regiane76br@yahoo.com.br

9

10 **RESUMO**

11 O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de óleos extraído de grãos de café torrado e
12 cru no controle do oídio da soja, causado por *Erysiphe diffusa*. O experimento foi conduzido
13 com a cultivar MGBR-46 (Conquista). Os óleos foram pulverizados semanalmente nas
14 concentrações de 0%, 0,5%, 1% e 2%. Como tratamento padrão foi utilizado fungicida à base
15 de piraclostrobina e epoxiconazole. Durante quatro semanas foi avaliada a severidade da
16 doença num par de trifólios do terço médio das plantas, utilizando escala diagramática de
17 notas. Durante a condução do ensaio, foram coletadas amostras das folhas para a análise
18 ultraestrutural em microscopia eletrônica de varredura, cujo objetivo foi o de acompanhar os
19 efeitos dos óleos sobre as estruturas do fungo na planta. Os óleos controlaram a doença na
20 faixa de 84,8% a 99,8%, sendo superior ao fungicida padrão. Nas observações em MEV,
21 constatou-se a presença de uma camada protetora na superfície das folhas, impedindo a ação

22 do patógeno. Com isso, pode-se inferir que os produtos utilizados neste trabalho apresentam
23 potencial para proteção de plantas de soja contra oídio.

24 **Palavras-chave: óleo fixo, óleos essenciais, produtos biocompatíveis, *Erysiphe diffusa***

25

26 **ABSTRACT**

27 **Control of soybean powdery mildew with coffee oils in greenhouse**

28 The objective of this study was to evaluate the potential of oils extracted from roasted coffee
29 beans and raw to control soybean powdery mildew, caused by *Erysiphe diffusa*. The
30 experiment was conducted with the cultivar MGBR-46 (Conquista). The oils were weekly
31 sprayed at concentrations of 0%, 0.5%, 1% and 2%. For four weeks we evaluated the severity
32 of the disease in a pair of clover in the middle third of the plants, using diagrammatic scale of
33 notes. Samples were collected from leaves for ultrastructural analysis by scanning electron
34 microscopy, whose goal was to monitor the effects of oils on the structures of the fungus in the
35 plant. Oils controlled the disease in the range of 84.8% to 99.8%, higher than the standard
36 fungicide. In MEV observations, it was found the presence of a protective layer on the surface
37 of the leaves, preventing the action of the pathogen. We conclude that the products used in this
38 study have potential for protection of soybean plants against powdery mildew.

39 **Key words: essential oil, fixe oil, biocompatible product, *Erysiphe diffusa***

40

41

42 INTRODUÇÃO

43 A sociedade está preocupada com o uso intensivo e indiscriminado de agrotóxicos que
44 causam diversos problemas ao ambiente. Segundo o Sindicato Nacional para Produtos de
45 Defesa Agrícola (Sindag), o Brasil foi o país, pelo segundo ano consecutivo, campeão mundial
46 em consumo de agrotóxicos. No ano de 2010, foram mais de 1 bilhão de litros de agrotóxicos
47 legalmente comercializados no país, o que representaria, ao longo do ano, o consumo de mais
48 de 5,2 litros por habitante (Mpabrasiles, 2011). Estudos da Agência Nacional de Vigilância
49 Sanitária (Anvisa, 2011), em 26 estados do país, identificaram cerca de 20 culturas com alto
50 índice de resíduos de agrotóxicos, como o pimentão, uva, morango, pepino, couve, alface,
51 abacaxi e mamão.

52 A cultura da soja é atualmente a mais importante para o agronegócio brasileiro e
53 responde por 51% do volume de agrotóxicos comercializados (Mpabrasiles, 2011). Entre os
54 fatores que limitam o rendimento da soja, as doenças são os mais importantes por serem de
55 difícil controle (Embrapa, 2004). A importância econômica de cada doença varia de acordo
56 com o ano e a região, dependendo da condição climática de cada safra. Antes da entrada da
57 ferrugem asiática da soja, o oídio, causado por *Erysiphe diffusa*, estava entre as doenças mais
58 importantes.

59 Associado ao grande consumo de agrotóxicos no Brasil, tem se verificado o interesse
60 de pesquisas sugerindo a utilização de produtos naturais, como substâncias de origem vegetal
61 que apresentem efeito inibitório sobre os fitopatógenos e ao mesmo tempo não causem danos
62 aos ecossistemas (Sousa et al., 1991). Óleos essenciais, óleos fixos e extratos de plantas têm
63 apresentado resultados no controle de doenças em plantas. Stangarlin et al. (1999) e Fiori et al.

64 (2000) afirmam que isso é possível devido à atividade antimicrobiana direta e indireta que
65 esses produtos extraídos das plantas podem apresentar. Como exemplo, desses defensivos
66 naturais no controle de fitopatógenos tem-se o controle do oídio (*Oidium lycopersici*) do
67 tomateiro, com óleo emulsionável de *Azadirachia indica* (Carneiro, 2003).

68 Diante do exposto, o presente trabalho foi conduzido com o objetivo de avaliar a
69 atividade antimicrobiana de óleos fixo de grãos de café torrado e café cru sobre o oídio da
70 soja.

71

72 MATERIAL E MÉTODOS

73 O experimento foi realizado, no segundo semestre de 2008, em casa de vegetação da
74 Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP. Para a realização deste trabalho utilizou-se a
75 cultivar MGBR-46 (conhecida como Conquista), por ser susceptível ao oídio. Em vasos de 5 L
76 contendo substrato obtido de uma mistura de latossolo vermelho e casca de pinus (80%:20%,
77 respectivamente), foram semeadas quatro sementes e após a germinação das sementes foi
78 realizado desbaste deixando apenas duas plantas por vaso. As plantas foram mantidas em casa
79 de vegetação e no 30º dia, quando as plantas apresentavam-se no estágio V4, foi realizada a
80 primeira aplicação dos produtos a serem testados, bem como a primeira avaliação.

81 Os óleos fixos utilizados foram extraídos de grãos de café torrado e grãos de café cru,
82 fornecidos pelo Dr. Nilson Maia, do IAC. As concentrações utilizadas neste estudo foram de
83 0%, 0,5%; 1% e 2% (v/v), além de um fungicida à base de piraclostrobina e epoxiconazole, na
84 dosagem recomendada pelo fabricante. A suspensão dos óleos foi preparada em Erlenmeyer
85 com capacidade de 500 mL, sendo inicialmente colocadas três gotas de detergente neutro, o

86 volume de óleo para atingir as concentrações desejadas e o volume completado com água
87 destilada, sendo todo o conteúdo homogeneizado com um bastão de vidro. Após este
88 procedimento foram realizadas as pulverizações com o auxílio de uma pistola de pintura
89 acoplada a um compressor de ar, a uma pressão de 10 lb pol⁻² (Toagosei Chemical Industry
90 Co. Ltd. Japão) sendo realizadas ao final da tarde, quando a temperatura ambiente se
91 encontrava em torno de 25 °C. As aplicações foram semanais. Após a primeira pulverização
92 dos produtos, foram acomodados, entre as fileiras dos vasos com plantas saudáveis, vasos
93 contendo plantas de soja infectadas com oídio (*Erysiphe diffusa*) para que ocorresse a
94 inoculação natural.

95 As avaliações da severidade da doença foram realizadas semanalmente sempre no
96 período da manhã. A característica avaliada foi a porcentagem de área foliar lesionada. Para
97 isso foi adotada a escala diagramática apresentada por Stadnik et al. (2001), analisando as
98 folhas centrais do terço médio de cada folíolo das plantas.

99 O preparo das amostras para avaliação em microscopia eletrônica de varredura foi feito
100 no Laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa Meio Ambiente. Foram coletadas
101 cinco folhas de cada tratamento. Depois de coletadas, pedaços de 0,5 X 0,5 cm foram imersos
102 em solução fixadora (Karnovisk's modificado), pH 7,2 e armazenado em freezer a -10 °C até
103 ser levado para a realização da observação em microscópio eletrônico de varredura no
104 Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultra-estrutural (LME) do Departamento de
105 Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Após o período de fixação o material
106 foi imerso em solução de cacodilato por três vezes por um tempo de 10 minutos em cada
107 imersão e após este processo foram transferidas para uma solução de tetróxido de ósmio 1% em

108 água por 1 hora e subsequentemente desidratadas em uma série de acetona (25, 50, 75, 90 e
109 100% por três vezes) e depois levadas para o aparelho de ponto crítico. Os espécimes obtidos
110 foram montados em suportes de alumínio *stubs*, com a ajuda de uma fita de carbono dupla face
111 colocada sobre uma película de papel alumínio, cobertos com ouro e observados em
112 microscópio eletrônico de varredura LEO EVO 40XVP.

113

114 **Análise estatística**

115 O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cinco repetições. Os
116 dados foram analisados com base nas médias de cada tratamento por avaliação. Com a média
117 das cinco avaliações realizadas, foi possível determinar a área abaixo da curva de progresso da
118 doença (AACPD). Esses dados foram submetidos ao teste de Scott-Knott, realizado no
119 programa Sisvar[®] (Ferreira, 2000), para a comparação de efetividade entre os tratamentos.

120

121 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

122 Os óleos de café torrado e cru nas concentrações de 0,5%; 1% e 2% controlaram
123 efetivamente o oídio da soja em todas as avaliações realizadas (Tabelas 1 e 2, Figuras 1 e 2).
124 Além disso, observa-se que nas concentrações estudadas os óleos apresentaram o mesmo
125 controle do fungicida padrão utilizado (Tabelas 1 e 2). Na Tabela 2, observa-se que os óleos
126 na maior concentração reduziram a doença mais efetivamente do que o fungicida padrão,
127 demonstrando a eficiência desses óleos no controle do oídio.

128 Pereira (2006) relata que os subprodutos do café tais como óleos, polpas e casca dos
129 frutos possuem, em sua fração solúvel carboidratos, proteínas, taninos e vários compostos

130 fenólicos. Segundo Molina et al. (1974), 42% do peso dos frutos de café cereja correspondem
131 à polpa, considerada resíduo do beneficiamento do fruto seco. Em sua composição constam,
132 principalmente, compostos fenólicos (ácido clorogênico e flavonóides). Compostos fenólicos
133 nas células vegetais, quando presentes em alta concentração, ou oxidados de fenóis simples a
134 quinonas podem constituir-se em componentes de defesa do vegetal contra fatores externos
135 (Nicholson & Hammerschmidt, 1992; Pascholati & Leite, 1994). Porém, neste trabalho, o que
136 se observou por meio da microscopia eletrônica de varredura, é que se forma uma camada
137 protetora na folha, e com isso há dificuldade de penetração do patógeno (Figuras 3 e 4). Não
138 se observou ação direta dos óleos sobre o patógeno. Entretanto, estudos mais aprofundados
139 sobre o efeito tóxico dos óleos sobre o fungo não foram realizados.

140 Em ensaios realizados por Resende et al. (2004), foi observada a redução na
141 percentagem da mancha-de-phoma de 20% e 38%, quando foram utilizados extratos de casca
142 de café e de folhas de café infectadas por ferrugem. Isso pode indicar que componentes dos
143 órgãos de café apresentam potencial em controlar fitopatógenos, como observado no presente
144 trabalho. Amaral (2005) e Santos et al. (2007) obtiveram reduções de até 40% na AACPI em
145 mudas de cafeeiro, em casa de vegetação, e 34% em lavoura orgânica no campo,
146 respectivamente, utilizando os extratos de casca de café. Barguil et al. (2005) observaram que
147 o extrato afetou negativamente o tamanho e o número de lesões de *Phoma costaricensis*.
148 Pereira et al. (2008), utilizando extrato de casca de café e óleo essencial de tomilho contra a
149 cercosporiose em plantas de café mantidas em casa de vegetação, observaram que houve
150 redução da doença com ambos tratamentos em 35% e 16,1% respectivamente, quando
151 comparado a testemunha. Segundo os autores, o controle obtido por meio do extrato,

152 possivelmente, ocorreu devido à presença de compostos fenólicos em sua fração solúvel
153 favorecendo uma possível indução de resistência na planta, enquanto que o efeito do óleo de
154 tomilho foi devido aos compostos presente em sua composição como o timol, cravacrol,
155 fenóis, quinonas, saponinas, flavanóides e terpenóides (Silva Júnior & Vizzoto, 1996).

156 Estes resultados se assemelham ao obtido por Perina (2011) que também observou
157 redução na severidade de oídio em plantas de soja, mantidas em casa de vegetação,
158 pulverizadas com óleo essencial de citronela, de capim limão, de eucalipto, de canela e de
159 melaleuca e suspensão de leite em 86,1%, 72,1%, 68,7%, 67,1%, 57,3%, 44,9 e 74,2%,
160 respectivamente. Tal fato revela que os óleos extraídos de plantas, grãos e folhas podem
161 possuir propriedades antifúngicas ou protetoras nas plantas.

162 Medice et al. (2005), empregando tratamento preventivo com óleos essenciais de
163 eucalipto citriodora (*Corymbia citriodora*), tomilho (*Thymus vulgaris*), citronela
164 (*Cymbopogon nardus*) e nim (*Azadirachta indica*) em plantas de soja mantidas em casa de
165 vegetação, também observaram redução na severidade da ferrugem da soja, causada por
166 *Phakopsora pachyrhizi*, numa faixa situada entre 35% e 61%.

167 Abreu (2006) também observou redução de 26%, 62% e 95% na incidência da pinta-
168 preta (*Alternaria solani*) do tomateiro em plantas tratadas com óleo essencial de canela, nas
169 concentrações de 0,5; 0,75 e 5 mL L⁻¹, respectivamente. Entretanto, Carneiro (2003),
170 utilizando extrato de folhas e óleo emulsionável de nim nas concentrações de 0,25%, 0,5%,
171 1% e 2% contra *Oidium lycopersici*, agente etiológico do oídio em tomateiro, verificou que o
172 extrato das folhas não foi eficiente no controle do oídio. Por outro lado, o óleo emulsionável
173 de nim controlou a doença, mesmo nas menores concentrações avaliadas, e foi similar ao

174 fungicida utilizado como controle. Isto revela que o fato de um óleo ser mais eficiente que o
175 extrato seria devido ao fato do mesmo proporcionar uma camada protetora na superfície das
176 folhas, comprovado neste estudo utilizando como ferramenta a microscopia eletrônica de
177 varredura para a análise ultraestrutural do efeito do óleo fixo de grãos de café no controle do
178 oídio de soja (Figuras 3 e 4).

179 Trabalhos envolvendo o uso de produtos naturais como óleo fixo de grãos de café no
180 controle do oídio da soja não existem na literatura até o momento. Contudo, a possível
181 redução da doença através do uso deste produto pode ser comprovada neste trabalho, onde
182 todos os tratamentos empregados apresentaram controle da doença semelhantemente ao
183 fungicida padrão (Figuras 1 e 2).

184 De acordo com a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) todos os
185 tratamentos diferiram da testemunha (Figura 2). Esse resultado confirma a eficiência no
186 controle da severidade do oídio da soja pelo uso destes óleos essenciais. Tal fato pode
187 viabilizar o uso desse produto no controle da doença.

188 De forma análoga, estes resultados se assemelham ao obtido por Perina (2011), que
189 através da AACPD, também observou redução na severidade de oídio em plantas de soja
190 mantidas em casa de vegetação, constatando que os tratamentos fungicida (tebuconazole), óleo
191 essencial de citronela, leite, óleos essenciais de capim limão, de eucalipto, de canela e de
192 melaleuca reduziram a doença em 86,1%, 74,2%, 72,1%, 68,7%, 67,1%, 57,3% e 44,9%,
193 respectivamente.

194 Tal fato revela que os óleos extraídos de plantas, grãos e folhas podem possuir
195 propriedades antifúngicas ou protetoras nas plantas. Medice et al. (2005), empregando

196 tratamento preventivo com óleos essenciais de eucalipto citriodora (*Corymbia citriodora*),
197 tomilho (*Thymus vulgaris*), citronela (*Cymbopogon nardus*) e nim (*Azadirachta indica*) em
198 plantas de soja mantidas em casa de vegetação, também observaram redução na severidade da
199 ferrugem da soja, causada por *Phakopsora pachyrhizi*, numa faixa situada entre 35% e 61%.

200 Com os resultados obtidos é possível concluir que os óleos de café torrado e cru foram
201 eficientes em controlar o oídio da soja e formaram uma camada protetora na face adaxial das
202 plantas, responsável pelo controle da doença.

203

204 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

205 Abreu CLM (2006) Controle de *Alternaria solani* em tomateiro (*Lycopersicon esculentum*)
206 com óleos essenciais. 2006. 71 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual
207 Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu-SP.

208 Amaral DR (2005) Indução de resistência em cafeeiro contra *Cercospora coffeicola* por
209 eliciadores abióticos e extratos vegetais. 2005. 96p. Dissertação (Mestrado) - Universidade
210 Federal de Lavras, Lavras-MG.

211 ANVISA (2011) Disponível no site:

212 <http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home/agrotoxicotoxicologia>. Acesso 07/2011.

213 Barguil BM, Resende MLV, Resende RS, Beserra Júnior, JEA, Salgado SML (2005) Effect of
214 extracts from citric biomass, rusted coffee leaves and coffee berry husks on *Phoma*
215 *costarricensis* of coffee plants. Fitopatologia Brasileira 30:535-537.

- 216 Carneiro SMTPG (2003) Efeito de extratos de folhas e do óleo de nim sobre o oídio do
217 tomateiro. *Summa Phytopathologica* 29:262-265.
- 218 Fiori ACG (2000) Atividade de lecitinas sobre a germinação de esporos e indução de
219 fitoalexinas. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, 25: 374. Resumo n. 266.
- 220 Medice R, Alves E, Assis RT, Magno Júnior RG, Lopes EAGL (2005). Óleos essenciais no
221 controle da ferrugem asiática da soja *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd. *Ciência e*
222 *Agrotecnologia*, Lavras, 31,83-90.
- 223 Molina MR, Fluente G, Bressani R (1974). Pulpa e pergamino de café. VIII. Estudios básicos
224 sobre la deshidratación de la pulpa de café. *Turrialba*, 24 (3):280-284
- 225 Mpabrasiles (2011) Disponível no site:
226 [http://mpabrasiles.wordpress.com/2011/04/06/entidades-denunciam-impactos-do-uso-de-](http://mpabrasiles.wordpress.com/2011/04/06/entidades-denunciam-impactos-do-uso-de-agrotoxicos-e-lancam-campanha-contra-os-agrovenenos/)
227 [agrotoxicos-e-lancam-campanha-contra-os-agrovenenos/](http://mpabrasiles.wordpress.com/2011/04/06/entidades-denunciam-impactos-do-uso-de-agrotoxicos-e-lancam-campanha-contra-os-agrovenenos/). Acesso em julho de 2011.
- 228 Nicholson RL, Hammerschmidt R (1992) Phenolic compounds and their role in disease
229 resistance. *Annual Review of Phytopathology* 30:369-389.
- 230 Pascholati SF, Leite B (1994) Mecanismos bioquímicos de resistência às doenças. Revisão
231 *Anual de Patologia de Plantas* 2:1-51.
- 232 Pereira R B (2006) Extrato de casca de café e óleo de tomilho no controle de *Cercospora*
233 *coffeicola* Berk & Cooke em cafeeiro. 2006. 79p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)-
234 Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

- 235 Pereira BR, Alves E, Ribeiro Júnior MP , Resende VLM, Lucas CG e Ferreira BJ (2008).
236 Extrato de casca de café, óleo essencial de tomilho e acibenzolar-S-metil no manejo da
237 cercosporiose-do-cafeeiro. *Pesq. agropec. bras.* 43:1287-1296.
- 238 Perina FJ (2011) Controle de *Erysiphe diffusa* com óleos essenciais e leite: Estudos
239 ultraestrutural e do modo de ação. 2011. 100p. Dissertação (mestrado em fitopatologia)-
240 Universidade Federal De Lavras, Lavras, MG.
- 241 Resende MLV, Barguil BM, Resende RS, Beserra Júnior JEA , Salgado S.M.L (2004).
242 Induction of resistance against *Phoma costarricensis* on coffee leaves by extracts from citrus
243 pulp and coffee leaves and husks. The International Joint Workshop on PR-Proteins and
244 Induced Resistance, Helsingor, Dinamarca, p.79.
- 245 Santos FS, Souza PE, Resende MLV, Pozza EA, Miranda JC, Ribeiro Júnior PM, Manebra FC
246 (2007) Efeito de extratos vegetais no progresso de doenças foliares do cafeeiro orgânico.
247 *Fitopatologia Brasileira* 32:59-63.
- 248 Silva Júnior AA, Vizzotto VJ (1996) Plantas medicinais, aromáticas e fitoprotetoras.
249 *Agropecuária Catarinense* 9:5-8.
- 250 Sousa MP, Matos MEO, Matos FJA, Machado MIL, Craveiro AA (1991) Constituintes
251 químicos ativos de plantas medicinais brasileiras. Campinas: UFC, 416p.
- 252 Stangarlin JR, Schwan-Estrada KRF, Cruz MES, Nozaki MH (1999) Plantas Mediciniais e
253 Controle Alternativo de Fitopatógenos. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento* 11:16-24.
- 254

255 **TABELA 1:** Efeito dos óleos de grãos de café torrado e cru sobre a porcentagem de área
 256 foliar lesionada por *Erysiphe diffusa* em plantas de soja sob condições controladas.

TRATAMENTO	1ª avaliação	2ª avaliação	3ª avaliação	4ª avaliação
	30° dia após emergência	38° dia após emergência	44° dia após emergência	51° dia após emergência
Óleo de café cru 0,5%	15,42 a	14,41 a	18,33 a	12,83 a
Óleo de café cru 1%	6,68 a	7,30 a	3,30 a	3,80 a
Óleo de café cru 2%	1,75 a	7,18 a	1,85 a	0,98 a
Óleo de café torrado 0,5%	12,10 a	12,10 a	14,28 a	15,18 a
Óleo de café torrado 1%	4,67 a	10,42 a	7,92 a	8,82 a
Óleo de café torrado 2%	0,27 a	3,20 a	0,32 a	0,13 a
Fungicida	0,67 a	0,62 a	4,17 a	5,88 a
Testemunha	29,6 b	54,17 b	58,33 b	60,0 b

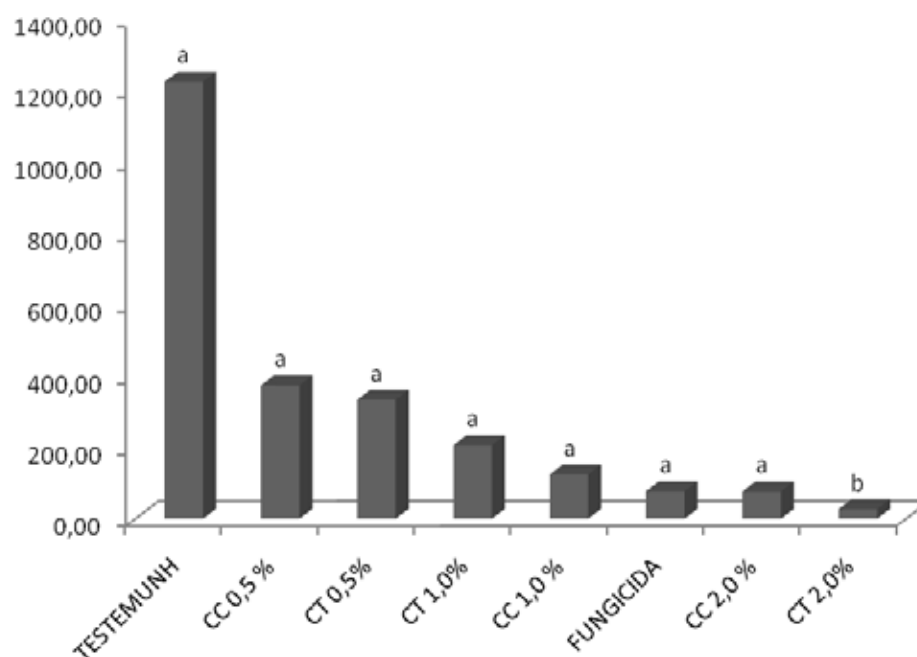
257 Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente ($p>0,05$) – Teste de
 258 Scott Knott.

259

260 **TABELA 2:** Redução da severidade do oídio da soja em relação à testemunha (%) por óleos
261 de café torrado e cru.

Tratamento	Redução do número de lesões em relação à testemunha (%)
Óleo de café cru 0,5%	67,8
Óleo de café cru 1%	76,0
Óleo de café cru 2%	86,15
Óleo de café torrado 0,5%	56,92
Óleo de café torrado 1%	73,87
Óleo de café torrado 2%	95,3
Fungicida	75,3

262



263

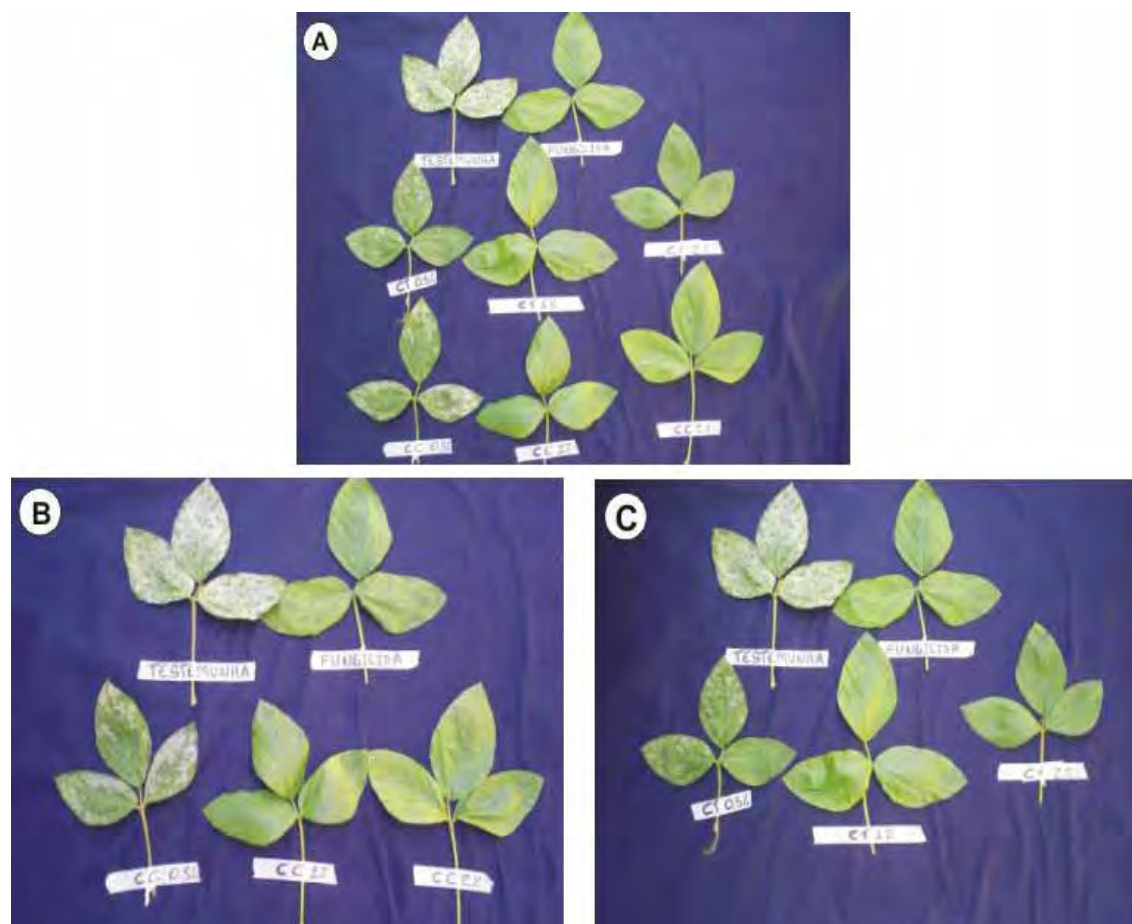
264 **FIGURA 1:** Área abaixo da curva de progresso da doença causada por *Erysiphe diffusa* em
265 plantas de soja cultivar Conquista tratadas com óleos oriundos de grãos de café torrado e cru.
266 CT- café torrado; CC- café cru: Fungicida: piraclostrobina e epoxiconazole. Médias seguidas
267 de mesma letra não diferem entre si ($p > 0,05$) – Teste de Scott Knott.

268

269

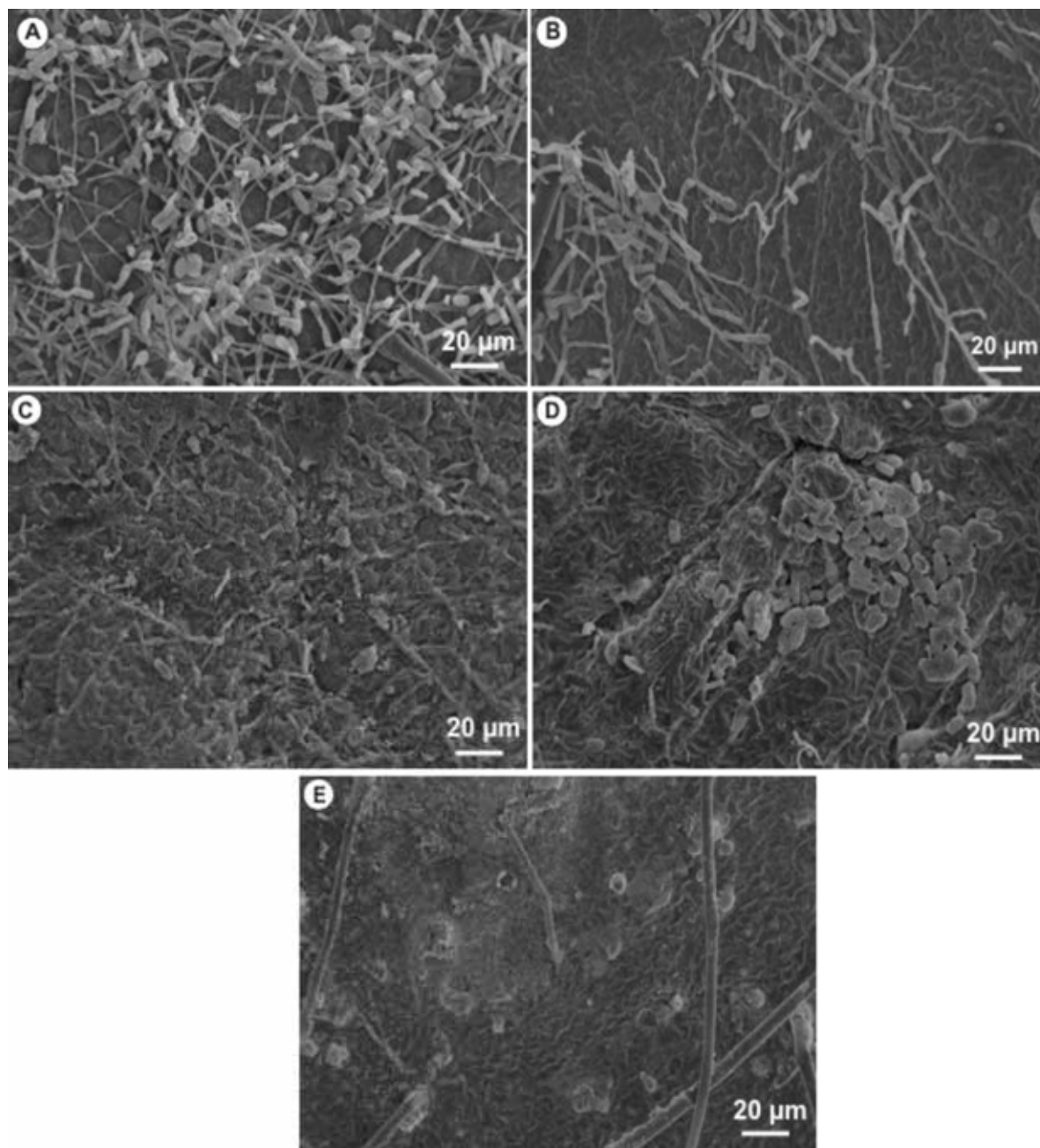
270

271



272

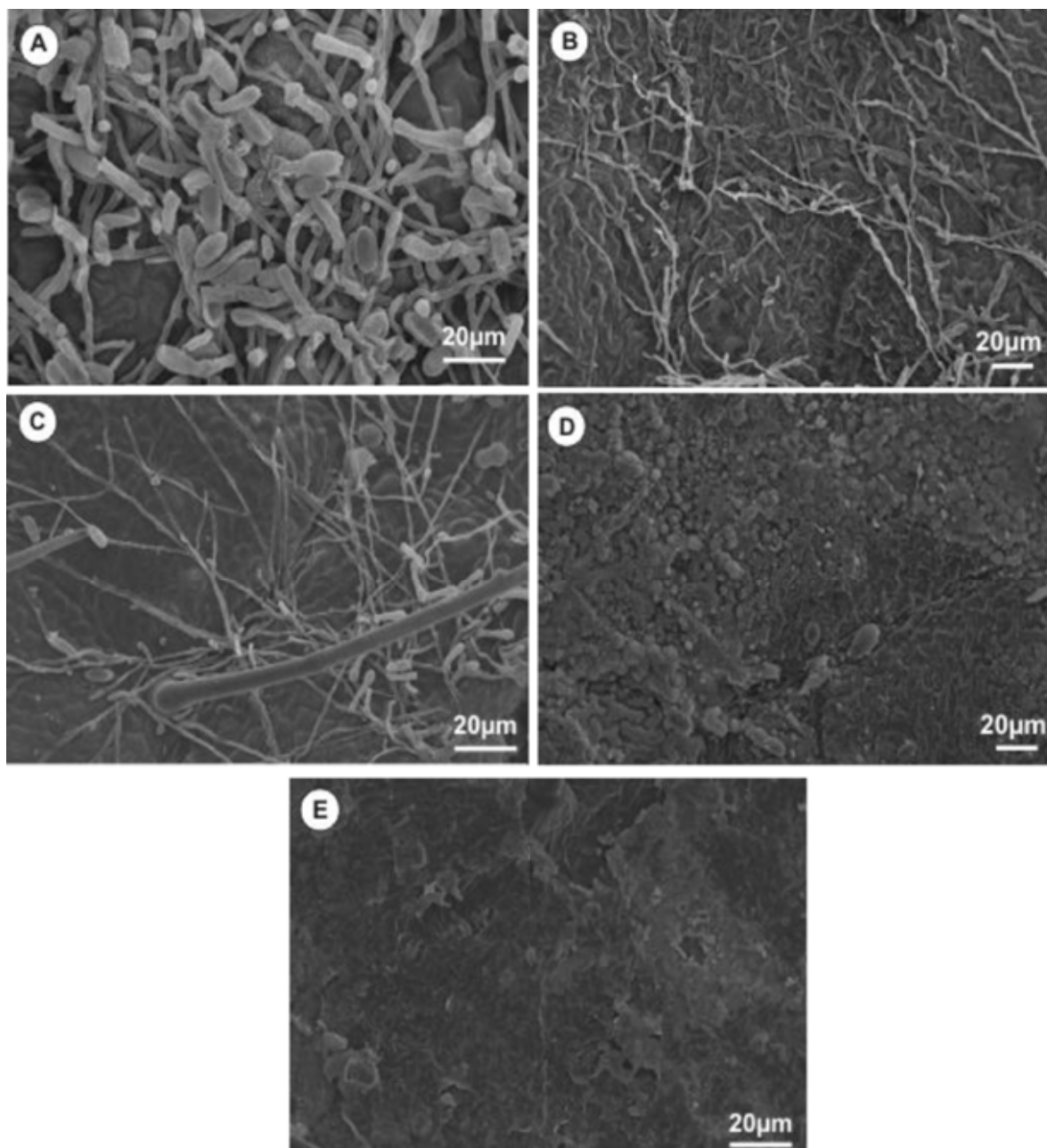
273 **FIGURA 2:** Sintomas de oídio (*Erysiphe diffusa*) da soja em (A) folíolos de plantas que
 274 tratadas com óleos de grãos de café torrado (CT) e cru (CC), fungicida e testemunha. (B)
 275 Plantas que receberam apenas óleo de café cru (CC); (C) plantas que receberam tratamento
 276 com óleo de café torrado (CT).



277

278 **FIGURA 3:** Eletromicrografias de varredura em folíolos de soja infectados por *Erysiphe*
279 *diffusa* e tratados com óleo fixo de café cru. Tratamentos constituídos por: água destilada (A),
280 fungicida (B), óleo de café cru a 0,5% (C), 1% (D) e 2% (E).

281



282

283 **FIGURA 4:** Eletromicrografias de varredura em folíolos de soja infectados por *Erysiphe*
284 *diffusa* e tratados com óleo fixo de café torrado. Tratamentos constituídos por: água destilada
285 (A), fungicida (B), óleo de café torrado 0,5% (C), 1% (D) e 2% (E).

286

CAPÍTULO III

EFEITO DE *Bacillus subtilis* E *Bacillus licheniformis* ASSOCIADOS COM
Bradyrhizobium elkanii SOBRE O CRESCIMENTO DE SOJA

1 **Efeito de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* associados com *Bradyrhizobium elkanii***
2 **sobre o crescimento de soja**

3
4 Regiane Medice¹ & Wagner Bettiol²

5 ¹Unesp/Botucatu, CP 237, Botucatu, SP; ²Embrapa Meio Ambiente, CP 69, 13820-000
6 Jaguariúna, SP.

7
8 **RESUMO**

9 O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*, quando
10 co-inoculados com *Bradyrhizobium elkanii*, no desenvolvimento da planta e no estímulo à
11 nodulação. Os experimentos foram conduzidos utilizando a soja CD 230. Os tratamentos e
12 concentrações empregadas foram: *B. subtilis*, *B. subtilis* +*B. licheniformis* e *B. licheniformis*
13 nas concentrações de 50, 100 e 200 g/50 kg de sementes e o isolado de *B. subtilis* (AP-3) nas
14 concentrações de 10⁷ UFC/ml, 10⁸ UFC/ml, 10⁹ UFC/ml, sempre com ou sem tratamento das
15 sementes com estirpes de *Bradyrhizobium*. Foi realizado um estudo em campo utilizando
16 apenas as concentrações que apresentaram resultado positivo em casa de vegetação. Em
17 laboratório foi realizado o teste de germinação empregando os mesmo tratamentos. A maioria
18 dos produtos biológicos, quando associados com a co-inoculação de *B. elkanii*, apresentou
19 ação como promotores de crescimento em soja avaliados pelo número de nódulos, a área foliar
20 e peso seco da parte aérea das plantas, destacando a mistura *B. subtilis* +*B. licheniformis* com
21 maior potencial na promoção de crescimento.

22 **Palavras chave: promoção de crescimento, controle biológico, soja.**

23

24 **ABSTRACT**25 **Effect of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*, co-inoculate with *Bradyrhizobium***
26 ***elkanii*, on soybean growth promotion**

27 The objective of this study was to evaluate the effect of *Bacillus subtilis* and *Bacillus*
28 *licheniformis*, when co-inoculated with *Bradyrhizobium elkanii* in plant development and to
29 stimulate nodulation. The experiments were conducted in laboratory, greenhouse and field
30 trials on the Embrapa Environment using soybean cultivar CD 230. Treatments and
31 concentrations used were: *B. subtilis*, *B. subtilis* + *B. licheniformis* and *B. licheniformis* at
32 concentrations of 50, 100 and 200 g/50 kg of seed and isolated from *B. subtilis* (AP-3) at
33 concentrations of 10^7 CFU/ml, 10^8 UFC/ml, 10^9 CFU/ml, always with or without seed
34 treatment with *Bradyrhizobium*. The experiment in greenhouse was carried out in two periods,
35 one in winter and one in summer, using the same concentrations and bioprotectors. Also a
36 study was conducted in the field using only the concentrations that tested positive in the
37 experiment in a greenhouse. The last experiments were performed in the laboratory
38 conducting germination test using the same treatments. Biological products, when combined
39 with the co-inoculation with *B. elkanii* presented action as growth promoters in soybean
40 evaluated by the number of nodes, leaf area and shoot dry weight of plants, highlighting the
41 mixture *B. subtilis* + *B. licheniformis* with greater potential in promoting growth.

42 **Keywords: growth promotion, biological control, soybean, *Bacillus***

43

44 INTRODUÇÃO

45 Atualmente, as tendências do setor agrícola estão centradas na redução do uso de
46 pesticidas químicos e fertilizantes inorgânicos, obrigando a busca de alternativas que reduzam
47 o custo dos insumos e melhorem a qualidade ambiental (Haggag, 2002; Rodríguez et al.,
48 2006). A soja apresenta como característica a capacidade de se associar com bactérias
49 fixadoras de N₂, que podem contribuir para aumentar a produtividade e diminuir os custos de
50 produção (Soares, 2006). Além disso, outro grupo de bactérias importantes para diversas
51 culturas é o das rizobactérias promotoras de crescimento. O uso de rizobactérias associados à
52 rizóbios para promover a proteção e o crescimento de plantas pode ser uma alternativa para a
53 redução do uso de agroquímicos. Além disso, essas rizobactérias podem aumentar a produção
54 agrícola, tornar o produto mais competitivo e diferenciado e ainda diminuir os custos para o
55 produtor, pela menor necessidade de insumos (Coelho, 2007).

56 Os mecanismos utilizados pelas rizobactérias para promover nodulação, promoção de
57 crescimento em plantas e fixação de nitrogênio são, na sua maioria, desconhecidos ou
58 permanecem ambíguo. Entretanto, podem ser influenciados por diversos fatores abióticos tais
59 como: temperatura, pH, radiação, umidade, íons e elementos minerais e orgânicos do solo e os
60 bióticos responsáveis pelas características do hospedeiro, presença de patógenos e outros
61 microrganismos associados à planta (Silveira, 2001; Bloemberg & Lugtenberg, 2001; Araújo
62 et al., 2002). Entre as rizobactérias mais estudadas estão: *Azospirillum*, *Azotobacter*,
63 *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Hydrogenophaga*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Pseudomonas*
64 e *Burkholderia* (Oliveira et al., 2003).

65 Entre as rizobactérias, destaca-se o gênero *Bacillus*, pois seus efeitos são amplos tanto
66 para a emergência de plântulas como para a promoção de crescimentos das plantas. Além
67 promover controle biológico de doenças no solo, indução de resistência a doenças da parte
68 aérea (Araújo, 2008), podem melhorar a nodulação e o desenvolvimento de plantas de feijão e
69 soja, quando co-inoculados com *Rhizobium* ou *Bradyrhizobium* spp. (Srinivasan et al., 1997;
70 Camacho et al., 2001; Bai et al., 2003).

71 A eficiência de *B. subtilis*, quando co-inoculada com *Rhizobium* ou *Bradyrhizobium*,
72 foi verificada por Turner & Backman (1991) na cultura do amendoim em experimentos
73 realizados em campo utilizando. Os autores observaram aumento na emergência e no vigor das
74 plântulas, redução de doenças e aumento no teor de N nas plantas noduladas Assim, o
75 conhecimento da variabilidade de resposta da cultura da soja, quanto à capacidade de
76 nodulação dos rizóbios, pode fornecer informações sobre o desempenho dos parâmetros que
77 envolvem a fixação biológica de nitrogênio, auxiliando futuros programas de inoculação de
78 estirpes e melhoramento vegetal, o que é especialmente importante pela modulação da
79 nodulação por intensas trocas de sinais moleculares dependentes do genótipo da planta e da
80 bactéria (Schultze et al., 1994).

81 Considerando-se a demanda da planta por nitrogênio, o mercado brasileiro e
82 internacional para soja e derivados, e a área plantada, o objetivo deste trabalho foi avaliar o
83 efeito de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*, quando co-inoculados com *Bradyrhizobium*
84 *elkanii*, no desenvolvimento da planta e no estímulo à nodulação.

85

86 MATERIAL E MÉTODOS

87 Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Microbiologia Ambiental e em
88 casa de vegetação e campo experimental pertencentes à Embrapa Meio Ambiente , Jaguariúna,
89 SP, no período de março a de agosto de 2009 e de novembro de 2009 a fevereiro de 2010.

90

91 **Efeito de *Bradyrhizobium elkanii*, associada com *Bacillus*, sobre o desenvolvimento de** 92 **plantas de soja e nodulação em casa de vegetação.**

93 O latossolo utilizado, nas duas épocas de plantio, foi amostrado na Fazenda
94 Experimental da Embrapa Meio Ambiente na profundidade de 0-20 cm. Foram preparados
95 seis lotes de 360 litros de solo, sendo em cada lote incorporado 720 g de calcário dolomítico
96 (Minercal[®]). Após este procedimento, o solo foi revolvido e irrigado com 20 litros de água
97 para cada lote. Após repouso por sete dias, foi incorporado 200 g de superfosfato simples
98 moído, e novamente mantido em repouso por 24 h, quando foram transferidos para vasos com
99 capacidade de 2 e 5 litros de solo.

100 Sementes de soja da cultivar CD 203 foram utilizadas nos experimentos. As sementes
101 foram previamente selecionadas, pesadas e desinfetadas em álcool 70% por 1 min., hipoclorito
102 de sódio na concentração de 2% por 30 segundos e transferidas para água destilada por mais 1
103 min. e colocadas para secar em papel toalha à temperatura ambiente. Após este procedimento
104 as sementes foram tratadas com produtos formulados, fornecidos pela CR Hansen, a partir de
105 *Bacillus subtilis*, *Bacillus subtilis* + *Bacillus licheniformis* e *Bacillus licheniformis* nas
106 concentrações de 0, 50, 100 e 200 g/50 kg de sementes. A quantidade para o tratamento das
107 sementes foi baseada na concentração de células dos organismos que foi de $3,2 \times 10^{10}$ UFC/g

108 de produto, na formulação pó molhável. Além destes tratamentos, utilizou-se o isolado de
109 *Bacillus subtilis* AP-3 da Coleção de cultura da Embrapa Meio Ambiente nas concentrações
110 de 10^7 UFC/ml, 10^8 UFC/ml e 10^9 UFC/ml. O isolado AP-3 de *Bacillus subtilis* foi
111 multiplicado em placas de Petri por 24 h à temperatura de 25°C em meio batata-dextrose-ágar
112 (BDA). Para a inoculação das sementes com o isolado AP-3, foram utilizados 100 ml de água
113 destilada para a obtenção das suspensões bacterianas. A bacterização das sementes consistiu
114 no preparo e aplicação das suspensões bacterianas.

115 A co-inoculação com *Bradyrhizobium elkanii* (Turfal Ltda) foi realizada após um
116 período de 60 min. de repouso após os tratamentos com os isolados de *Bacillus*. Para tanto, o
117 produto na dose de 100g/50kg de sementes foi adicionado em água destilada e misturado nas
118 sementes, formando deste modo uma camada sobre as mesmas. Após este procedimento, as
119 sementes foram secas à temperatura ambiente por cerca de 60 minutos. Em seguida foram
120 semeadas 10 sementes por vasos com capacidade de 2 e 5 litros de solo, sendo utilizadas 10
121 repetições por tratamento. Os experimentos foram divididos em dois grupos, sendo um grupo
122 co-inoculado com *Bradyrhizobium elkanii* e o outro grupo sem a co-inoculação. As plantas
123 foram irrigadas diariamente durante todo ciclo da cultura. Aos dez dias após a semeadura foi
124 realizada a avaliação de emergência das plântulas e desbaste deixando somente duas plântulas
125 por vaso.

126 Aos 30 dias após a semeadura foram avaliadas as plantas contidas nos 150 vasos com
127 capacidade de 2 L determinando-se o número de nódulos, matéria seca da parte aérea e área
128 foliar. A parte aérea foi separada das raízes, retirando-se os nódulos cuidadosamente e
129 acondicionando os mesmos em frascos de vidro. A área foliar foi determinada no medidor

130 Área Meter modelo 3100 (marca Li- Cor). Para esta análise foi selecionando o folíolo central
131 do terço médio da planta. Durante as avaliações, tanto a parte aérea, quanto as raízes, foram
132 acomodados em sacos de papel devidamente identificados e colocados para secar em estufa
133 sob aeração forçada (65 °C) até peso constante, visando determinação do peso de matéria seca.

134 Ao final do ciclo avaliou-se o restante das plantas mantidas em 150 vasos com
135 capacidade de 5L/solo. Nesta etapa as variáveis analisadas foram a área foliar, o número de
136 vagens e o peso dos grãos secos.

137 Para verificar se algum fator externo realmente interferiu nos primeiros resultados, foi
138 implantado outro experimento nas mesmas proporções, porém conduzido na época do verão.
139 As variáveis analisadas foram às mesmas que no primeiro experimento. A análise de variância
140 dos dados foi feita seguindo-se o modelo de um delineamento inteiramente casualizados. A
141 comparação das médias foi efetuada utilizando-se o programa estatístico SISVAR por meio de
142 teste de Tukey a 5% de probabilidade.

143

144 **Efeito de *Bradyrhizobium elkanii*, associada com *Bacillus*, sobre o desenvolvimento de**
145 **plantas de soja e nodulação em campo.**

146 Nesse estudo as metodologias foram semelhantes às descritas para o ensaio em
147 condições de casa de vegetação, sendo estudada apenas a concentração de produtos à base de
148 *Bacillus* de 200 g/50 kg de sementes. Cada tratamento constou de cinco repetições. Cada
149 repetição foi constituída de duas linhas de 1 m com 20 sementes por linha. Para a realização
150 das avaliações foram amostradas 10 plantas, sendo duas subamostras com cinco plantas. As
151 cinco plantas de cada amostra foram avaliadas separadamente determinando-se o número e

152 peso de nódulos, altura de plantas, área foliar e peso seco da parte aérea e do sistema radicular.
153 Para a avaliação da área foliar, de cada planta de soja amostrada, foi retirado o quinto trifólio,
154 a partir da base da planta, sendo que a leitura da área foliar foi realizada no aparelho Area
155 Meter modelo 3100 (marca Li- Cor). A altura das plantas foi determinada com o auxílio de
156 uma fita métrica medindo-se da base do caule até sua extremidade. Ao final da condução do
157 experimento foram coletadas as amostras restantes em cada parcela e avaliado o peso dos
158 grãos. Após todos os procedimentos de avaliações, os dados foram organizados e analisados
159 estatisticamente utilizando o programa SISVAR 5.0 pelo teste Scott-Knott e T a 5% de
160 probabilidade.

161

162 **Efeito de *Bradyrhizobium elkanii*, associada com *Bacillus*, sobre germinação de sementes**
163 **de soja.**

164 O teste de germinação foi realizado em delineamento inteiramente casualizados com
165 cinco repetições de 25 sementes da cultivar CD 203, utilizando rolos de papel Germitest[®]
166 umedecidos com água destilada, na proporção de 2,5 vezes o peso do papel seco, à
167 temperatura de 25 °C. Os tratamentos foram os mesmos descritos anteriormente. Após a
168 montagem do experimento, utilizou-se para envolver os conjuntos de rolos de papel com as
169 sementes sacos plásticos de polietileno transparente, cada saco plástico acomodou cinco rolos.
170 O germinador utilizado foi uma câmara vertical tipo B.O.D. com temperatura de 25°C e
171 fotoperíodo de 12 h. As contagens foram feitas no 4º e no 7º dia após a emissão da radícula.
172 As variáveis analisadas foram comprimento do hipocótilo e da radícula. Os dados foram

173 submetidos à análise de variância e a comparação entre as médias foi feita pelo teste de Scott
174 Knott e T, a 5% de probabilidade.

175

176 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

177 **Efeito de *Bradyrhizobium elkanii*, associada com *Bacillus*, sobre o desenvolvimento de** 178 **plantas de soja e nodulação em casa de vegetação.**

179 Analisando o número de nódulos do experimento 1, verifica-se que os isolados de
180 *Bacillus* avaliados em soja cultivada em casa de vegetação, interferiram na nodulação (Tabela
181 1), sendo o número reduzido com o aumento da concentração de células de *Bacillus*. Em
182 relação ao número de nódulos, quando se utilizou a co-inoculação de *B. elkanii* e *Bacillus* foi
183 verificada a ocorrência da interação dos microrganismos nas concentrações de 50 e 100 g/50
184 kg de sementes de soja (Tabela 1). Contudo, quando não se utilizou a co-inoculação, foi
185 observado que os resultados foram inferiores ao que foi co-inoculados. Segundo Hungria
186 (1999), os benefícios são verificados na simbiose rizóbio-leguminosa, constatando-se, no caso
187 da soja, maior número de células e diversidade de *Bradyrhizobium*, maior número e massa
188 nodular, distribuição mais profunda dos nódulos no perfil do solo e taxas mais elevadas de
189 fixação biológica de nitrogênio. No segundo experimento, quando as sementes foram co-
190 inoculadas com as bactérias, ocorreu um aumento no número de nódulos. Por outro lado, na
191 ausência da inoculação de *Bradyrhizobium* os isolados de *Bacillus* reduziram a formação de
192 nódulos (dados não apresentados). Estes resultados corroboram com o que Lima et.al. (2010)
193 verificaram quando estudaram os efeitos da co-inoculação de rizóbios em feijão caupi. Os

194 autores observaram um aumento na nodulação do feijão caupi com a co-inoculação, sugerindo
195 uma influência do *Bacillus subtilis* na promoção de nodulação pela *Bradyrhizobium* inoculado.

196 Quando foi utilizada a co-inoculação com *Bradyrhizobium elkanii*, independentemente
197 dos ensaios, as plantas tratadas com o isolado AP-3 apresentaram menor nodulação que os
198 demais (Tabela 1), porém quando não se utilizou a co-inoculação, as plantas apresentaram o
199 mesmo efeito, ou seja, não houve diferença significativa entre eles. Em todos os tratamentos o
200 número de nódulos foi superior quando da co-inoculação. Em trabalhos desenvolvido por
201 Araujo et al. (2010) foi constatado que a co-inoculação com *Bradyrhizobium* e *Bacillus*
202 *subtilis* favoreceu o aumento na nodulação em feijão caupi. Assim, os autores concluem que
203 este tipo de associação microbiana apresenta grande potencial para aumentar a fixação
204 biológica do N₂ e o crescimento das leguminosas.

205 Segundo Triplett (1990), a co-inoculação de rizóbio com outras bactérias, como
206 *Bacillus*, *Azospirillum* e *Agrobacterium* pode influenciar a simbiose com as leguminosas de
207 várias maneiras, sendo destacada a influência no aumento de competitividade do rizóbio
208 inoculado, o aumento da nodulação (Li & Alexander, 1988) e redução de doenças nas raízes
209 (Turner & Backman, 1991).

210 Com exceção do tratamento com *Bacillus licheniformis* (Tabela 2), os tratamentos não
211 apresentaram efeito significativo sobre a área foliar. Em relação à co-inoculação com *B.*
212 *elkanii*, verificou-se que houve interação entre as concentrações empregadas (Tabela 2). Na
213 avaliação da interação dos isolados com o uso de *Bradyrhizobium*, com exceção do isolado
214 AP-3 na concentração de 10⁷ UFC, observa-se que os tratamentos não diferiram da
215 testemunha. No segundo experimento, não houve diferença estatística quando comparada a

216 interação tratamento x concentração, o isolado AP-3 de *B. subtilis*, na concentração de 10^8
217 UFC, e o formulado de *B. subtilis* nas concentrações de 100 e 200 g/50 kg de sementes,
218 apresentaram resultados significativos quando comparado à testemunha e aos demais
219 tratamentos (Dados não apresentados).

220 Segundo Catellan (1999), existe um sinergismo entre bactérias promotoras de
221 crescimento em plantas e bactérias fixadoras de nitrogênio em leguminosas, corroborando com
222 os resultados avaliados na variável área foliar. Com exceção do tratamento que utilizou o
223 isolado AP-3 de *B. subtilis*, na concentração de 10^7 UFC, todos os tratamentos utilizando co-
224 inoculação com *B. elkanii* não diferiram em relação ao controle.

225 De acordo com os resultados, verifica-se que não houve interação entre os produtos
226 utilizados com a presença de *Bradyrhizobium*. Entretanto, Dashti et al. (1998) apontaram um
227 efeito positivo no aumento do crescimento das plantas de 5 a 30% em diversas culturas como
228 milho, algodão, lentilha, canola, e arroz, dentre outros, após o tratamento com bactérias
229 especializadas em fixação de nitrogênio em leguminosas (iRPCPs) e bactérias com capacidade
230 de promover o crescimento vegetal através da produção de sinais ou substâncias específicas
231 (eRPCPs).

232 Na avaliação de produção de massa seca da parte aérea (Tabela 3), observou-se apenas
233 que na concentração de 50 g/kg de sementes com *B. licheniformis* essa variável foi inferior aos
234 demais tratamentos. Sob esta condição, foi determinante para que houvesse efeito significativo
235 em nível de 5% de probabilidade nos demais tratamentos. Este resultado demonstra que a
236 inoculação de sementes com *Bacillus* promoveu crescimento da planta, confirmando os
237 resultados encontrados por Araújo (2008) em soja, milho e algodão. A concentração

238 intermediária (100 g/50 kg de sementes) foi mais eficiente quando associada ao inoculante,
239 proporcionando maior peso seco da parte aérea das plantas avaliadas. Porém, quando
240 compara-se a influência do uso ou não do mesmo, observa-se que todos as concentrações onde
241 foi utilizado o inoculante a variável foi significativa em relação à não utilização do inoculante.
242 Porém, com exceção do tratamento AP-3 co-inoculados com rhizóbios (Tabela 3), todos os
243 tratamentos foram significativos quando comparada a interação dos tratamentos com a co-
244 inoculação de rhizóbios. Gomes et al. (2003), testando inoculação de *Bacillus pumillus* e *B.*
245 *thuringiensis* subvar. Kenya em mudas de alface, observaram incremento na matéria fresca da
246 parte aérea e raiz por estas bactérias.

247 Lopes et al. (1976) afirmam que peso de matéria seca e o número de nódulos de soja
248 não são critérios satisfatórios para caracterização de estirpes eficientes. Porém, quando se
249 comparou o uso ou não da co-inoculação com *B. elkanii*, dentro de cada concentração e
250 tratamento, não foi verificado efeito significativo. Segundo Lima (1998), o número e peso de
251 matéria seca de nódulos, peso de matéria seca das folhas, acúmulo de N e produção de
252 sementes dependem também da cultivar estudada.

253 Os resultados apresentados sobre o efeito das concentrações de *Bacillus* mostram que
254 quando foram utilizadas maiores concentrações, de alguma maneira, ocorreu a interação dos
255 isolados presentes nos produtos biológicos quando associados à co-inoculação com *B. elkanii*.
256 Entretanto, este experimento foi desenvolvido na época de inverno e em casa de vegetação
257 telada, o que poderia algum fator climático como, por exemplo, oscilações de temperatura ter
258 interferido na interação dos mesmos. No segundo experimento, as variáveis número de
259 nódulos e área foliar não foram significativas em função das diferentes concentrações

260 empregadas neste trabalho. Porém, o resultado se inverte quando se compara de modo geral
261 dentro de cada tratamento mostrando significância no número de nódulos e a área foliar e
262 quando os tratamentos foram associados com a co-inoculação de *B. elkanii* (dados não
263 apresentados).

264

265 **Efeito de *Bradyrhizobium elkanii*, associada com *Bacillus*, sobre o desenvolvimento de**
266 **plantas de soja e nodulação em campo.**

267 A co-infecção dos produtos biológicos com *Bacillus* e com *B. elkanii* proporcionou
268 maior área foliar, peso de grãos e número de plantas de soja no ensaio em condições de campo
269 (Tabela 40). Todavia, quando analisado o efeito dos tratamentos com a co-inoculação de *B.*
270 *elkanii*, as variáveis significativas foram número de nódulos, peso seco dos nódulos e área
271 foliar, resultado semelhante com o experimento realizado na 2^a época em casa de vegetação.
272 Diante dos resultados a nodulação serviria como parâmetro mais confiável para avaliar a
273 resposta à interação dos produtos biológicos juntamente com a co-inoculação de *B. elkanii*.
274 Bohrer e Hungria (1998), em experimento para selecionar genótipos de soja com melhor
275 resposta à inoculação com *Bradyrhizobium*, também concluíram que o parâmetro de
276 nodulação seria o mais indicado para esta seleção. Kolling et al. (1986) não obtiveram resposta
277 da soja à inoculação com diferentes níveis de inóculo de *B. japonicum* em solo que ficou em
278 pousio durante três anos. As estirpes naturalizadas haviam sobrevivido e promoveram efetiva
279 nodulação no tratamento sem inoculação. Neste caso, essa ausência foi atribuída à baixa
280 ocorrência de nódulos formados pelas estirpes dos inoculantes, que não superaram as
281 estabelecidas no solo na competição pelos sítios de nodulação.

282 Os tratamentos favoreceram o desenvolvimento das plantas de soja em até 67%,
283 influenciando na altura das plantas, que, em torno de 45 dias após semeadura, a média foi de
284 50% (Tabela 41). Estes dados corroboram com os verificados por Figueiredo et al. (2008) e
285 Pereira (2008). As plantas atingiram uma altura máxima de 184,50 cm, valor este bem
286 superior ao descrito por Silva (2003) em estudo semelhante de co-inoculação de
287 *Bradyrhizobium* sp. (BR-2001) com rizobactérias. Assim, novos estudos em campo devem ser
288 realizados para se definir o equilíbrio entre dosagens e bioprodutos, os quais definirão a
289 melhor utilização dos isolados para cada interação planta-bactéria.

290 Os resultados apresentados indicam que a maioria dos produtos biológicos, quando
291 associados com a co-inoculação de *B. elkanii*, com exceção do isolado AP-3, destacaram-se
292 como promotores de crescimento em soja avaliados pela produção de biomassa e maior área
293 foliar pela planta. As concentrações utilizadas de *Bacillus* proporcionaram algum benefício ao
294 crescimento da soja, sendo que a espécie de *Bacillus licheniformis*, a mistura de *Bacillus*
295 *licheniformis* + *Bacillus subtilis* apresentaram melhor desempenho, na maioria das variáveis
296 analisadas. Os tratamentos e concentrações utilizadas proporcionaram maior nodulação e peso
297 seco dos nódulos, favorecendo assim maior produção.

298

299 **Efeito de *Bradyrhizobium elkanii*, associada com *Bacillus*, sobre germinação de sementes** 300 **de soja.**

301 Os resultados obtidos com o desenvolvimento do hipocótilo e da radículas indicaram
302 que o isolado AP-3 na concentração de 10^9 UFC, *Bacillus licheniformis* na concentração de
303 200 g/50 kg de sementes, *Bacillus subtilis* nas concentrações de 50, 100 e 200 g/50 kg de

304 sementes e a mistura de *Bacillus subtilis* + *Bacillus licheniformis* na concentração de 100 g/50
305 kg de sementes foram mais eficientes para promover um aumento no desenvolvimento do
306 hipocótilo em relação a testemunha. Para o desenvolvimento das radículas os tratamentos mais
307 eficientes foram *Bacillus licheniformis* nas concentrações de 50 g e 200 g/50 kg de sementes e
308 *Bacillus subtilis* na concentração de 100 g/50 kg de sementes (Tabela 5).

309 Resultados semelhantes foram obtidos por Lazaretti & Bettiol (1997), utilizando um
310 formulado à base de *Bacillus subtilis*, os quais demonstraram que quando se empregava
311 maiores concentrações, principalmente, para as sementes de arroz e soja, onde os tratamentos
312 na maior dosagem, foram estatisticamente semelhantes ao tratamento fungicida. Este efeito
313 também foi observado por Lazzaretti (1993) em tratamentos de sementes de trigo, o qual
314 observou que o aumento na concentração de bactéria no meio ao quais as sementes foram
315 mergulhadas, resultava em um maior controle de patógenos e melhor desenvolvimento das
316 plântulas. Todavia, Ethur et al. (2006), quando trataram sementes de aveia com Agrotich®
317 (produto à base de *Trichoderma* spp. e resíduo de farinha de arroz), verificaram que houve um
318 aumento na incidência de *Rhizopus* sp., *Aspergillus niger* e *Penicillium* sp., demonstrando que
319 o bioprotetor não apresentou um controle efetivo em relação à testemunha no teste de
320 germinação. Yan et al. (2003), utilizando algumas linhagens de *Bacillus*, observaram um
321 aumento significativo em relação ao crescimento de tomates, quando aplicadas ao meio de
322 cultivo das plantas. Turner e Blackman (1991) verificaram que *B. subtilis* promoveu o
323 crescimento de plântulas de amendoim, resultando em um aumento de 3,5 a 37% na produção,
324 bem como melhorias na germinação, na emergência de plântulas, na nutrição da planta e

325 aumento do crescimento radicular enquanto que a inoculação com *B. licheniformis* CECT
326 5106 e *B. pumilus* CECT 5105 acentuou o crescimento de plântulas de *Pinus*.

327 Os tratamentos biológicos mostraram-se eficientes no desenvolvimento do hipocótilo,
328 reduzindo a contaminação por fungos nas sementes.

329

330 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

331 Araujo FF (2008) Inoculação de sementes com *Bacillus subtilis*, formulado com farinha de
332 ostras e desenvolvimento de milho, soja e algodão. *Ciência e Agrotecnologia*. 32:456-462.

333 Araújo WL, Marcon J, Maccheroni Junior W, Van Elsas JD, Van Vuurde JW, Azevedo JL
334 (2002) Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella*
335 *fastidiosa* in citrus plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 68:4906-4914.

336 Araujo ASF, Carneiro RFV, Bezerra AAC, Araujo FF (2010) Coinoculação rizóbio e *Bacillus*
337 *subtilis* em feijão-caupi e leucena: efeito sobre a nodulação, a fixação de N₂ e o crescimento
338 das plantas. *Ciência Rural* 40:182-185.

339 Bai Y, D'aoust F, Smith DL, Driscoll BT (2003). Isolation of plant growth-promoting *Bacillus*
340 strains from soybean root nodules. *Canadian Journal of Microbiology* 48:230–238.

341 Bloemberg, GV, Lugtenberg BJJ (2001). Molecular basis of plant growth promotion and
342 biocontrole by rhizobacteria. *Current Opinion in Plant Biology* 4:343-350.

343 Bohrer TRJ, Hungria M. (1998) Avaliação de cultivares de soja quanto à fixação biológica do
344 nitrogênio. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 33:937- 952.

- 345 Camacho M, Santamaria C, Temprano F, Rodriguez-Navarro DN, Daza A (2001) Co-
346 inoculation with *Bacillus* sp. CECT 450 improves nodulation in *Phaseolus vulgaris* L.
347 Canadian Journal of Microbiology 47:1058–1062.
- 348 Coelho LF, Freitas SS, Melo AMT, Ambrosano GMB (2007) Interação de bactérias
349 fluorescentes do gênero *Pseudomonas* e de *Bacillus* spp. com a rizosfera de diferentes plantas.
350 Revista Brasileira de Ciência do Solo 31:1413-1420.
- 351 Dashti N (1998) Plant growth promoting rhizobacteria accelerate nodulation and increase
352 nitrogen fixation activity by field grown soybean (*Glycine max* L. Merr) under short season
353 conditions. Plant and Soil 200:205-213.
- 354 Ethur LZ, Rocha EK, Milanesi P, Muniz MFB, Blume E (2006) Sanidade de sementes e
355 emergência de plântulas de nabo forrageiro, aveia preta e centeio submetidas a tratamentos
356 com bioprotector e fungicida. Ciência e Natura, 28:17-27.
- 357 Figueiredo MVB, Martinez CR, Burity HA & Chanway CP (2008) Plant growth promoting
358 rhizobacteria for improving nodulation and nitrogen fixation in the common bean (*Phaseolus*
359 *vulgaris* L.). World Journal Microbiology and Biotechnology 24:1187-1193.
- 360 Gomes AMA, Mariano RLR, Silveira EB, Mesquita JCP (2003) Isolamento seleção de
361 bactérias e efeito de *Bacillus* spp. na produção de mudas orgânicas de alface. Horticultura
362 Brasileira 21:699–703.
- 363 Haggag WM (2002) Sustainable agriculture management of plant diseases. Journal Biology
364 Sci. 2:280-284.

- 365 Hungria M (1999) Características biológicas em solos manejados sob plantio direto. In:
366 Reunión Bienal de la Red Latinoamericana de Agricultura Conservacionista, 5., Florianópolis.
367 Anais. Florianópolis, Empresa de Pesquisa Agropecuária e de Extensão Rural de Santa
368 Catarina. CD ROM.
- 369 Kolling J, Freire JRJ, Pereira JR, Kolling IG (1986) Resposta da soja à inoculação com níveis
370 de inóculo e ocorrência de serogrupos de *Rhizobium japonicum* em solo com população
371 estabelecida. In: Reunião Latino Americana sobre *Rhizobium*, 12, Campinas, 1984. Anais.
372 Campinas: Instituto Agronômico, 358-363.
- 373 Lazzaretti E (1993) Controle de fungos transportados por sementes de trigo com *Bacillus*
374 *subtilis*. Piracicaba, 1993. 112p. (Dissertação de Mestrado)-Escola Superior de Agricultura
375 Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo.
- 376 Lazzaretti E, Bettioli W (1997) Tratamento de sementes de arroz, trigo, feijão e soja com um
377 produto formulado à base de células e de metabólitos de *Bacillus subtilis*. Scientia agricola
378 54:89-96.
- 379 Lima SC, Lopes ES, Lemos EGM (1998) Caracterização de rizóbios (*Bradyrhizobium*
380 *japonicum*) e produtividade da soja. Scientia agricola 55:360-366.
- 381 Lopes ES, Giardini AR, Kihil RAS, Igue T (1976) Especificidade hospedeira e pré - seleção
382 de estirpes de *Rhizobium japonicum* para as variedades Santa-Rosa, Viçosa e IAC-2 de soja
383 (*Glycine max*) (L.) Merrill. Bragantia, 35:1-11.

- 384 Oliveira ALM, Urquiaga S, Baldani JI (2003) Processos e mecanismos envolvidos na
385 influência de microrganismos sobre o crescimento vegetal. Seropédica: Embrapa Agrobiologia
386 (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 161:40).
- 387 Pereira J, Mirian L, Aureliano E, Rodrigues J, Leite J. Carvalho F, Santos M & Da Paz C
388 (2008) Interação de *Rhizobium* com bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCPs)
389 na Cultura de Feijão Caupi (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.). In: Encontro Nacional de
390 Microbiologia Ambiental 11. Anais. Fortaleza. CD-ROM.
- 391 Rodríguez H, Fraga R, Gonzalez T, Bashan Y (2006) Genetics of phosphate solubilization and
392 its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant and Soil*,
393 287:15–21.
- 394 Schultze M, Kondorosi E, Ratet P, Buiré M, Kondorosi A (1994) Cell and molecular biology
395 of *Rhizobium* – plant interactions. *International Review Cytology* 156:1-75.
- 396 Silva VN, Silva LESF, Figueiredo MVB (2006) Atuação de rizóbios com rizobactérias
397 promotora de crescimento em plantas na cultura do caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp). *Acta*
398 *Science Agronomy* 28:407-412.
- 399 Silva LESF (2003) Fixação do N₂ no caupi (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) pela interação
400 *Bradyrhizobium* sp. x *Glomus clarum*. sob condições de estresse hídrico 2003. 100p
401 (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal Rural de Pernambuco – Recife-PE.

402 Silva VN, Silva LESF, Martínez CR, Seldin L, Burity HA, Figueiredo MVB (2007) Estirpes
403 de *Paenibacillus* promotoras de nodulação específica na simbiose *Bradyrhizobium-caupi*. Acta
404 Science Agronomy 29:331-338.

405 Silveira EB (2001) Bactérias promotoras de crescimento de planas e biocontrole de doenças.
406 In: Michereff SJ, BARROS R (Eds.). Proteção de Plantas na Agricultura Sustentável. Recife,
407 UFRPE.

408 Srinivasan M, Petersen DJ, Holl FB (1997) Influence of indoleacetic-acid producing *Bacillus*
409 isolates on the nodulation of *Phaseolus vulgaris* by *Rhizobium etli* under gnotobiotic conditions.
410 Canadian Journal of Microbiology 42:1006–1014.

411 Turner JT, Backman PA (1991) Factors relating to peanut yield increases following *Bacillus*
412 *subtilis* seed treatment. Plant Disease 75:347-353.

413 Yan Z, Reddy MS, Kloepper JW (2003) Survival and colonization of rhizobacteria in a tomato
414 transplant system. Canadian Journal of Microbiology 49:383–389.

415

416

417 **Tabela 1:** Efeito da concentração de *Bacillus subtilis* (Bs e AP-3) e *Bacillus licheniformis* (Bl)
 418 sobre o número de nódulos (1° experimento), dependente ou independentemente da presença
 419 de *Bradyrhizobium elkanii* (Be).

Conc.	<i>Bacillus</i>				Test	<i>B. elkanii</i>	
	AP-3	Bl	Bs	Bs + Bl		Com	Sem
A	28,2 aB	36,1 aB	33,9 aB	45,3 aA	33,9 aB	54,6 aA	16,3 aB
B	17,7 bB	34,7 aA	35,1 aA	26,5 bB	35,0 aA	50,0 aA	9,5 bB
C	12,8 bB	31,4 aA	24,1 bA	29,2 bA	24,1 bA	35,4 bA	13,2 aB
Com Be	15,7 cA	35,9 aA	38,0 aA	37,1 aA	29,6 bA		
Sem Be	12,5 aB	10,1 aB	7,4 aB	9,0 aB	7,6 aB		

420 Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre
 421 si pelo teste de Scott Knott. Os valores foram analisados conjuntamente e são médias de cada
 422 tratamento, independentemente da presença ou ausência de *Bradyrhizobium*. A (50g/50 kg de
 423 sementes e 10^7 UFC de AP-3) B (100 g/50 kg de sementes e 10^8 UFC de AP-3) C (200 g/50
 424 kg de sementes e 10^9 UFC de AP-3).

425

426

427 **Tabela 2:** Efeito da concentração de *Bacillus subtilis* (Bs e AP-3) e *Bacillus licheniformis* (Bl)
 428 sobre a área foliar (1° experimento), dependente ou independentemente da presença de
 429 *Bradyrhizobium elkanii* (Be).

Conc.	<i>Bacillus</i>				Test	<i>B. elkanii</i>	
	AP-3	Bl	Bs	Bs + Bl		Com	Sem
A	67,5 aA	71,6 bA	68,0 aA	71,0 aA	68,1 bA	75,9 aA	62,5 bB
B	71,6 aB	83,2 aA	72,1 aB	70,2 aB	69,8 bB	76,6 aA	65,3 bB
C	70,2 aA	79,3 aA	77,5 aA	75,5 aA	78,1 aA	80,6 aA	71,6 aB
Com Be	64,7 bA	73,4aA	72,9 aA	71,5 aA	71,0 aA		
Sem Be	62,1 aA	61,0 aB	60,8 aB	63,5 aB	63,0 aB		

430 Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre
 431 si pelo teste de Scott Knott. Os valores foram analisados conjuntamente e são médias de cada
 432 tratamento, independentemente da presença ou ausência de *Bradyrhizobium*. A (50g/50 kg de
 433 sementes e 10^7 UFC de AP-3) B (100 g/50 kg de sementes e 10^8 UFC de AP-3) C (200 g/50
 434 kg de sementes e 10^9 UFC de AP-3).

435

436

437 **Tabela 3:** Efeito da concentração de *Bacillus subtilis* (Bs e AP-3) e *Bacillus licheniformis* (Bl)
 438 sobre o peso seco da parte área (1° experimento), dependente ou independentemente da
 439 presença de *Bradyrhizobium elkanii* (Be).

Conc.	<i>Bacillus</i>				Test	<i>B. elkanii</i>	
	AP-3	Bl	Bs	Bs + Bl		Com	Sem
A	3,3 aA	3,8 bA	3,6 aA	3,8 aA	3,4 aA	4,0 bA	3,2 bB
B	3,7 aA	4,4 aA	4,2 aA	4,1 aA	3,9 aA	4,6 aA	3,5 bB
C	3,4 aA	4,2 aA	4,1 aA	4,1 aA	3,9 aA	4,1 bA	3,9 aB
Com Be	3,7 bA	4,2 aA	4,2 aA	4,3 aA	4,1 aA		
Sem Be	3,6 aA	3,7 aB	3,7 aB	3,7 aB	3,6 aB		

440 Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre
 441 si pelo teste de Scott Knott. Os valores foram analisados conjuntamente e são médias de cada
 442 tratamento, independentemente da presença ou ausência de *Bradyrhizobium*. A (50g/50 kg de
 443 sementes e 10^7 UFC de AP-3) B (100 g/50 kg de sementes e 10^8 UFC de AP-3) C (200 g/50
 444 kg de sementes e 10^9 UFC de AP-3).

445

446

447 **Tabela 4:** Efeito de *Bacillus subtilis* (Bs) e *Bacillus licheniformis* (Bl), co-inoculados com
 448 *Bradyrhizobium elkanii*, sobre altura, área foliar, peso de grãos, número de plantas por metro
 449 linear, número e peso de nódulos de soja desenvolvida no campo.

Variável	<i>Bradyrhizobium</i>	Testemunha	Bs	Bl	Bs+Bl
Altura (cm)	Com	47,02 aA	49,90 aA	51,78 aA	51,76 aA
	Sem	44,56 bA	52,98 aA	50,44 aA	46,44 bA
Área foliar (cm ²)	Com	141,33 aA	149,32 aA	152,15 aA	142,60 aA
	Sem	121,61 bA	151,28 aA	142,71 bA	127,28 aA
Peso de grãos (g)	Com	116,59 aA	124,46 aA	116,92 aA	131,35 aA
	Sem	109,58 aA	129,55 aA	113,35 aA	106,59 aA
Nº de plantas/m	Com	21,20 aA	21,60 aA	21,20 aA	21,60 aA
	Sem	22,00 aA	22,60 aA	23,80 aA	22,00 aA
Número de nódulos/planta	Com	7,40 cA	21,98 bA	14,84 cA	34,30 aA
	Sem	2,50 aA	1,44 aB	1,84 aB	1,18 aB
Peso de nódulos (g)	Com	0,066 bA	0,179aA	0,142 aA	0,217 aA
	Sem	0,034 aA	0,020 aB	0,025 aB	0,018 aB

450 Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre
 451 si pelo teste de Scott Knott.

452

453 **Tabela 5:** Efeito do tratamento de sementes de soja com *Bacillus subtilis* (AP-3), *Bacillus*
 454 *subtilis* (BS) e *Bacillus licheniformis* (BL) no desenvolvimento (cm) do hipocótilo e da
 455 radículas.

Tratamento		
	hipocótilo	radículas
AP310 ⁷ UFC	6,2 b	8,8 c
AP310 ⁸ UFC	6,3 b	8,9 c
AP310 ⁹ UFC	8,0 a	9,0 c
BL 50 g/50 kg de semente	6,7 b	11,1 b
BL 100 g/50 kg de semente	6,5 b	9,5 c
BL200 g/50 kg de semente	8,0 a	11,7 b
BS 50 g/50 kg de semente	7,3 a	8,9 c
BS 100 g/50 kg de semente	7,7 a	12,9 a
BS 200 g/50 kg de semente	7,4 a	8,6 c
BL+BS 50 g/50 kg de semente	7,1 b	9,9 c
BL+BS 100 g/50 kg de semente	7,3 a	10,2 c
BL+BS 200 g/50 kg de semente	6,9 b	9,7 c
FUNGICIDA	6,9 b	9,2 c
TESTEMUNHA	6,8 b	9,0 c

456 Médias seguidas de mesma letra coluna não diferem entre si pelo teste de Scott Knott ($\alpha =$
 457 5%).

5. CONCLUSÕES GERAIS

Todas as concentrações de bicarbonato de potássio (Kaligreen[®]) foram eficientes na redução do oídio da soja, porém as concentrações de 0,5 % a 1% provocaram fitotoxidez nas plantas;

Bicarbonato de potássio provoca murchamento e redução na formação de conídios de *Erysiphe diffusa*.

Os óleos de café torrado ou cru apresentaram efeito protetor contra a ação de *Erysiphe diffusa* e o uso desses óleos promoveu uma camada protetora na face adaxial das plantas.

Produtos à base de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*, quando associados com a co-inoculação de *B. elkanii*, destacaram-se como promotores de crescimento em soja avaliados pela produção de biomassa e maior área foliar pela planta.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, A. M. et al. Caracterização de isolados de oídio de soja, feijão, girassol e plantas daninhas no Brasil usando sequências de rDNA-ITS. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, DF, v. 33, n. 1, p. 21-26, 2008.

ANTER, E. A.; ABD ELGAWAD, M. M.; ALI, A. H. Effects of fenamiphos and biocontrol agents on cotton growing in nematode-infested soil. **Anzeiger fuer Schaedlingskunde Pflanzenschutz Umweltschutz**, Parey, Berlin, v. 68, p. 12-4, 1995.

ARAÚJO, W. L. et al. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xilella fastidiosa* in citrus plants. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 4906-4914, 2002.

ARAÚJO, F. F.; HENNING, A.; HUNGRIA, M. Phytohormones and antibiotics produced by *Bacillus subtilis* and their effects on seed pathogenic fungi and on soybean root development. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Dordrecht, v. 21, p. 1639- 1645, 2005.

ATKINSON, D. C.; WATSON, A. The beneficial rhizosphere: a dynamic entity. **Applied Soil Ecology**, v. 15, p. 99-104, 2000.

BAI, Y.; SOULEIMANOV, A. E.; SMITH, D. L. An inducible activator produced by *Serratia proteamaculans* strain and its soybean growth promoting activity under greenhouse conditions. **Journal Experimental Botany**, Colchester, v. 53, p. 1495–1502, 2002a.

BAI, Y. et al. Isolation of plant growth-promoting *Bacillus* strains from soybean root nodules. **Canadian Journal Microbiology**, Ottawa, v. 48, p. 230–238, 2002b.

BAKKER, P. A. H. M. et al. The role of siderophores in potato tuber yield increase by *Pseudomonas putida* in a short rotation of potato. **Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 92, p. 249-256, 1986.

BETTIOL, W.; MIGHELI, Q.; GARIBALDI, A. Controle, com matéria orgânica, do tombamento do pepino, causado por *Pythium ultimum* Trow. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 32, n. 1, p. 57-61, 1997.

BETTIOL, W.; ASTIARRAGA, B. D. Controle de *Sphaerotheca fuliginea* em abobrinha com resíduo da fermentação glutâmica do melão e produto lácteo fermentado. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 23, n. 4, p. 431-435, 1998.

BETTIOL, W.; GHINI, R.; MORANDI, M. A. B. Alguns métodos alternativos para o controle de doenças de plantas disponíveis no Brasil. In: VENZON, M.; PAULA JUNIOR, T. J.; PALLINI, A. (Ed.). **Controle alternativo de pragas e doenças**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2005. p. 163-183.

BETTIOL, W. Productos alternativos para el manejo de enfermedades en cultivos comerciales. **Fitosanidad**, Ciudad de La Habana, v. 10, n. 2, p. 85-98, 2006.

BIZI, R. M. **Alternativas de controle do mofo-cinzento e do oídio em mudas de eucalipto**. 2006. 80 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal)– Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

BLAT, S. F. et al. Efeito de fosfato monopotássico no controle do oídio do pimentão. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 31, p. 268-270, 2005.

BLOEMBERG, G. V.; LUGTENBERG, B. J. J. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. **Current Opinion in Plant Biology**, Wassenaarweg, v. 4, p. 343-350, 2001.

BLUM, L. E. B et al. Fungicidas e misturas de fungicidas no controle do oídio da soja. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 27, n. 2, p. 316-318, 2002.

BOER, A. S.; DIDERICHSEN, B. On the safety of *Bacillus subtilis* and *B. amyloliquefaciens*: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 36, p. 1- 4, 1991.

BOKERT, C. M. et al. **Seja o doutor da sua soja**. Piracicaba: Potafos, 1994. 16 p. (Informações agronômicas, 66).

BROWN, M. E. Seed and root bacterization. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 12, p. 181-97, 1974.

BUCHANAN, R. E.; GIBBONS, N. G. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 8. ed. Baltimore: The Willians & Wilkens, 1975. 1268 p.

CARNEIRO, S. M. T. P. G. Efeito de extratos de folhas e do óleo de nim sobre o oídio do tomateiro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 29, n. 3, p. 262-265, 2003.

CELOTO, M. I. B et al. Atividade antifúngica de extratos de plantas a *Colletotrichum gloeosporioides*. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 30, p. 1-5, 2008.

CHEN, Y.; MEI, R.; LIU, L.; KLOEPPER, J. W. The use of yield increasing bacteria (YIB) as plant growth-promoting rhizobacteria in Chinese agriculture. In: UTKHEDE, R. S.; GUPTA, V. K. **Management of soil born diseases**. Ludhiana: Kalyani Publishers, 1996. p. 165-184.

CHIARINI, L. et al. Inoculation of *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorencens* and *Enterobacter* sp. On Sorghum bicolor: root colonization and plant growth promotion of dual strain inocula. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 30, p. 81-87, 1997.

CHANWAY, C. P.; NELSON, L. M. Field and laboratory studies of *Triticum aestivum* L. inoculated with co-existent growth-promoting *Bacillus* strains. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 22, n. 6, p. 789-795, 1990.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. (Brasil). Acompanhamento da safra brasileira: grãos-safra 2010/2011. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_01_06_08_41_56_boletim_graos_4o_lev_safra_2010_2011..pdf> . Acesso em: 16 ago. 2011.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa em Soja (Londrina, PR). **Tecnologia de produção de soja- Região Central do Brasil 2001/2002**. Londrina, 2001. 267 p. (Documentos, 167).

FERNANDES, M. C. A. Emprego de métodos alternativos de controle de pragas e doenças na olericultura. In: CONGRESSO IBERO-AMERICANO SOBRE UTILIZAÇÃO DE PLÁSTICO NA AGRICULTURA, 2.; SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE PRODUÇÃO DE PLANTAS MEDICINAIS, AROMÁTICAS E CONDIMENTARES 1., 2000, São Pedro. **Trabalhos...** Brasília: SOB/FCAV-UNESP, 2000. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 18, p. 110-112, 2000. Suplemento.

FIGUEIREDO, M. V. B. et al. Drought stress response on some key enzymes of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) nodule metabolism. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, London, v. 23, p. 187-193, 2007.

FREITAS, S. S.; PIZZINATTO, M. A. Interações de *Pseudomonas* sp. e *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* na rizosfera de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*). **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 17, n. 2, p. 105-112, 1991.

FREITAS, S. S.; DE MELO, A. M. T.; DONZELI, V. P. Promoção de crescimento de alface por rizobactérias. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 27, n. 1, p. 61-70, 2003.

FRINDLENDER, M.; INBAR, J.; CHET, I. Biological control of soilborne plant pathogens by a b-1,3-glucanase producing *Pseudomonas cepacia*. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 25, p. 1211-1221, 1993.

GAZZONI, D. L.; YORINORI, J. T. **Manual de identificação de pragas e de doenças da soja**. Brasília, DF: **EMBRAPA SPI**, 1995. 128 p. (Manual de Identificação de Pragas e Doenças, 1).

HANDELSMAN, J. et al. Biological control of damping-off of alfalfa seedlings with *Bacillus cereus* UW85. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, p. 713-718, 1990.

HARTMAN, G.; SINCLAIR, J.; RUPE, J. **Compendium of soybean diseases**. Saint Paul APS, 1999. 128 p.

HOFFMANN-HERGARTEN, S.; GULATI, M. K.; SIKORA, R. A. Yield response and biological control of *Meloidogyne incognita* on lettuce and tomato with rhizobacteria. **Journal of Plant Diseases and Protection**, Germany, v. 105, n. 4, p. 349-358, 1998.

HORST, R. K.; KAWAMOTO, S.O.; PORTER L. L. Effect of sodium bicarbonate and oils on the control of powdery mildew and black spot of roses. **Plant Disease**, St. Paul, v. 76, p. 247-251, 1992.

GASONI, L. et al. Yield response of lettuce and potato to bacterial fungal inoculants under field conditions in Cordoba (Argentina). **Journal of Plant Diseases and Protection**, Germany, v. 108, p. 530-535, 2001.

GRAY, E. J.; SMITH, D. L. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. **Soil Biology Biochemistry**, Oxford, v. 37, p. 395-412, 2005.

GUERREIRO, T. R. **Seleção de isolados de *Bacillus* spp promotores de crescimento de milho**. 2008. 56 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, 2008.

KIMURA, M. K. et al. Eficiência do bicarbonato de sódio no controle de oídio (*Erysiphe cichoracearum*) em pimentão (*Capsicum annum*). **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 23, n. 1, p. 57, 1997.

KLOEPFER, J. W. Plant root-bacterial interactions in biological control of soilborne diseases and potential extension to systemic and foliar diseases. **Australasian Plant Pathology**, Rockhampton, v. 28, n. 1, p. 21-26, 1999.

KRUGNER, T. L.; AUER, C. G. Doenças dos eucaliptos. In: KIMATI, H. et al. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, p. 319-332.

KUC, J. Concepts and direction of induced systemic resistance in plants its application. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 107, p. 7-12, 2001.

KUMAR, B. S. D. Disease suppression and crop improvement through fluorescens pseudomonads isolated from cultivated soils. **World Journal of Microbiology and Biotechnology, Oxford**, v. 14, n. 5, p. 735 -741, 1998.

KURITA, N.; MAKOTO, M.; KURANE, R.; TAKAHARA, Y. Antifungal activity of components of essential oils. **Agricultural and Biological Chemistry, Tokyo**, v. 45, n. 1, p. 945-952, 1981.

LAVIE, S.; STOTZKY, G. Interactions between clay minerals and siderophores affect the respiration of *Histoplasma capsulatum*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 51, p. 74-79, 1986.

LEEMAN, S. et al. Induction of systemic resistance against *Fusarium wilt* of radish by lipopolysaccharides of *Pseudomonas fluorescens*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 85, p. 1021-1027, 1995.

LEHMAN, S. G. Powdery mildew of soybean. **Phytopathology**, St. Paul, v. 37, p. 434, 1947.

LI, D.; ALEXANDER, M. Co-inoculation with antibiotic-producing bacteria to increase colonization and nodulation by rhizobia. **Plant and Soil**, Netherlands, v. 108, p. 211-219, 1988.

LIU, Z. L.; SINCLAIR, J. B. Enhanced soybean plant growth and nodulation by *Bradyrhizobium* in the presence of strains of *Bacillus megaterium*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 80, n. 10, p. 1024, 1990.

LOBATO, A. K. S. Ação do óleo essencial de *Piper aduncum* L. utilizado como fungicida natural no tratamento de sementes de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, p. 915-917, 2007.

LUGTENBERG, B. J. J.; CHIN-A-WOENG, T. F. C.; BLOEMBERG, G. V. Microbe-plant interactions: Principles and mechanisms. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 81, p. 373-383, 2002.

MAHAFFEE, W. F.; BACKMAN, P. A. Effects of seed factors on spermosphere and rhizosphere colonization of cotton by *Bacillus subtilis* GB03. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 83, p. 1120-1125, 1993.

MEDEIROS, F. H. V. **Mecanismos de ação e atividade de frações do leite no controle biológico do oídio da abobrinha**. 2006. 64 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)– Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

MEDICE, R. et al. Óleos essenciais no controle da ferrugem asiática da soja *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 1, p. 83-90, jan./fev. 2005.

MEDICE, R. **Produtos alternativos no manejo da ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*) da soja**. 2007. 102 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

MELO, I. S. de. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: MELO, I. S. de; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa, CNPMA, 1998. p. 17-67.

MENEZES, J. P. **Controle biológico**. Agronline.com.br. 2006. Disponível em: <<http://www.agronline.com.br/artigos/artigo.php?id=42>>. Acesso em: 10 ago. 2011.

MERRIMAN, P. R. et al. Effect of seed inoculation with *Bacillus subtilis* and *Streptomyces griseus* on the growth of cereals and carrots. **Australian Journal of Agricultural Research**, Victoria, v. 25, p. 219-226, 1974.

MICHEL, C. A.; REIS, E. M. Controle químico do oídio e do complexo de doenças de final de ciclo na cultura da soja. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília-DF, v. 23, p. 260, 1998.

MIGNUCCI, J. S.; LIM, S. M.; HEPPERLY, P. R. Effects of temperature on reactions of soybean seedlings to powdery mildew (*Microspora diffusa*). **Plant Disease Reporter**, Beltsville, v. 61, p. 122-124, 1977.

MIYASAKI, K. T.; GENCO, R. J.; WILSON, M. Antimicrobial properties of hydrogen peroxide and sodium bicarbonate individually and in combination against selected oral Gram-negative facultative bacteria. **Journal of Dental Research**, Washington, DC, v. 65, p. 45-48, 1986.

NANDAKUMAR, R. et al. Induction of systemic resistance in rice against sheath blight disease by *Pseudomonas fluorescens*. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 33, p. 603-612, 2001.

NOTÍCIAS AGRÍCOLAS. USDA reduz safras e estoques de milho e soja dos EUA na safra 11/12. Disponível em:< <http://www.noticiasagricolas.com.br/noticias/usda/94217-usda-reporta-severa-reducao-nas-safras-de-milho-e-soja-dos-eua.html>>. Acesso em: 17 ago. 2011.

OLIVEIRA, V. R. et al. Controle de oídio em moranga híbrida. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 20, n. 2, p. 267, jul. 2002. Suplemento 2.

OLSEN, N. W.; MISAGHI, I. J. Plant growth promoting activity of heat-killed cells of *Pseudomonas fluorescens*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 71, p. 1006, 1981.

OWEN, A.; ZDOR, R. Effect of cyanogenic rhizobacteria on the growth of velvetleaf (*Abutilon theophrasti*) and corn (*Zea mays*) in autoclaved soil and the influence of supplemental glycine. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 33, p. 801-809, 2001.

PEREIRA, J. C. R et al. Controle de oídio do pepino pelo uso de bicarbonato de sódio em condições de casa de vegetação. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília-DF, v. 20, p. 359, 1995. Resumo.

PEREIRA, R. B. et al. Extrato de casca de café, óleo essencial de tomilho e acibenzolar-S-metil no manejo da cercosporiose-do-cafeeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 43, n. 10, p. 1287-1296, 2008.

PHILLIPS, D. V. Stability of *Microsphaera diffusa* and the effect of powdery mildew on yield of soybean. **Plant Disease**, St. Paul, v. 68, p. 953-956, 1984.

PIAO C. G.; TANG W. H.; CHEN, Y. X. Study on the biological activity of yield-increasing bacteria. **China Journal Microecology**, Dalian, v. 4, p. 55-62, 1992.

PIERRE, R. O. et al. Extratos de plantas medicinais e aromáticas na inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* de frutos de goiaba. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 41., 2008, BELO HORIZONTE. **Tropical Plant Pathology. Anais...** Brasília, DF: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2008. v. 33, p. S123-S123.

PICININI, E. C.; FERNANDES, J. M. **Doenças da soja**: diagnose, epidemiologia e controle. Passo Fundo: EMBRAPA Trigo, 1998. 90 p.

REUVENI, M.; AGAPOV, V.; REUVENI, R. Controlling powdery mildew caused by *Sphaerotheca fuliginea* in cucumber by foliar sprays of phosphate and potassium salts. **Crop Protection**, Guildford, v. 15, p. 49-53, 1996.

RYDER, M. H et al . Use of strains of *Bacillus* isolated in China to suppress take-all and rhizoctonia root rot, and promote seedling growth of glasshouse grown wheat in Australian soils. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 31, p. 19–29, 1999.

- ROMEIRO, R. S.; BATISTA, U. G. **Preliminary results on PGPR research at the Universidade Federal de Viçosa, Brasil**, 2002. Disponível em: <<http://www.ufv.br/dfp/bac/Cordoba.html>>. Acesso em: 12 out. 2010.
- SANTOS, A. P. dos; BETTIOL, W. Potencial de *Lecanicillium longisporum* no controle do oídio da abobrinha. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, DF, v. 33, n. 3, p. 179, 2008.
- SARTORATO, A.; YORINORI, J. T.; Oídios de leguminosas: feijoeiro e soja. In: REIS, E.M., MEDEIROS, C.A. & CASA, R.T. Epidemia de oídio da soja, causada por *Microsphaera diffusa*, na safra 1996/97, no RS. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 22, p. 300-301, 1997. Resumo.
- SAWADA, E.; AZEVEDO, L. A. S. Avaliação de fungicidas no controle do oídio (*Erysiphe polygoni* DC.) da soja. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 22, p. 306, 1997.
- SCHROTH, M. N.; HANCOCK, J. G. Disease suppressive soil and root colonizing bacteria. **Science**, Washington, DC, v. 216, p. 1376-1381, 1982.
- SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. da S. Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos. **Revista Floresta**, Curitiba, v. 30, n. 1/2, p. 129-137, 2000.
- SCORTHICHINI, M. et al. Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) seed decay association with *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn, in Gabon. **FAO Plant Protection Bulletin**, Roma, v. 2, p. 87-91, 1989.
- SILVA, M. B. et al. Desenvolvimento de produtos à base de extratos de plantas para o controle de doenças de plantas. In: VENEZON, M.; PAULA JÚNIOR, T. J. de; PALLINI, A. (Ed.). **Controle alternativo de pragas e doenças**. Viçosa, MG: EPAMIG/CTZM, 2005. p. 221-246.
- SILVA, V. N.; SILVA, L. E. S. F.; FIGUEIREDO, M. V. B. Atuação de rizóbios com rizobactérias promotora de crescimento em plantas na cultura do caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp). **Acta Science Agronomy**, Maringá, v. 28, p. 407-412, 2006.
- SILVA, V. N et al. Estirpes de *Paenibacillus* promotoras de nodulação específica na simbiose *Bradyrhizobium*-caupi. **Acta Science Agronomy**, Maringá, v. 29, p. 331-338, 2007.
- SILVEIRA, E. B. Bactérias promotoras de crescimento de plantas e biocontrole de doenças. In: MICHEREFF, S. J.; BARROS, R. (Ed.). **Proteção de plantas na agricultura sustentável**. Recife: UFRPE, p.71-100, 2001.

SILVEIRA, A. B. **Isolamento e caracterização de linhagens de *Bacillus* e *Paenibacillus* promotores do crescimento vegetal em lavouras de arroz e trigo no Rio Grande do Sul** (2008). 113 f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

SOTTERO, A. N. **Colonização radicular e promoção de crescimento vegetal por rizobactérias**. 2003. 47 f. Dissertação (Mestrado em agricultura tropical e subtropical) - Instituto Agrônomo, Campinas, 2003.

STADNIK, M. J.; RIVERA, M. C. **Oídios**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2001. 484 p.

VAN LOON, L. C.; BAKKER, P. A. H. M.; PIETERSE, C. M. J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 36, p. 453-483, 1998.

STAMFORD, N. P et al. Nitrogen fixation and growth of cowpea (*Vigna unguiculata*) and yam bean (*Pachyrhizus erosus*) in a sodic soil as affected by gypsum and sulphur inoculated with *Thiobacillus* and rhizobial inoculation. **Tropical Grasslands**, Brisbane, v. 37, n. 2, p. 1-9, 2003.

TAKAMATSU, S. et al. Two *Erysiphe* species associated with recente outbreak of soybean powdery mildew: results of molecular phylogenetic analysis based on nuclear rDNA sequences. **Mycoscience**, Tokyo, v. 43, n. 4, p. 333- 341, May 2002.

THRANE, C. et al. Viscosinamide-producing *Pseudomonas fluorescens* DR54 exerts a biocontrol effect on *Pythium ultimum* in sugar beet rhizosphere. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 33, p. 139-146, 2000.

TURNER, J. T.; BACKMAN, P. A. Factores relating to peanut yield increases following *Bacillus subtilis* seed treatment. **Plant Disease**, St. Paul, v. 75, p. 347-353, 1991.

WILSON, C. L.; SOLAR, J. M.; GHAOUTH, A. E.; WINIEWSKI, M. E. Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 81, p. 204-210, 1997.

YORINORI, J.T. **Doenças da soja no Brasil**. Soja no Brasil Central. Campinas: Fundação Cargill, 1986. p.301-363.

YORINORI, J. T et al. Doenças da soja e seu controle. In: ARANTES, N. E.; SOUZA, P. I. M de. **Cultura do soja nos Cerrados**. Piracicaba: POTAFOS, 1993. p. 333-397.

YORINORI, J. T. Situação atual das doenças potenciais no Cone Sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 2., 2002, Foz do Iguaçu. **Anais...** Londrina: Embrapa Soja, 2002. p.171-186.

YORINORI, J. T. Soja (*Glycine max* (L.) Merrill) - controle de doenças. In: RIBEIRO do VALE, F. X.; ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Controle de doenças de plantas**. Viçosa: UFV/MAA, 1997. v. 2, cap. 21, p. 953-1023.

YUEN, G. Y.; SCHROTH, M. N. Interactions of *Pseudomonas fluorescens* strain E6 with ornamental plants and its effect on the composition of root-colonizing microflora. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 76, p. 176-180, 1986.

ZAMBONELLI, A. et al. Effects of essential oils on phytopathogenic fungi in vitro. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 144, n. 9, p. 491-494, 1996.

ZHANG, F. E.; SMITH, D. L. Genistein accumulation in soybean (*Glycine max* L. Merr.) root systems under suboptimal root zone temperatures. **Journal Experimental Botany**, Huddersfield, v. 47, p. 785-792, 1996.

ZIV, O.; HAGILADI, A. Controlling powdery mildew in euonymus with polymer coatings and bicarbonate solutions. **HortScience**, Pleasanton, v. 28, p. 124-126, 1993.

ZIV, O.; ZITTER, T. A. Effects of bicarbonates and film-forming polymers on cucurbit foliar diseases. **Plant Disease**, St Paul, v. 76, p. 513- 517, 1992.