



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Botucatu



DALTON VINICIO DORIGHELLO

**VERSATILIDADE DE *Bacillus* spp. NO CONTROLE BIOLÓGICO DE
DOENÇAS DE PLANTAS E NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE SOJA**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrônomicas da Unesp – Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Agronomia (Proteção de Plantas).

BOTUCATU
2017

DALTON VINICIO DORIGHELLO

**VERSATILIDADE DE *Bacillus* spp. NO CONTROLE BIOLÓGICO DE
DOENÇAS DE PLANTAS E NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE SOJA**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrônômicas da Unesp – Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Agronomia (Proteção de Plantas).

Orientador: Dr. Wagner Bettiol

BOTUCATU
2017

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

D697v Dorighello, Dalton Vinicio , 1985-
Versatilidade de *Bacillus* spp. no controle biológico de doenças de plantas e na promoção de crescimento de soja / Dalton Vinicio Dorighello.- Botucatu :[s.n.], 2017
135 p. : grafs., tabs.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2017
Orientador: Wagner Bettiol
Inclui bibliografia

1. Ferrugem da soja (Doença). 2. *Bacillus* (Bacteria).
3. Plantas - Doenças e pragas. 4. Ferrugem asiática - Controle biológico. I. Bettiol, Wagner. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Câmpus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas. III. Título.

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte"

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: VERSATILIDADE DE *Bacillus* spp. NO CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS DE PLANTAS E NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE SOJA.

AUTOR: DALTON VINICIO DORIGHELLO

ORIENTADOR: WAGNER BETTIOL

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em AGRONOMIA (PROTEÇÃO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:

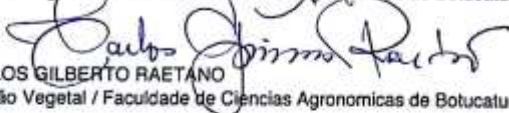
Prof. Dr. WAGNER BETTIOL
Melo Ambiente / EMBRAPA



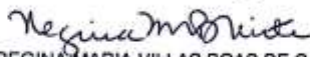
Prof. Dr. ANTONIO CARLOS MARINGONI
Dep de Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrômicas de Botucatu



Prof. Dr. CARLOS GILBERTO RAETANO
Dep de Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrômicas de Botucatu



Prof. Dra. REGINA MARIA VILLAS BOAS DE CAMPOS LEITE
/ EMBRAPA SOJA



Prof. Dr. MARCELO AUGUSTO BOECHAT MORANDI
/ EMBRAPA



Botucatu, 02 de junho de 2017

DEDICATORIA

Aos meus pais, Vinicio Dorighello e Ivani Luvizotto Dorighello, pela dedicação, pelo incentivo e por tudo que fizeram por mim durante toda minha vida.

Às minhas irmãs, Cristiane e Tatiane, pelo carinho. Aos meus cunhados, Júlio e Márcio, pelos bons momentos.

À Mariana Modanez, minha noiva e futura esposa (09-09-2017), por estar ao meu lado durante toda a minha caminhada acadêmica e profissional, pela paciência, pelo incentivo, pela força e, principalmente, pelo companheirismo e amor.

Aos meus avós, Pedro Dorighello e Ondina Dorighello (*in memorian*).

Ao Campi (*in memorian*), muitas saudades!

Ao Vicente Ferreira, meu tutor nos serviços rurais que, como um pai, foi também meu conselheiro e amigo.

Aos momentos de dificuldade que me tornaram mais forte e maduro.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pois sem Ele nada é possível.

Ao meu orientador Dr. Wagner Bettiol que, apesar de todas as suas responsabilidades profissionais e familiares, se manteve presente durante esses anos e me possibilitou aprendizados que levarei para toda a vida. Agradeço também pelas conversas, conselhos, merecidos puxões de orelhas e por me mostrar, mesmo que involuntariamente, com que dedicação e gentileza devo tratar minha futura esposa e filhos.

À UNESP/FCA, pela oportunidade de realização do curso.

À Embrapa Meio Ambiente e à Embrapa Soja, por cederem a estrutura e materiais para a condução dos ensaios.

À Dra. Regina Maria Villas Bôas de Campos Leite, pela ajuda e incentivo.

À CAPES, pela concessão da bolsa de auxílio aos estudos.

Ao Fabio Brandi da Bayer®, pelos materiais cedidos.

Ao Dr. Nilson Molina Maia do Instituto Agrônomo de Campinas, pela extração e fornecimento dos óleos de café.

Às Dra. Fabiana Garboggini e Dra. Nataly Quiñones, por me possibilitarem os primeiros passos em biologia molecular.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Proteção de Plantas): Dr. Antônio Carlos Maringoni, Dra. Renate Krause Sakate, Dra. Silvia Renata Siciliano Wilcken, Dra. Raquel Ghini, Dr. Edson Luiz Furtado, Dr. Wagner Bettiol e Dr. Carlos Gilberto Raetano, pelo aprendizado nas disciplinas.

Ao Dr. Cristiano Almeida, pelas esclarecedoras conversas sobre métodos estatísticos.

Aos companheiros de república “das antigas”: Carlos Eduardo, Daniel, Lúcio, Renato, André e, especialmente, Cassiano Forner, pelo companheirismo, pelas conversas e ajuda nos trabalhos.

Aos companheiros de república: Thiago, Carlos Albuquerque, Sr. Wilson e Matheus.

Aos amigos de curso e trabalho: Mércia, Regiane, Michelle e Larissa.

Às técnicas do LMA da Embrapa Meio Ambiente: Anamaria, Elke, Roseli e Márcia, pela ajuda e pelos bons momentos que passamos juntos; e aos funcionários: Henrique, Rafa, Celinha e Julius, pela colaboração neste trabalho.

À equipe da Fitopatologia da Embrapa Soja: Allan, Ângelo e Tia Alda, pelos bons momentos e ajuda na condução do trabalho a campo.

A todos meus companheiros de trabalho da Faculdade de Ensino Superior Santa Bárbara (FAESB), em especial à Carla Barreto, Thiago Mezette, Lilian Faustino e Odair Ferreira.

A todos meus companheiros de trabalho da Itatijuca Biotech®.

A todos meus companheiros de trabalho da MODO Topografia-Geo-Ambiental.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

RESUMO

O mercado de produtos de controle biológico, principalmente os que possuem isolados de *Bacillus* spp. em sua formulação, tem aumentado significativamente, devido às exigências de diminuição do uso de agrotóxicos e maior sustentabilidade do segmento agrícola. Assim, o presente trabalho teve por objetivos: 1- Avaliar o potencial de bactérias do gênero *Bacillus* no controle de diferentes doenças de plantas; 2- Selecionar isolados de *Bacillus* spp. promotores de crescimento da soja e antagonistas a *Sclerotinia sclerotiorum*; 3- Avaliar o potencial de um produto comercial à base de *B. subtilis* QST 713 e outro à base de óleo de café torrado para compor um programa de manejo da ferrugem-asiática da soja (*Phakopsora pachyrhizi*) em aplicação sequencial ou alternada com um fungicida. Inicialmente foi avaliado o efeito de *B. subtilis*, *B. firmus* e *B. amyloliquefaciens* no controle dos patógenos *Erysiphe diffusa*, *Podosphaera xanthii*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *P. pachyrhizi*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, *Colletotrichum lindemuthianum* e *Corynespora cassiicola* em condições controladas. Neste estudo, nenhum dos isolados controlou *Erysiphe difusa* e *Podosphaera xanthii*. Em folhas destacadas, todos os isolados reduziram o diâmetro da lesão de *S. sclerotiorum* e a severidade de *P. pachyrhizi*, sendo mais efetivos com aplicação preventiva. *B. subtilis*, *B. firmus* e *B. amyloliquefaciens* também inibiram o desenvolvimento de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, *C. cassiicola* e *C. lindemuthianum*. No entanto, apenas *B. amyloliquefaciens* inibiu o desenvolvimento de *F. solani*. Todos os isolados de *Bacillus* diminuíram a germinação dos esporos destes patógenos, exceto os de *C. lindemuthianum*. Os isolados *B. subtilis*, *B. firmus* e *B. amyloliquefaciens* possuem potencial para serem explorados como agentes de biocontrole para as doenças testadas, exceto para os oídios. Porém, novos testes devem ser realizados em condições reais de ocorrência das doenças. Também foi realizada seleção de bactérias do gênero *Bacillus* para promoção de crescimento de plantas de soja e antagonismo a *S. sclerotiorum*. Foram selecionados oito isolados promissores em promover crescimento *in vivo*, os quais foram, posteriormente, avaliados em casa-de-vegetação em relação a capacidade de promoverem crescimento e sobre a atividade das enzimas relacionadas à defesa das plantas, por meio da inoculação de sementes, com ou sem a co-inoculação do

Bradyrhizobium japonicum. Os resultados demonstraram que a seleção realizada *in vivo* para promotores de crescimento foi eficiente, pois todos os isolados selecionados diferiram da testemunha em pelo menos um dos componentes avaliados. Os isolados de *Bacillus* AP-3, AP-25, AP-51, AP-106, AP-117, AP-40, QST-713 e QST-2808 promoveram crescimento de plantas de soja e inibiram, significativamente, *S. sclerotiorum*. O isolado de *Bacillus* AP-25 (*Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum*) aumentou a atividade da peroxidase. Em condições de campo, o isolado de *B. subtilis* QST 713 e óleo de café torrado foram utilizados em aplicações sequencias e alternadas com o fungicida Piraclostrobina + Epoxiconazol para controle da ferrugem asiática da soja. Os resultados dos dois ensaios nos campos experimentais mostraram que as aplicações sequenciais do óleo de café, do produto à base de *Bacillus* e do fungicida reduziram, em média, 31%, 45% e 68% respectivamente, a área abaixo da curva de progresso da doença. Apesar disso, apenas o tratamento com a aplicação sequencial do produto contendo *B. subtilis* apresentou a mesma produtividade e peso de 100 sementes do tratamento com a aplicação sequencial de fungicida. O isolado de *B. subtilis* QST 713 pode ser indicado para compor um programa de manejo da ferrugem asiática da soja em condições de baixa intensidade da doença.

Palavras-chave: *Bacillus* spp., doenças de plantas, promoção de crescimento, *Glycine max*

ABSTRACT

The market of products for biological control, especially formulations using *Bacillus* spp., has increased significantly, due to the requirements for the reduction of the use of agrochemicals in crop protection and sustainability of the agricultural sector. The objectives of this thesis were: 1- To evaluate the potential of *Bacillus* in plant disease control; 2- To select isolates of *Bacillus* spp. for growth promotion of soybean and antagonists to *Sclerotinia sclerotiorum*; 3- To evaluate the potential of a commercial product based on *B. subtilis* QST 713 and another product based on roasted coffee oil in order to compose a management program for asian soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in sequential or alternating application with a fungicide. Initially, the effect of *B. subtilis*, *B. firmus* and *B. amyloliquefaciens* on the control of pathogens *Erysiphe diffusa*, *Podosphaera xanthii*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *P. pachyrhizi*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, *Colletotrichum lindemuthianum* and *Corynespora cassiicola* was evaluated under controlled conditions. In this study, *Bacillus* isolates did not controlled *Erysiphe diffusa* and *Podosphaera xanthii*. All isolates were effective in reducing the diameter of the *S. sclerotiorum* lesion and the severity of *P. pachyrhizi*, being more effective by preventive application in detached leaf. *B. subtilis*, *B. firmus* and *B. amyloliquefaciens* inhibited the mycelial growth of *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, *C. cassiicola* and *C. lindemuthianum*. However, only *B. amyloliquefaciens* inhibited *F. solani*. All *Bacillus* isolates inhibited spore germination of these pathogens, except for *C. lindemuthianum*. The isolates of *B. subtilis*, *B. firmus* and *B. amyloliquefaciens* have potential to be explored as biocontrol agents for the evaluated diseases, except for powdery mildew. Nevertheless, new tests must be performed under real conditions of disease occurrence. Selection of *Bacillus* isolate was carried out for soybean growth promotion and antagonism to *S. sclerotiorum*. Eight isolates were selected for growth promotion *in vivo*, which were subsequently evaluated in greenhouse for growth promotion and for increasing plant defense enzymes using seed inoculation with or without co-inoculation of *Bradyrhizobium japonicum*. The selection performed *in vivo* for growth promoters was efficient, because all selected isolates differed from the control in, at least, one of the evaluated components. Isolates of *Bacillus* AP-3, AP-25, AP-51, AP-106, AP-117, AP-40, QST-713 and QST-2808 promoted growth of soybean

plants and significantly inhibited *S. sclerotiorum*. *Bacillus* AP-25 isolate (*Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum*) increased peroxidase activity. In field conditions, *B. subtilis* QST 713 and roasted coffee oil were used in sequential and alternated applications with the fungicide Piraclostrobin + Epoxiconazole to control asian soybean rust. Results of two field experiments showed that the sequential applications of coffee oil, *Bacillus*-based product and the fungicide reduced the area under the disease progress curve, on average, 31%, 45% and 68% respectively. Despite those results, only the treatment with the sequential application of the product containing *B. subtilis* QST 713 showed the same yield and 100-seed weight of the treatment with the sequential application of fungicide. The isolate of *B. subtilis* QST 713 may be indicated to compose a management program for asian soybean rust under conditions of low disease severity.

Keywords: *Bacillus* spp., Plant diseases, Growth promotion, *Glycine max*

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Germinação de esporos de *Fusarium solani* (a), *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (b), *Colletotrichum lindemuthianum* (c) e *Phakopsora pachyrhizi* (d) por isolados de *Bacillus subtilis*, *Bacillus firmus* e *Bacillus amyloliquefaciens*.....59
- Figura 2: Crescimento micelial de *Fusarium solani* (a), *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (b), *Corynespora cassiicola* (c) e *Colletotrichum lindemuthianum* (d) em confronto com os isolados de *Bacillus subtilis*, *Bacillus firmus* e *Bacillus amyloliquefaciens*.....60
- Figura 3: Área abaixo da curva do progresso da doença para as avaliações do crescimento micelial de *Fusarium solani* (a), *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (b), *Corynespora cassiicola* (c) e *Colletotrichum lindemuthianum* (d) em confronto com os isolados de *Bacillus subtilis*, *Bacillus firmus* e *Bacillus amyloliquefaciens*.....61
- Figura 4: Efeito da aplicação *B. subtilis*, *B. firmus*, *B. amyloliquefaciens* e fungicida comercial (Piraclostrobina + Epoxiconazol) sobre a severidade (a) e área abaixo da curva de progresso da doença (b) do oídio da abobrinha (*Podosphaera xanthii*) em plantas da cultivar Caserta CAC cultivadas em casa-de-vegetação.....62
- Figura 5: Efeito da aplicação *B. subtilis*, *B. firmus*, *B. amyloliquefaciens* e fungicida comercial (Piraclostrobina + Epoxiconazol) sobre a severidade (a) e área abaixo da curva de progresso da doença (b) do oídio soja (*Erysiphe diffusa*) em plantas da cultivar BRS 316RR cultivadas em casa-de-vegetação.....63
- Figura 1: Análise molecular filogenética dos seis isolados selecionados pelo método da máxima verossimilhança.97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Efeito de <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus firmus</i> e <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , em três momentos de aplicação, sobre o diâmetro (mm) da lesão causada por <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> em folhas destacadas de soja da cultivar BRS 316RR.	57
Tabela 2: Efeito da aplicação de <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus firmus</i> e <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , em três momentos de aplicação, na severidade (%) da ferrugem da soja (<i>Phakopsora pachyrhizi</i>) em folhas destacadas de soja da cultivar BRS 316RR.	58
Tabela 1: Porcentagens de inibição do crescimento micelial de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> em confronto com os isolados de <i>Bacillus spp.</i>	88
Tabela 2: Efeito dos isolados de <i>Bacillus spp.</i> na altura e pesos das massas frescas de raiz e parte aérea de plantas de soja das cultivares BMX POTÊNCIA RR e BRS 113 no primeiro ensaio.	89
Tabela 3: Efeito dos isolados de <i>Bacillus spp.</i> na altura e pesos das massas frescas de raiz e parte aérea de plantas de soja das cultivares BMX POTÊNCIA RR e BRS 113 no segundo ensaio.	90
Tabela 4: Efeito dos isolados de <i>Bacillus spp.</i> na altura e pesos das massas frescas de raiz e parte aérea de plantas de soja da cultivar BMX POTÊNCIA RR no terceiro ensaio.....	91
Tabela 5: Efeito dos isolados de <i>Bacillus spp.</i> na altura, pesos das massas frescas e secas de raiz e parte aérea de plantas de soja da cultivar BMX Potência RR co-inoculadas com <i>Bradyrhizobium japonicum</i> aos 21 dias após a semeadura.	92
Tabela 6: Efeito dos isolados de <i>Bacillus spp.</i> no nível de clorofila (unidades SPAD) e na expressão das enzimas Peroxidase (PO), Polifenoloxidase (PPO) e Fenilalanina amônia-liase (FAL) em folhas de soja da cultivar BMX Potência RR co-inoculadas com <i>Bradyrhizobium japonicum</i> aos 21 dias após a semeadura.	93
Tabela 7: Efeito dos isolados de <i>Bacillus spp.</i> na altura, pesos das massas frescas e secas de raiz e parte aérea de plantas de soja da cultivar BMX Potência RR co-inoculadas com <i>Bradyrhizobium japonicum</i> aos 28 dias após a semeadura.	94
Tabela 8: Efeito dos isolados de <i>Bacillus spp.</i> no nível de clorofila (unidades SPAD) e na expressão das enzimas Peroxidase (PO), Polifenoloxidase (PPO) e Fenilalanina amônia-liase (FAL) em folhas de soja da cultivar BMX Potência RR co-inoculadas com <i>Bradyrhizobium japonicum</i> aos 28 dias após a semeadura.	95

Tabela 9: Produção de ácido cianídrico (HCN), ácido indolacético (AIA), solubilização de fosfato (P), catalase (CAT) e sideróforos (SID) pelos isolados de <i>Bacillus</i> spp.....	96
Tabela 1: Esquema de aplicação dos produtos à base de <i>Bacillus subtilis</i> QST-713, óleo de café torrado e o fungicida comercial à base de Piraclostrobina + Epoxiconazol visando ao controle da ferrugem asiática da soja.	117
Tabela 2: Efeito da aplicação de produtos à base de <i>Bacillus subtilis</i> QST-713, óleo de café torrado e fungicida comercial (Piraclostrobina + Epoxiconazol) sobre a severidade da ferrugem da soja, área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), índice de vegetação por diferença normalizada (NDVI), peso de 100 sementes e produtividade no Campo Experimental 1, sob infestação de <i>Phakopsora pachyrizhi</i>	118
Tabela 3: Efeito da aplicação de produtos à base de <i>Bacillus subtilis</i> QST-713, óleo de café torrado e fungicida comercial (Piraclostrobina + Epoxiconazol) sobre a severidade da ferrugem da soja, área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), índice de vegetação por diferença normalizada (NDVI), peso de 100 sementes e produtividade no Campo Experimental 2, sob infestação de <i>Phakopsora pachyrizhi</i>	119

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	21
2	REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1	A cultura da soja	23
2.1.1	Principais doenças incidentes na cultura soja	24
2.1.1.1	Ferrugem asiática da soja	24
2.1.1.2	Mancha alvo	26
2.1.1.3	Oídio	27
2.1.1.4	Mofo Branco	27
2.1.1.5	Fusariose	28
2.2	A cultura do feijão (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	29
2.2.1	Principais doenças incidentes na cultura do feijão	29
2.2.1.1	Antracnose	29
2.2.1.2	Fusariose	30
2.3	A cultura da abobrinha	30
2.3.1	Principais doenças incidentes na cultura da abobrinha	31
2.3.1.1	Oídio da abobrinha	31
2.4	O gênero <i>Bacillus</i>	32
2.4.1	<i>Bacillus</i> como agente de promoção de crescimento e controle biológico para agricultura	33
3	POTENCIAL DE ISOLADOS DE <i>Bacillus</i> spp. NO CONTROLE DE DOENÇAS FUNGÍCAS EM VÁRIAS CULTURAS	37
1	Introdução	39
2	Material e Métodos	42
2.1	Inibição da germinação de esporos de <i>Fusarium solani</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i> , <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> e <i>Phakopsora pachyrhizi</i>	42
2.2	Inibição do crescimento micelial de <i>Fusarium solani</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i> , <i>Corynespora cassiicola</i> e <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	42
2.3	Controle do mofo branco (<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>) em folhas destacadas	43
2.4	Controle da ferrugem da soja (<i>Phakopsora pachyrhizi</i>) em folhas destacadas	43
2.5	Controle do oídio da soja (<i>Erysiphe diffusa</i>) em plantas mantidas em casa-de-vegetação	44

2.6	Controle do oídio da abobrinha (<i>Podosphaera xanthii</i>) em plantas mantidas em casa-de-vegetação	45
2.7	Análise estatística.....	46
3	Resultados	47
3.1	Inibição da germinação de esporos de <i>Fusarium solani</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i> , <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> e <i>Phakopsora pachyrhizi</i>	47
3.2	Inibição do crescimento micelial de <i>Fusarium solani</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i> , <i>Corynespora cassiicola</i> e <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	47
3.3	Controle do mofo branco (<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>) em folhas destacadas	47
3.4	Controle da ferrugem da soja em folhas destacadas (<i>Phakopsora pachyrhizi</i>)	48
3.5	Controle do oídio da soja (<i>Erysiphe diffusa</i>) e da abobrinha (<i>Podosphaera xanthii</i>) em plantas mantidas em casa-de-vegetação	48
4	Discussão	49
	Referências	52

4	SELEÇÃO DE ISOLADOS DE <i>Bacillus</i> ANTAGÔNICOS A <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> E PROMOTORES DE CRESCIMENTO DE SOJA	64
1	Introdução	66
2	Material e Métodos	68
2.1	Seleção de isolados de <i>Bacillus</i> antagonísticos a <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	68
2.2	Seleção dos isolados de <i>Bacillus</i> antagonísticos a <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> para promoção de crescimento de plantas de soja.	68
2.3	Ensaio em casa-de-vegetação com oito isolados selecionados como promissores ao antagonismo a <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> e para promoção de crescimento.....	70
2.4	Expressão das enzimas Peroxidase, Polifenoloxidase e Fenilalanina amônia-liase em folhas de soja	71
2.5	Identificação molecular e análise filogenética dos oito isolados selecionados.....	72
2.6	Testes bioquímicos dos oito isolados selecionados.	72
2.7	Análise estatística.....	74
3	Resultados	75
3.1	Seleção de isolados antagonísticos a <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	75
3.2	Seleção dos isolados com antagonismo a <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> para promoção de crescimento de plantas de soja.	75
3.3	Ensaio em casa-de-vegetação com utilização dos oito isolados selecionados pelo teste de antibiose e promoção de crescimento.	76
3.4	Identificação molecular e análise filogenética.....	77
3.5	Testes bioquímicos.....	77
4	Discussão	78
	Referências	82

5	MANEJO DA FERRUGEM ASIÁTICA DA SOJA COM <i>Bacillus subtilis</i> E OLÉO DE CAFÉ EM APLICAÇÕES SEQUENCIAIS E ALTERNADAS COM FUNGICIDA	98
1	Introdução.....	100
2	Material e Métodos.....	103
3	Resultados.....	105
4	Discussão	107
	Referências.....	111
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	120
	REFERÊNCIAS.....	121

1 Introdução Geral

Os problemas fitossanitários causam perdas estimadas entre 31 e 42% de toda produção agrícola mundial e, parte destas perdas, são atribuídas às doenças de plantas que podem afetar desde grandes culturas, como soja e feijão, até as pequenas culturas, como a da abobrinha. Não importando a expressão da cultura, as doenças são normalmente controladas por meio de aplicações de fungicidas e, essa prática, tem agravado problemas relacionados a contaminação ambiental, a níveis elevados de resíduos de agrotóxicos em alimentos e a seleção de populações de patógenos resistentes a essas substâncias.

A sustentabilidade do manejo de doenças de plantas depende da integração de diferentes ferramentas de controle. Desta forma, a utilização de bactérias do gênero *Bacillus* e outros produtos considerados alternativos podem contribuir, principalmente, para a diminuição no uso de fungicidas, além de favorecer o desenvolvimento vegetal com ganho na produtividade, por promover crescimento das plantas.

Bacillus compõem parte significativa dos produtos biológicos comercializados no mundo. Esse fato é devido a facilidade de multiplicação destes microrganismos e a sua capacidade de produzir diversas substâncias com atividade contra fitopatógenos e também, substâncias de interesse vegetal, como fito-hormônios e solubilizadores minerais, que contribuem no seu desenvolvimento.

Considerando as possibilidades atribuídas a versatilidade do controle biológico e a necessidade de desenvolvimento de novas ferramentas de controle de fitopatógenos, os objetivos deste trabalho foram: 1- Avaliar, em condições controladas, a eficiência de três isolados do gênero *Bacillus* no controle de: *Erysiphe diffusa*, *Podosphaera xanthii*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Phakopsora pachyrhizi*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, *Colletotrichum lindemuthianum* e *Corynespora cassiicola*; 2- Selecionar isolados de *Bacillus* antagonistas a *S. sclerotiorum* e com capacidade de promover o crescimento de plantas de soja; 3- Avaliar a eficiência de controle da ferrugem asiática da soja, em condições de campo, utilizando um produto biológico à base de *Bacillus subtilis* QST 713 e um produto alternativo à base de óleo de café torrado em aplicações sequenciais e alternadas

com o fungicida piraclostrobina + epoxiconazol, formando diferentes arranjos de aplicação.

2 Revisão de literatura

2.1 A cultura da soja

A soja é a principal cultura do Brasil e ocupa, aproximadamente, 32,96 milhões de hectares, o que corresponde a 49% da área de grãos do país e produção em torno de 95 milhões de toneladas (IBGE 2016; CONAB, 2016). A domesticação desta cultura [*Glycine max* (L.) Merrill] teve início no continente asiático, pois constituía a base alimentar do povo chinês e, desta região, foi levada para jardins botânicos e estações experimentais de toda a Europa de onde, posteriormente, foi trazida ao ocidente (FREITAS, 2011; CÂMARA, 2012). No Brasil, seu cultivo iniciou no final do século XIX na Bahia (BLACK, 2000) de onde foi levada para São Paulo e Rio Grande do Sul. Nesses locais a cultura se adaptou melhor às condições edafoclimáticas, pois as variedades, foram trazidas dos Estados Unidos (BONETTI, 1981).

Com a expansão da área de cultivo da soja para todo o país (SEDIYAMA et al., 2007) ocorreu uma evolução nos processos de mecanização e técnicas de semeadura, juntamente ao surgimento de agroindústria, cooperativas e infraestrutura nos entornos às áreas de produção (MISSÃO, 2006). A produção de soja está entre as atividades econômicas que mais cresceram nos últimos anos no Brasil e isso pode ser atribuído ao desenvolvimento e estruturação do mercado interno e internacional; consolidação da soja e seus subprodutos como importantes fontes de proteína vegetal para atender demandas crescentes, principalmente, dos setores ligados à alimentação humana e animal; desenvolvimento e oferta de novas tecnologias que permitiram a expansão da cultura para novas áreas, dentre os quais, o melhoramento genético (HIRAKURI e LAZAROTTO, 2014).

O desenvolvimento fenológico da cultura foi detalhado por Fehr e Caviness (1977) e, basicamente, pode ser dividido em: Fase Vegetativa (V), com as subdivisões ou estádios designados numericamente como V1, V2, até Vn, salvo os dois primeiros estádios, conhecidos como Ve (emergência) e Vc (estádio de cotilédone) e Fase Reprodutiva (R), com oito subdivisões e suas representações também numéricas, subdivididas em quatro partes que descrevem o florescimento (R1 e R2), o desenvolvimento da vagem (R3 e R4), o desenvolvimento da semente (R5 e R6) e a maturação da planta (R7 e R8).

O Brasil segue como o grande celeiro para a expansão da produção de soja no mundo, devido as grandes áreas disponíveis para cultivo, além das áreas de pastagens degradadas, principalmente nas regiões centro-oeste e norte que devem seguir crescendo com o plantio desta cultura nos próximos anos. (ABAG, 2015)

2.1.1 Principais doenças incidentes na cultura da soja

Com a expansão do cultivo da soja surgiram no Brasil os problemas fitossanitários com cerca de 40 doenças causadas por nematoides, bactérias, vírus e, principalmente, fungos (HENNING, 2009). Dentre as doenças consideradas importantes, atualmente, a ferrugem asiática da soja (FAS), causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*, é considerada chave, pois incide em todas as regiões produtoras com elevado potencial destrutivo (YORINONI e LAZZAROTTO, 2004; LANGENBACH et al., 2016). No entanto, o oídio deve ser constantemente estudado por poder passar a protagonista frente as mudanças climáticas (KOBORI et al., 2011). Além destas doenças causadas por patógenos biotróficos, o mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*), a mancha alvo (*Corynespora cassiicola*) e a fusariose (*Fusarium solani*) podem acarretar sérios danos não só a cultura da soja, mas também a outros cultivos em condições ambientais favoráveis ao patógenos (SOUSA et al., 2016; HARTMAN et al., 2016; TONGON e KASEM, 2016).

2.1.1.1 Ferrugem asiática da soja

O fungo *P. pachyrhizi* pertence ao filo dos Basidiomycota, classe Pucciniomycetes, ordem Pucciniales e família Phakopsoraceae. (INDEX FUNGORUM, 2017). Nas Américas, essa doença foi relatada primeiramente no Paraguai em 2001, atingindo o Brasil no ano subsequente e os Estados Unidos da América em 2004 (SCHNEIDER et al., 2005) com sua ampla disseminação atribuída ao vento (ISARD et al., 2005; REIS et al., 2006). Desde a sua introdução no país, os prejuízos causados pela ferrugem já ultrapassam US \$10 bilhões de dólares em 2013 (SILVA et al., 2014) e estima-se que os custos anuais para o controle da ferrugem cheguem a US \$2 bilhões de dólares (GODOY et al., 2015).

Por se tratar de um parasita biotrófico, *P. pachyrhizi*, depende dos hospedeiros vivos para a sua manutenção no ambiente (AGRIOS, 2005) e na falta do seu hospedeiro principal, a soja, sua sobrevivência é dependente de hospedeiros

alternativos como feijão (*Phaseolus vulgaris*), feijão-fava (*Phaseolus lunatus*), soja perene (*Neonotonia wightii*), além de plantas voluntárias (YORINORI et al., 2007).

FAS é considerada uma doença policíclica, portanto apresenta diversos monociclos durante a estação de cultivo (AGRIOS, 2005) com duração de 6 a 7 dias (YORINORI e LAZZAROTTO, 2004). Estudos demonstram que essa doença é favorecida por condições ambientais facilmente encontradas na estação de cultivo da soja: temperaturas de 18 a 28°C, alta umidade relativa e período de molhamento foliar contínuo e superior a 6 horas que permitem que ocorra a infecção através da fixação do apressório e desenvolvimento do tubo germinativo que adentra a célula pelos estômatos ou por penetração direta entre as células da epiderme (GOELLNER et al., 2010)

Com o patógeno estabelecido é possível observar áreas cloróticas nas folhas, principalmente, quando as plantas estão próximas ou no estágio reprodutivo (REIS et al., 2006), com ascensão da doença do baixeiro para o terço superior das plantas. Destas áreas cloróticas emergem as urédias que, com o passar tempo, adquirem uma coloração que varia de castanha a marrom-enegrecida que rompem a epiderme para liberação dos uredósporos (SINCLAIR e HARTMAN, 1999).

A coloração dessas lesões varia com a idade e a interação com o hospedeiro, e recebem a seguinte classificação: TAN quando se apresentam na coloração de castanho claro com muitos soros urediniais e abundante esporulação; RB (Reddish Brown) quando se apresentam na coloração de castanho avermelhada com poucos soros urediniais e com pouca ou nenhuma esporulação, sendo a última comum em materiais que apresentam genes de resistência (BONDE et al., 2006) a *P. pachyrhizi*.

Langenbach et al. (2016) relataram que apesar de diversos genes relacionados a resistência serem conhecidos e utilizados pelo melhoramento genético, as estratégias foram rapidamente superadas por *P. pachyrhizi*. Recentemente, o gene CcRpp1 de feijão-gandu (*Cajanus cajan*) foi clonado e transferido a uma cultivar de soja a qual passou a apresentar resistência total a FAS (KAWASHIMA et al., 2016). No entanto, até esse momento, a cultivar não estava disponível comercialmente e ainda se especula sobre a duração ou não dessa resistência.

A respeito do controle biológico de FAS, poucos estudos foram realizados detalhadamente (GOELLNER et al., 2010). No entanto, Dorighello et al. (2015), demonstram o potencial de bactérias do gênero *Bacillus* no controle de FAS e

apontam para a necessidade de integração do controle biológico com o controle químico.

Dentre as ferramentas mais utilizadas no manejo da FAS, destaca-se o uso de fungicidas, principalmente dos triazóis e suas combinações com estrobilurinas. No entanto, essas moléculas têm apresentado baixa eficiência de controle e sua utilização demasiada tem contribuído para seleção de populações de *P. pachyrhizi* menos sensíveis, agravando o problema, visto que, dos mais de 100 produtos registrados para o controle de FAS, apenas cinco apresentam controle superior a 60% (GODOY et al., 2015).

Nos ensaios de rede realizados pela Embrapa no ano 2014/2015, segundo Godoy et al. (2015), de 15 fungicidas registrados ou em fase de registro testados para o controle de FAS apenas os ativos Azoxistrobina + Benzovindiflupir apresentaram controle acima de 80%, fato preocupante para a sojicultura brasileira.

2.1.1.2 Mancha alvo

O fungo *Corynespora cassiicola* (Berk e Curt) pertence ao filo dos Ascomycota, classe Dothideomycetes, ordem Pleosporales e família Corynesporascaceae (INDEX FUNGORUM, 2017) e é causador da mancha-alvo na soja e encontrado em todas as regiões produtoras. Além da soja, este patógeno possui uma ampla gama de espécies de plantas hospedeira que inclui o algodão e o mamão, entre outros. Esse fungo sobrevive em restos culturais (KUROSAWA et al., 2005) e, após atingir a superfície foliar, com disseminação predominante pelo vento, penetra diretamente a superfície do hospedeiro, principalmente, através da produção da toxina cassicolin (SHUIB et al., 2015), causando os sintomas iniciais que consistem em lesões circulares amarronzadas com um halo amarelo (PERNEZNY e SIMONE, 1993). Os danos na superfície foliar, reduzem a área fotossintética (BEDENDO, 1995) diminuindo a produção de grãos.

Os fungicidas são importantes ferramentas no controle desta doença (GODOY et al., 2015) devido à baixa disponibilidade de cultivares resistentes (TERAMOTO et al., 2013). No entanto, são frequentemente relatadas populações deste patógeno com baixa sensibilidade a estas moléculas (XAVIER et al., 2013; CABRAL et al., 2016) que evidenciam a necessidade da integração de novas ferramentas de controle.

2.1.1.3 Oídio

O fungo *Erysiphe diffusa* (Cooke e Pech) pertence ao filo dos Ascomycota, classe Leotiomycetes, ordem Erysiphales e família Erysiphaceae (INDEX FUNGORUM, 2017) e é causador do oídio da soja e sua ocorrência tem aumentado nas últimas safras (BLUM et al., 2016). No Brasil, no final da década de 90, vários surtos epidêmicos desta doença foram relatados no sul, sudeste e centro oeste brasileiro, com perdas produtivas de até 40% que levaram o oídio a ser considerado a principal doença da época (YORINORI, 1997; SILVA e SEGANFREDO, 1999; ALMEIDA et al., 2008). Essas perdas são resultado comprometimento da fotossíntese e da taxa de respiração causado pelo crescimento micelial abundante do patógeno sobre a superfície foliar (MIGNUCCI e CHAMBERLAIN, 1978).

Apesar da forma mais econômica de controlar a doença ser através de cultivares resistentes, o posicionamento destas cultivares em períodos favoráveis a doença não limitam os danos causados pelo o oídio (GRIGOLLI, 2014), fazendo com que o emprego de fungicidas seja necessário, pois segundo Igarashi et al. (2010) as perdas produtivas podem variar de 20 a 50% em períodos favoráveis a doença com temperaturas entre 18 e 24°C e umidade relativa entre 50 e 70%.

2.1.1.4 Mofo Branco

O fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary pertence ao filo dos Ascomycota, classe Leotiomycetes, ordem Helotiales e família Sclerotiniaceae (INDEX FUNGORUM, 2017) e causa prejuízos a importantes culturas, principalmente, na cultura na soja, pois o fungo encontra-se amplamente distribuído entre os maiores produtores mundiais do grão, incluindo os Estados Unidos, Brasil, Argentina (WRATHER et al., 2001).

A agregação do micélio deste fungo dá origem ao escleródio, estrutura de resistência responsável pela persistência do patógeno em campos de cultivo por anos (BOLTON et al., 2006). No Brasil, estima-se que o fungo esteja presente em mais de 20% da área destinada ao cultivo de soja (MEYER et al., 2016). O apotécio, sob condições ideais de temperatura, próxima a 20°C e alta umidade relativa, pode germinar por duas vias: através do crescimento micelial (germinação miceliogênica) que ira infectar diretamente os tecidos da planta ou através da formação do apotécio,

(germinação carpogênica) na qual os ascósporos são liberados e causarão infecção em contato com o tecido (STEADMAN, 1983).

As estratégias de controle da doença consistem na rotação de cultura e uso de sementes certificadas, além do uso de fungicidas que, no entanto, tem gerado resultados inconsistentes (SUMIDA et al., 2015). Alguns defensivos agrícolas que são utilizados durante o ciclo de cultivo podem potencializar a doença no campo, por induzir a germinação dos escleródios e, por existirem relatos de populações resistentes a fungicidas, outras ferramentas de controle estão sendo consideradas no manejo desta doença. Dentre elas, a utilização do controle biológico pela aplicação de *Clonostachys rosea* (RODRÍGUEZ et al., 2015) e *Trichoderma harzianum* (ZHANG et al., 2016), além de isolados de *Bacillus* (HU et al., 2016).

2.1.1.5 Fusariose

O fungo *Fusarium solani* (Mart.) pertence ao filo dos Ascomycota, classe Sordariomycetes, ordem Hipocreales e família Nectriaceae (INDEX FUNGORUM, 2017) e causa a fusariose da soja, que possui outros nomes comuns como podridão vermelha das raízes, pé vermelho e também está relacionado a síndrome da morte súbita. No final da década de 90 este patógeno causou perdas produtivas que somaram 58 milhões de dólares em um único ano agrícola (YORINORI, 1998) e os prejuízos persistem, principalmente em áreas infestadas com nematoides (XING E WESTPAHL, 2006). Os sintomas iniciais ocorrem com maior intensidade em temperaturas amenas com alta umidade do solo e consistem em manchas avermelhadas nas raízes abaixo do solo, que progridem em direção ao lenho, atingindo a haste principal com manifestação, neste momento, dos sintomas foliares de amarelecimento das folhas e necrose das nervuras, causando o sintoma conhecido popularmente como “folha carijó” (ITO, 2013). *Fusarium solani* é considerado um patógeno polífago, com grande diversidade genética e no seu controle, além do uso de fungicidas, o controle biológico também é apontado como uma medida efetiva (NARAYANAN et al., 2015)

2.2 A cultura do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)

O feijão está entre as principais culturas do Brasil, principalmente pela alta demanda do mercado interno tornando-o um dos maiores produtores e consumidores do mundo, com mais de 3 milhões de hectares cultivados (FAO, 2017; CONAB, 2016).

O cultivo é realizado ao longo do ano, em três safras: A primeira com semeadura realizada entre agosto a outubro que recebe o nome de “safra das águas”; A segunda, subsequente a anterior, com semeadura entre janeiro e abril que recebe o nome de “safra da seca”; A terceira, subsequente a anterior, com semeadura a partir de maio, conhecida como “safra de inverno” (BARBOSA e GONZAGA, 2012). Essa cultura tem grande importância, por seu cultivo durante a maior parte do ano, gerar renda e postos de trabalhos em pequenas e grandes propriedades e também pelo seu cultivo para consumo próprio (SILVA E WANDER, 2013).

2.2.1 Principais doenças incidentes na cultura do feijão

Segundo Barbosa et al. (2009), o feijoeiro comum é atacado por diversas doenças que podem ser causadas por fungos, bactérias, vírus e nematoides, com a importância de cada doença dependente da região, ano de cultivo, época de instalação da cultura e condições ambientais. No feijão, as doenças podem ser limitantes à produção, principalmente as relacionadas a patógenos do solo como *F. solani*, *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, *S. sclerotiorum* (BARBOSA E GONZAGA, 2012), além de *Colletotrichum lindemuthianum* (QUINTANA-RODRIGUEZ et al., 2015). No cultivo, ainda há o predomínio do uso de fungicidas para controle de doenças, apesar dos relatos de populações do patógenos resistentes a essas moléculas e promissores resultados de controle relacionados a agentes de controle biológico (PRIOR, MITTELBACH e BEGEROW, 2017)

2.2.1.1 Antracnose

O fungo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc e Magnus) pertence ao filo dos Ascomycota, classe Sordariomycetes, ordem Glomerellales e família Glomerellaceae (INDEX FUNGORUM, 2017) e causa a antracnose do feijão, considerada uma das doenças de grande importância, principalmente nos cultivos em regiões de temperaturas amenas a frias e com alta umidade relativa do ar (COSTA et al., 2016).

Ainda segundo Costa et al. (2016), além desta doença causar a perda total de cultivos onde a ocorrência incide precocemente, as manchas causadas no grão causam depreciação do produto. Dentre as medidas de controle de *C. lindemuthianum*, comumente é realizado o tratamento de semente com fungicidas e posteriores pulverizações destes produtos ao longo do ciclo da cultura (MANJUNATH et al., 2016). A prevalência desta medida pode ser atribuída a grande variabilidade genética deste patógeno, além das cultivares lançadas apresentarem diferentes níveis de resistência (DANGL et al., 2013) e os resultados do uso do controle biológico não serem conclusivos (GHOLAMI et al., 2013).

2.2.1.2 Fusariose

O fungo *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* (Kendr e Snyder) (Fop) pertence ao filo dos Ascomycota, classe Sordariomycetes, ordem Hipocreales e família Nectriaceae (INDEX FUNGORUM, 2017) e causa a murcha de Fusarium em cultivos do feijão em diversos países, inclusive o Brasil (HIRANO e ARIE, 2009). A manutenção do patógeno no campo é atribuída a atividade saprófita e a estruturas de resistências, os clamidósporos (HENRIQUE et al., 2015). Sob temperaturas próximas a 28°C, na época das secas e na presença do hospedeiro, ocorre a germinação destas estruturas e posterior infecção (DALLA PRIA e SILVA, 2010). Fop é um patógeno vascular que invade o hospedeiro pelas raiz e se aloja no xilema, causando os sintomas que se iniciam com a murcha da planta, com posterior amarelecimento e queda das folhas, resultando na sua morte antecipada (XUE et al., 2014). Apesar da utilização de variedades resistentes ser a principal forma de controle da doença, a alta variabilidade genética em torno de Fop, pode limitar essa ferramenta (KARIMIAN et al., 2010) tornando necessário o uso de fungicidas, principalmente através do tratamento de sementes (CARVALHO et al., 2011). Além de Carvalho et al. (2011), os trabalhos de Rocha e Moura (2013) e Gupta e Vakhlu (2015) demonstram ser promissor o uso de agentes de biocontrole, inclusive *Bacillus*, para controle de *F. oxysporum*.

2.3 A cultura da abobrinha

A abobrinha (*Cucurbita pepo*) também conhecida como abobora de moita ou abobrinha italiana, pertence à família das curcubitáceas e sua cultura tem grande representação entre as olerícolas, por ser apreciada em diversos países, inclusive no

Brasil, por seus frutos de formato cilíndrico da cor verde com estrias verde escura, compor diversas receitas alimentícias (BIANCHINI, 2013). Segundo Fukushi (2016), as espécies deste gênero são oriundas dos Estados Unidos e México e as dimensões do fruto, no momento da comercialização, estão entre 15 e 20 cm de comprimento com 4 a 6 cm de diâmetro, pesando em média 225 gramas. Seu ciclo curto, entre 50 e 80 dias, bom desenvolvimento em uma ampla faixa de temperatura (18 – 35°C) e, portanto, possibilidade de cultivo durante todo o ano, tornam essa cultura interessante economicamente principalmente para os produtores do centro sul, onde seu cultivo é mais extensivo. Após 60 dias do plantio, espera-se um rendimento médio da cultura de 8 a 10 t.ha⁻¹ e o principal fator limitante a essa produtividade são os problemas fitossanitários (SOUZA e RESENDE, 2011). Segundo a ABCSEM (2014), entre as olerícolas, o mercado de abobrinhas está entre os 10 principais do país e, estima-se, que para esse cultivo sejam empregados mais de R\$ 25 milhões em defensivos. Em 2014, a publicação do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos elaborado pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) apontou que a abobrinha foi a cultura com maior percentual de amostras consideradas insatisfatória, pois de 229 amostras analisadas 110 apresentavam inconformidade em relação a resíduos de agrotóxicos (BRASIL, 2014). Essas informações ressaltam a necessidade de que novas ferramentas de controle de pragas e doenças sejam empregados neste cultivo.

2.3.1 Principais doenças incidentes na cultura da abobrinha

De modo geral, a cultura é considerada suscetível a diversas doenças causadas por vírus, fungos, bactérias e nematoides. Entre os patógenos que podem causar grandes perdas estão o *Zucchini yellow mosaic virus* (SIMMONS et al., 2015) *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (BALAZ et al., 2016), além de *Podosphaera xanthii*, causador do oídio, considerada a principal doença do cultivo (MOHAGHEGH et al., 2015) principalmente pela ampla distribuição e suscetibilidade de todos os materiais (ZATARIM et al., 2005).

2.3.1.1 Oídio da abobrinha

O fungo *Podosphaera xanthii* (Castagne) pertence ao filo dos Ascomycota, classe Leotiomycetes, ordem Erysiphales e família Erysiphaceae (INDEX FUNGORUM, 2017) é o principal agente causal do oídio das curcubitáceas em todo o

mundo (Zhang et al., 2012). A doença é favorecida pela baixa umidade relativa do ar e atinge, principalmente, as folhas, recobrando-as com uma camada esbranquiçada de aspecto cotonoso, composta de micélio e esporos do fungo que comprometem a fotossíntese e causam desfolha precoce, com conseqüente perda de vigor da planta e redução da produtividade (PÉREZ-GARCIA et al., 2009). O controle da doença é baseado na utilização de sucessivas aplicações de fungicidas (SIEROTZHI e SCALLIET, 2013). No entanto, já foi constatado resistência deste patógeno a diversas moléculas, inclusive estrobilurinas (MCGRATH e SHISHKOFF, 2003) e ciflufenamida (PIRONDI et al., 2016), reforçando que, no controle deste patógeno, novas estratégias devem ser adotadas.

2.4 O gênero *Bacillus*

De acordo com o banco de dados “List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature” existem atualmente 336 espécies e sete sub-espécies de microrganismos do gênero *Bacillus* com descrição válida de acordo com o manual de Bergey's, que sistematiza a classificação taxonômica de procariotos (EUZÉBY, 2017). Este importante gênero de microrganismo, pertencente ao reino Bacteria, filo Firmicutes, classe Bacilli e ordem Bacillales, foi descrito primariamente por Cohn (1872), quem nomeou a espécie tipo como *Bacillus subtilis*. A etimologia que nomeia o gênero provém do latim *Bacillus*, uma palavra masculina que designa a morfologia da célula, remetendo à forma de bastão ou bastonete, normalmente arranjadas em colônias (MADIGAN et al., 2016).

Além da morfologia característica, outros padrões taxonômicos são atribuídos ao gênero. Assim, estes microrganismos podem ser caracterizados como Gram-positivos, aeróbios obrigatórios ou facultativos, produtores de enzima catalase, crescem em variadas fontes de carbono e formam endósporos como estrutura de sobrevivência em períodos de estresse ambiental (MADIGAN et al., 2016).

Baseado na taxonomia e sistemática molecular o gênero *Bacillus* é atualmente dividido em seis distintos grupos filogenéticos (ASH et al., 1991; NIELSEN et al., 1994; YOU et al., 2013). Esta classificação é atribuída ao perfil da sequência do gene RNA ribossomal 16S ou 16S rRNA (gene que codifica a subunidade menor dos ribossomos procarióticos). Devido a grande taxa de conservação evolutiva desta região do

genoma em procariotos a atual sistemática molecular o utiliza como o principal marcador molecular para caracterização de espécie (CASE et al, 2007).

Quanto a distribuição o gênero *Bacillus* é ubíquo na natureza, pois são encontrados em diversificados nichos ecológicos. Variadas espécies foram isoladas de diversos habitats terrestres marinhos e aquáticos (SIEFERT et al., 2000; MIRANDA et al., 2008), ambientes de alta e/ou baixa temperatura (CACCAMO et al., 2000; LOGAN et al., 2000), e também no interior de tecidos de diferentes plantas como trigo (LIU et al., 2009), milho (*Zea mays*) (RIJAVEC et al., 2007), pepino (KAMPFER et al., 2016) e algodão (KAMPFER et al., 2015).

O gênero possui grande potencial biotecnológico e apesar de algumas espécies produzirem toxinas problemáticas a saúde humana e animal, muitas espécies de *Bacillus* podem ser empregadas na produção de antibióticos, enzimas e outros metabólitos de interesse para indústria farmacêutica, de alimentos e agrícola (BANAT et al., 2000; BALCAZAR e ROJAS-LUNA, 2007; SOROKULOVA et al., 2008; YOU et al., 2013).

2.4.1 *Bacillus* como agente de promoção de crescimento e controle biológico para agricultura

Espécies do gênero *Bacillus* apresentam rápido crescimento em variadas fontes de carbono. Esta adaptação metabólica é atribuída a grande capacidade de produção de enzimas extracelulares, responsáveis pela oxidação de polímeros como ácidos nucleicos, polissacarídeos e lipídeos, que podem ser prontamente utilizados como fonte energética para a célula (MADIGAN et al., 2016). Outra característica metabólica relacionada ao gênero é a capacidade de produção de antibióticos como bacitracina, polimixina, tirocidina, gramicidina e circulina, que ocorrem durante e após o processo de esporulação, e que por estes motivos são largamente utilizados em diversos setores da indústria (MADIGAN et al., 2016).

Devido as características peculiares estes microrganismos tem sido empregado na agricultura, aumentando a resistência de plantas a diversos estresses ambientais como seca, metais pesados e escassez nutricional do solo (CLEMENTE et al., 2016). Porém, no setor agrícola, espécies de *Bacillus* são mais amplamente estudadas e utilizadas como promotores de crescimento e agentes de controle biológico contra pragas e doenças (CLEMENTE et al., 2016).

Além de *Bacillus*, alguns gêneros como *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Agrobacterium* e *Azotobacter* são conhecidos como rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCPs) (ABDELZAHER, 2003). Estes microrganismos de vida livre são frequentemente encontrados em diversas partes da planta, contudo em maior concentração na região rizosférica onde a liberação de exsudados da raiz favorece o sinergismo micro-organismo/planta (ARAUJO; GUERREIRO, 2010).

A bioatividade das rizobactérias acarretam benefícios na emergência e promoção de crescimento das plantas, aumento da fixação de nitrogênio, solubilização de nutrientes, melhoria das condições do solo (SCHISLER et al., 2004), antagonismo contra fungos fitopatogênicos (ARAÚJO et al., 2005), e produção de hormônios vegetais como a giberelina (HOLL et al., 1988); ácido indolacético (MOHITE, 2013) e ácidos láctico e succínico (YOSHIKAWA et al., 1993). Neste sentido, alguns exemplos da ação de rizobactérias promotoras de crescimento são citados, como no trabalho realizado por Cavallet et al. (2000) que observaram, após a microbiolização de sementes, um aumento significativo na produtividade de grãos na cultura de milho. Já no estudo realizado por Araujo e Guerreiro (2010), foi constatado que linhagens de *Bacillus* foram eficazes como promotoras de crescimento também em milho. Em outro exemplo, os metabólitos e hormônios vegetais produzidos pela linhagem de *B. subtilis* (AP-3) promoveram incrementos na nodulação e rendimento da soja no campo (ARAÚJO et al., 2005). Clemente et al. (2016) notou um expressivo aumento na produtividade em lavoura de cenoura após a aplicação de composto fermentado com linhagens selecionadas de *Bacillus* sp.

Como agentes de controle biológico contra pragas e doenças várias linhagens de *Bacillus*, podem ser utilizados. No controle de pragas *B. thuringiensis* é mais amplamente utilizado, pois podem produzir diversos tipos de toxinas com especificidade seletiva para diferentes espécies de insetos (MADIGAN et al., 2016). *B. thuringiensis* produz uma proteína cristalizada durante o processo de esporulação. Esta proteína é uma protoxina convertida em toxina no intestino de lepidópteros, o que torna uma eficaz solução para o controle de *Helicoverpa armigera*, uma importante praga da cultura da soja, milho e algodão (WANG et al., 2016; LUO et al., 2017). Desta forma, genes *cry* que codificam as proteínas cristal ou toxina Bt como é conhecida a protoxina, foram introduzidos em variedades de soja, algodão e milho geneticamente modificadas para resistência contra o ataque de *Anticarsia gemmatilis*, *H. Armigera*, entre outras (DOVRAT; AHARONI, 2016; WANG et al., 2016).

Algumas espécies de *Bacillus*, como *B. firmus* (GENG et al., 2016), *B. cereus* (ZHANG, 2016) e *B. subtilis* (RAO et al., 2017) foram reportadas como altamente efetivas no controle de nematoides parasitas de plantas. De forma geral, as endotoxinas produzidas por estes microrganismos interferem no ciclo reprodutivo dos nematoides, reduzindo a ovoposição e eclosão de juvenis. Assim, estas linhagens de *Bacillus* atuam como biocontroladores da população de nematoides e podem ser empregados no manejo de diversas culturas para reduzir os efeitos deletérios causados pelo parasita (GENG et al., 2016; ZHANG et al., 2016; CIANCIO et al. 2016; RAO et al., 2017).

No controle de doenças de plantas causadas principalmente por fungos fitopatogênicos, o gênero *Bacillus* é largamente empregado como um importante agente de antagonismo. A podridão de raiz e haste causada pelo patógeno *Phytophthora sojae* é uma destrutiva doença na cultura da soja. Apesar da gravidade das perdas causadas por este oomiceto, não existem métodos efetivos disponíveis para controlar esta doença (QIAO et al. 2013). Porém, Lu et al. (2017) mostraram que *B. altitudinis* pode efetivamente reduzir a infectividade de *P. sojae*, devido a produção de espécies reativas de oxigênio e deposição de calose, em plantas de soja. Este resultado mostra uma promissora perspectiva no controle de *P. sojae*, embora testes em campo ainda devam ser reproduzidos.

O fungo *Fusarium graminearum*, um dos principais patógenos de cereais, é responsável por grandes perdas econômicas em diversos cultivos de grãos e, além disso, causa problemas para a saúde humana e animal (BRESSO et al., 2016). Para controlar este fitopatógeno, Palazzini et al. (2016) selecionou uma linhagem de *B. subtilis* isolado de planta de trigo com forte potencial de antagonismo e biocontrole contra infecções ocasionadas por *F. graminearum*.

León et al. (2009) selecionaram uma linhagem de *B. amyloliquefaciens* isolada da rizosfera de planta de soja que foi capaz de inibir o patógeno *Pythium ultimum*, um oomiceto responsável pela podridão de raízes e tombamento do caule em plantas de soja. Da mesma forma, Zhang e Xue (2010) selecionaram uma estirpe de *B. subtilis* capaz de promover uma forte inibição contra *Sclerotinia sclerotiorum*, agente causador da podridão do caule, também em plantas em soja. Calvo et al. (2017) selecionaram uma linhagem de *Bacillus amyloliquefaciens* com forte ação inibitória contra patógenos de pós-colheita de laranja, maçã, uva, pêssigo e ameixa. *B. amyloliquefaciens* é capaz de produzir forte ação antifúngica *in vitro* e *in vivo* contra

Botrytis cinerea, *Monilinia fructicola*, *Monilinia laxa*, *Penicillium digitatum*, *P. expansum* e *Penicillium italicum*. Outra linhagem de *B. amyloliquefaciens* (PGPBACCA1) foi identificada como um eficaz agente de controle biológico para sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) contra os patógenos *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Fusarium* spp., *Cladosporium* spp. e *Rizhopus* spp., *Sclerotium rolfsii*, *S. sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, *F. solani* e *Penicillium* spp. (TORRES et al., 2017).

Em um estudo realizado por Senthilkumar et al. (2010), uma linhagem de *Bacillus* spp. mostrou forte inibição de patógenos de solo causadores de podridão em plantas de soja. Além de atuar como promotor de crescimento em plantas e aumentar a taxa de germinação, a estirpe selecionada foi capaz de inibir o crescimento de *Rhizoctonia bataticola*, *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium udam* e *S. rolfsii*.

Assim, a utilização de espécies de *Bacillus* como promotoras de crescimento e agente de controle biológico para diversas culturas agrícolas, proporciona um método atrativo, eficiente e ambientalmente menos agressivo que defensivos e fertilizantes químicos, o que torna a prática da utilização de bioagentes uma alternativa mais sustentável nos âmbitos econômicos e ambiental (SHAFI et al., 2017).

1 **3 Potencial de isolados de *Bacillus* spp. no controle de doenças fúngicas em**
2 **várias culturas ¹**

3 Dalton Vinicio Dorighello^{1*}, Wagner Bettiol²

4 ¹ Faculdade de Ciências Agrônômicas (FCA) - Universidade Paulista Júlio de Mesquita
5 Filho (UNESP)

6 ² Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Meio Ambiente

7 *Autor para correspondência: E-mail: dalton.agro@gmail.com;

8

9

10 **RESUMO**

11 Apesar de diversas práticas de controle de doenças de plantas terem sido
12 desenvolvidas ao longo dos anos para evitar prejuízos econômicos, a utilização dos
13 fungicidas é o principal método de controle adotado e, na maioria das situações,
14 utilizado de maneira exclusiva, com demasiadas aplicações sequenciais. No entanto,
15 essa forma de posicionamento tem gerado graves problemas ambientais, de
16 contaminação de alimentos e selecionado populações de patógenos resistentes a
17 estas moléculas. Desta forma, novas práticas têm sido testadas para substituir ou
18 diminuir a utilização destes produtos, entre elas as relacionadas ao controle biológico,
19 principalmente mediante aplicações de produtos à base de *Bacillus*. Assim, o objetivo
20 deste trabalho foi avaliar, em condições controladas, o potencial de três produtos
21 formulados a partir de *Bacillus subtilis*, *Bacillus firmus* e *Bacillus amyloliquefaciens* no
22 controle de *Erysiphe diffusa*, *Podospaera xanthii*, *Phakopsora pachyrizhi*, *Sclerotinia*
23 *sclerotiorum*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* f.
24 sp. *phaseoli* e *Corynespora cassiicola*. No teste de germinação de esporos, realizado
25 em laminas de vidro, foram depositados a suspensão de esporos dos patógenos e,
26 em seguida, os produtos avaliados, com posterior incubação. Independentemente da
27 concentração, todos os produtos inibiram a germinação de *P. pachyrizhi*, *F. solani* e
28 *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, em até 82, 79 e 95%, respectivamente. No teste de

¹ Este capítulo foi redigido em formato de artigo de acordo com as normas da revista Crop Protection.

1 confronto em cultura pareada, as células dos isolados de *Bacillus* spp. foram
2 suspensas e transferidas para as placas contendo o meio de cultura que,
3 posteriormente, receberam no centro, os propágulos dos patógenos. Todos os
4 isolados inibiram o crescimento de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, *C. cassicola* e *C.*
5 *lindemuthianum*. No entanto, apenas *B. amyloliquefaciens* inibiu o crescimento de *F.*
6 *solani*. Em folhas destacadas, foram avaliados os diâmetros das lesões causadas por
7 *S. sclerotiorum* e a severidade causada por *P. pachyrizhi*. *B. subtilis* e *B.*
8 *amyloliquefaciens*, aplicados de forma preventiva, reduziram a lesão causada por *S.*
9 *sclerotiorum* em até 45%. Os isolados de *B. subtilis*, *B. firmus* e *B. amyloliquefaciens*,
10 além de reduzirem a germinação dos esporos de *P. pachyrizhi* em 72, 69 e 82%,
11 respectivamente, nos testes em folhas destacadas, independente da concentração,
12 reduziram a severidade da doença em até 96% com a aplicação preventiva, em até
13 70% com a aplicação simultânea e em até 47% com a aplicação curativa. Nenhum
14 dos produtos à base de *Bacillus* controlou o oídio da soja e o oídio da abobrinha em
15 testes realizados em casa-de-vegetação. Desta forma, esses produtos devem passar
16 por novos testes, em condições reais de ocorrência da doença para verificar se a
17 efetividade obtida *in vitro* também será mantida em campo.

18 **Palavras chave:** controle biológico, inibição, doenças de plantas

1 1 Introdução

2 Os problemas fitossanitários causam perdas estimadas entre 31 e 42% em toda
3 a produção agrícola mundial e, parte destas perdas, são atribuídas às doenças de
4 plantas (Agrios, 2005). Muitas destas doenças devem ser constantemente estudadas
5 por exercerem um papel limitante na produção agrícola, como a exemplo de
6 *Sclerotinia sclerotiorum*, *Corynespora cassiicola* e *Phakopsora pachyrizhi* na cultura
7 da soja (Sousa et al., 2016; Hartman et al., 2016), *Colletotrichum lindemuthianum* e
8 *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em feijão (Pastor-Corrales e Tu, 1989; Carvalho
9 et al., 2011) e *Fusarium solani* em diversas culturas (Tongon e Kasem, 2016). Por
10 estarem amplamente distribuídos e podendo ser favorecidos frente às mudanças
11 climáticas, os oídios (Park et al., 2015) devem ser mais atentamente estudados
12 (Kobori et al., 2011). Apesar das vantagens em se controlar fitopatógenos por meio
13 da utilização de fungicidas, essa ferramenta não deve ser considerada como
14 exclusiva, definitiva ou a longo prazo, pois devem ser considerados os seus efeitos
15 nocivos à saúde humana, ambiental, além da possibilidade de seleção de
16 microrganismos resistentes e toxicidade a organismos não-alvo (Rai e Carpinella,
17 2006).

18 As diferenças de sensibilidade entre isolados de importantes patógenos como
19 *F. solani* (Al-Sadi et al., 2015), *C. cassiicola*, (Xavier et al., 2013; Cabral et al., 2016),
20 *F. oxysporum* (Petkar et al., 2017), além de relatos de resistência de *P. pachyrizhi* e
21 *S. sclerotiorum* (Schmitz et al., 2013; Zhou et al., 2014) a fungicidas torna prudente o
22 monitoramento dos fitopatógenos frente a essas moléculas (Wang et al., 2017) e, o
23 desenvolvimento de novas ferramentas, fundamental para a estabilidade da produção
24 agrícola.

25 Neste aspecto, o controle biológico, pela aplicação de microrganismos para o
26 controle de fitopatógenos, torna-se uma estratégia que pode desempenhar um
27 importante papel em um programa de manejo integrado (Yuliar et al., 2015). Apesar
28 do número limitado de publicações da efetividade do controle biológico em campo,
29 diversas outras publicações relatam a eficiência desse método em condições
30 controladas e também resultados satisfatórios no campo quando o controle biológico
31 está integrado em um sistema de manejo (Ellis, 2017).

32 Nos últimos anos, entre os microrganismos de controle biológico, os das
33 espécies do gênero *Bacillus*, têm recebido grande atenção (Zhao et al., 2014). De

1 acordo com Gardener (2004), alguns isolados de *Bacillus* estão entre os mais
2 eficientes agentes de biocontrole que podem ser desenvolvidos para a
3 comercialização como biofungicidas, ou ainda, como biofertilizantes (Saharan e
4 Nehra, 2011). As características destes microrganismos crescerem em uma ampla
5 faixa de temperatura, colonizarem diversos ambientes, utilizarem diversos compostos
6 como fonte de energia, capacidade de competição, produção de estruturas de
7 resistência (endósporos), além da capacidade de produzirem diversos compostos com
8 atividade antimicrobiana justificam a versatilidade e a procura de isolados de *Bacillus*
9 como agentes de controle biológico (Santoyo et al., 2012; Madigan et al., 2016).

10 Hu et al. (2016), após selecionar por anos isolados de *Bacillus*, demonstraram
11 que os isolados de *Bacillus subtilis* BY-2 e Tu-100, além do isolado de *B. megaterium*
12 A6, foram promissores agentes de controle de *S. sclerotiorum*, inclusive em condição
13 de campo. Estes isolados colonizam a raiz e apresentam em seu genoma diversos
14 agrupamentos gênicos responsáveis pela produção de iturina C e D, bacilosina AB e
15 bacilosina D. Esses autores preveem resultados ainda mais expressivos nos próximos
16 estudos onde esses isolados serão combinados. Nas buscas por isolados de *Bacillus*
17 com potencial para se tornar um agente de controle biológico, além de *B. subtilis*,
18 constantemente as espécies *B. firmus* e *B. amyloliquefaciens* estão entre os isolados
19 promissores. Borriss (2016) discorre em sua revisão sobre o isolado de *Bacillus*
20 *amyloliquefaciens* FZB42 e sua capacidade de controlar patógenos como *Rhizoctonia*
21 *solani* e *Xanthomonas oryzae*, promover crescimento e apresentar 10% do seu
22 genoma voltado a produção de substâncias antimicrobianas. No trabalho de Vilivelli et
23 al. (2014), entre as informações sobre o mercado de produtos biológicos, os autores
24 destacam o isolado *B. firmus* I-1582, registrado pela Bayer Crop Science para controle
25 de nematoides, principalmente *Belonolaimus longicaudatus*, que causa sérios danos
26 em grama de campos de golfe (*Cynodon* spp.) (Crow, 2014).

27 O controle de doenças por *Bacillus* é atribuído, principalmente, ao mecanismo
28 de antibiose, pois diversos isolados são reconhecidamente produtores de compostos
29 bioativos (Cawoy et al., 2011). Além disto, *Bacillus* sp. atua através da resistência
30 sistêmica induzida (Ryu et al., 2004), pois estes microrganismos também podem
31 produzir compostos elicitores da indução de resistência (Henry et al., 2012).

32 O objetivo deste trabalho foi avaliar, em condições controladas, a eficiência de
33 três isolados do gênero *Bacillus* no controle de *Erysiphe diffusa*, *Podosphaera xanthii*,

- 1 *S. sclerotiorum*, *P. pachyrhizi*, *F. solani*, *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, *C.*
- 2 *lindemuthianum* e *C. cassicola*.

2 Material e Métodos

Os isolados de *B. subtilis*, *B. firmus* e *B. amyloliquefaciens* foram fornecidos pela empresa Stoller do Brasil Ltda.

2.1 Inibição da germinação de esporos de *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, *Colletotrichum lindemuthianum* e *Phakopsora pachyrhizi*.

Para avaliar o efeito dos produtos à base de *Bacillus* spp. sobre a germinação de esporos de *F. solani*, *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, *C. Lindemuthianum* e *Phakopsora pachyrhizi* alíquotas de 10 µL de uma suspensão contendo 1×10^5 esporos/mL de cada patógeno foi depositada em lâmina de vidro, juntamente a uma alíquota de 10 µL contendo o dobro da concentração de cada produto, para assim ser obtido uma gota de 20 µL com as concentrações de 1×10^7 , 1×10^6 e 1×10^5 UFC.mL⁻¹ de *B. subtilis* e de *B. firmus*, e 1×10^8 , 1×10^7 e 1×10^6 UFC.mL⁻¹ para *B. amyloliquefaciens*. Os isolados de *Bacillus* foram multiplicados em meio líquido, sendo a informação da formulação não fornecida. As lâminas foram mantidas no escuro por 4 horas para *P. pachyrhizi* e 24 horas para *C. lindemuthianum*, *F. solani* e *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*. Todos os patógenos foram incubados a 22 ± 2 °C. O processo de germinação foi interrompido com a adição de 10 µL de lactofenol. O número de esporos germinados foi avaliado considerando a contagem de 100 esporos por repetição. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três repetições, sendo cada repetição constituída por uma lâmina de vidro com duas gotas.

2.2 Inibição do crescimento micelial de *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, *Corynespora cassiicola* e *Colletotrichum lindemuthianum*

F. solani, *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, *C. lindemuthianum* e *C. cassiicola* foram multiplicados em meio batata-dextrose-ágar (BDA) e incubados por sete dias para a obtenção de inóculo para instalação dos ensaios. Os isolados de *B. subtilis*, *B. firmus* ou *B. amyloliquefaciens* foram multiplicados em BDA e, após três dias de incubação, foi adicionado em cada placa 5 mL de água destilada estéril e, com o auxílio de uma alça de Drigalski as células foram suspensas.

Para realizar a transferência da suspensão dos agentes de biocontrole, a borda de um funil de vidro de 60 mm de diâmetro, esterilizada, foi imersa na suspensão dos isolados dos antagonistas e encostada suavemente na superfície do meio BDA, em

1 placas de Petri de 90 mm de diâmetro. Em seguida, um disco de meio BDA de 5 mm
2 de diâmetro, contendo os propágulos de cada patógeno, foi depositado no centro de
3 cada placa. As placas foram mantidas no escuro a 25 °C. Os crescimentos dos
4 patógenos foram avaliados diariamente para *F. solani* por seis dias, e a cada dois dias
5 para *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, *C. lindemuthianum* e *C. cassiicola*, sendo realizadas
6 quatro avaliações cada. Cada ensaio foi composto por cinco repetições.

7 2.3 Controle do mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) em folhas destacadas

8 Trifólios de plantas de soja da cultivar BRS 316RR foram coletados e
9 acondicionados em placas de Petri de 15 cm de diâmetro. Os antagonistas foram
10 aplicados nas concentrações de 1×10^7 , 1×10^6 e 1×10^5 UFC.mL⁻¹ para *B. subtilis* e *B.*
11 *firmus*, e 1×10^8 , 1×10^7 e 1×10^6 UFC.mL⁻¹ para *B. amyloliquefaciens*. Os isolados de
12 *Bacillus* foram multiplicados em meio líquido, sendo a informação da formulação não
13 fornecida. Comparativamente foi aplicado o fungicida procimidona (5 g L⁻¹) e água
14 destilada como testemunhas. Os produtos foram aplicados 24 horas antes da
15 inoculação (Preventivo), simultânea e 24 horas depois da inoculação (Curativo) do
16 patógeno. A inoculação foi realizada com um disco de micélio de *S. sclerotiorum* com
17 10 dias de idade sobre cada unifólio. Após a aplicação dos produtos as placas foram
18 dispostas em sala de crescimento a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ com fotoperíodo de 12 horas. A avaliação
19 foi realizada quatro dias após a inoculação medindo o diâmetro da área lesionada em
20 duas direções perpendiculares. O ensaio foi arranjado em esquema fatorial, sendo
21 utilizado onze tratamentos e três momentos de aplicação dos antagonistas, com
22 quatro repetições.

23 2.4 Controle da ferrugem da soja (*Phakopsora pachyrhizi*) em folhas destacadas

24 A metodologia utilizada foi adaptada da proposta pelo Fungicide Resistance
25 Action Committee (FRAC), onde unifólios de folhas de soja cultivar BRS 316RR,
26 completamente desenvolvidos, foram coletados, lavados e tiveram as bases dos
27 pecíolos envolvidas com algodão umedecido. Esses unifólios foram colocados com
28 face abaxial para cima e arranjados em placas de Petri contendo dois papéis de filtro
29 saturados com água destilada. As folhas foram pulverizadas com os produtos
30 contendo os isolados de *B. subtilis*, *B. firmus* e *B. amyloliquefaciens* nas
31 concentrações de 1×10^7 , 1×10^6 e 1×10^5 UFC.mL⁻¹ para *B. subtilis* e *B. firmus*, e 1×10^8 ,

1 1×10^7 e 1×10^6 UFC.mL⁻¹ para *B. amyloliquefaciens*, até o ponto de escorrimento. Os
2 isolados de *Bacillus* foram multiplicados em meio líquido, sendo a informação da
3 formulação não fornecida. As aplicações foram simulando condições de controle
4 preventivo e curativo e também foram aplicados simultaneamente à inoculação do
5 patógeno. Os unifólios foram inoculados com uma suspensão de *P. pachyrhizi*
6 contendo 10^5 uredosporos/mL e 0,1% de Tween. As placas foram mantidas em
7 câmara com fotoperíodo de 12 h, por 14 dias a 22 °C e avaliadas quanto a severidade
8 por meio de uma escala diagramática (Godoy et al., 2006), com seis variações de
9 severidade que correspondem a 0,6; 2,0; 7,0; 18,0; 42,0 e 78,5% de severidade. O
10 ensaio foi arranjado em esquema fatorial, sendo utilizado onze tratamentos e três
11 momentos de aplicação, com quatro repetições.

12 2.5 Controle do oídio da soja (*Erysiphe diffusa*) em plantas mantidas em casa-de- 13 vegetação

14 O estudo foi realizado em condições controladas de casa-de-vegetação com a
15 cultivar BRS 316RR que possui as seguintes características: hábito de crescimento
16 determinado, grupo de maturidade 6,5, resistente ao cancro da haste (*Diaporthe*
17 *phaseolorum* f. sp. *meridionalis*), podridão de Phytophthora (*Phytophthora sojae*) e a
18 mancha olho de rã (*Cercospora sojina*). As plantas foram desenvolvidas em vasos de
19 2,5 litros contendo uma mistura (1:1) de solo e substrato (casca de pinus + carvão) e
20 fertilizadas com 10 g de fertilizante NPK (10.10.10). As plantas foram mantidas em
21 uma casa-de-vegetação livre de inóculo do patógeno até o estágio fenológico V3.
22 Nesse estágio, as plantas foram pulverizadas com os produtos à base de *B. subtilis*,
23 *B. firmus* e *B. amyloliquefaciens* (Stoller do Brasil Ltda. - os isolados de *Bacillus* foram
24 multiplicados em meio líquido, sendo a informação da formulação não fornecida.), nas
25 concentrações 1×10^6 UFC.mL⁻¹ para *B. subtilis* e *B. firmus*, e 1×10^7 UFC.mL⁻¹ para *B.*
26 *amyloliquefaciens*, com auxílio de um pulverizador manual. O fungicida Ópera® (BASF,
27 Schwarzheide, Alemanha) composto pela mistura de estrobilurina (piraclostrobina) e
28 triazol (epoxiconazol), de ação sistêmica, foi utilizado como padrão, sendo as
29 pulverizações semanais. Como testemunha foi pulverizada água semanalmente.

30 Após 24 horas da primeira pulverização, as plantas foram transferidas para
31 outra casa-de-vegetação contendo plantas de soja com alta infestação de oídio. As
32 plantas foram distribuídas ao acaso entre as doentes, além da redistribuição semanal
33 após as pulverizações dos produtos. Para assegurar que as plantas receberam

1 uniformemente a inoculação do patógeno, ventiladores foram utilizados para a
2 disseminação do inóculo. Os potenciais bioagentes foram pulverizados semanalmente
3 durante quatro semanas.

4 As avaliações da severidade da doença (porcentagem de área foliar com
5 sintomas de oídio) iniciaram com o aparecimento dos primeiros sintomas e foram
6 realizadas a cada 10 dias até as plantas atingirem o estágio R3, ou seja, início da
7 formação das vagens, totalizando quatro avaliações. As avaliações da severidade
8 foram realizadas em todas as folhas centrais de cada trifólio com auxílio da escala
9 diagramática proposto por Mattiazzi (2003), com oito variações de severidade que
10 correspondem a 0,62; 1,47; 3,29; 7,7; 20,14; 27,05; 43,65 e >60% de severidade. A
11 partir destes dados, foi calculada a severidade média por planta em cada avaliação.
12 Posteriormente, foi calculada a área abaixo da curva do progresso da doença
13 (AACPD) (Campbell e Madden, 1990). O delineamento experimental foi inteiramente
14 casualizado, com quatro repetições, sendo cada repetição composta de um vaso com
15 duas plantas. A temperatura na casa-de-vegetação variou de 25 a 32 °C.

16 2.6 Controle do oídio da abobrinha (*Podosphaera xanthii*) em plantas mantidas em 17 casa-de-vegetação

18 O estudo foi realizado em condições controladas de casa-de-vegetação.
19 Plantas de abobrinha (*Cucurbita pepo*) da cultivar Caserta CAC foram desenvolvidas
20 em vasos de 2,5 litros contendo uma mistura (1:1) de solo e substrato (casca de pinus
21 + carvão) e fertilizadas com 10 g de fertilizante NPK (10.10.10). As plantas foram
22 mantidas em uma casa-de-vegetação livre de inóculo do patógeno até completarem
23 21 dias da emergência. Assim, as plantas com, aproximadamente, duas folhas
24 expandidas, foram pulverizadas com os produtos à base de *B. subtilis*, *B. firmus* e *B.*
25 *amyloliquefaciens* (Stoller do Brasil Ltda. - os isolados de *Bacillus* foram multiplicados
26 em meio líquido, sendo a informação da formulação não fornecida), nas
27 concentrações 1×10^6 UFC.mL⁻¹ para *B. subtilis* e *B. firmus*, e 1×10^7 UFC.mL⁻¹ para *B.*
28 *amyloliquefaciens* com auxílio de um pulverizador manual. O fungicida Ópera® (BASF,
29 Schwarzheide, Alemanha) composto pela mistura de estrobilurina (piraclostrobina) e
30 triazol (epoxiconazol), de ação sistêmica, foi utilizado como padrão, sendo as
31 pulverizações semanais. Como testemunha foi pulverizada água semanalmente.

32 Após 24 horas da primeira pulverização, as plantas foram transferidas para
33 outra casa-de-vegetação contendo plantas de abobrinha com alta infestação de oídio.

1 As plantas do ensaio foram distribuídas ao acaso entre as plantas doentes e
2 redistribuídas semanalmente após as pulverizações dos produtos. Para assegurar que
3 as plantas receberam uniformemente a inoculação do patógeno, ventiladores foram
4 utilizados para a disseminação do inóculo. Os potenciais agentes de biocontrole foram
5 pulverizados semanalmente durante cinco semanas.

6 As avaliações da severidade da doença (porcentagem de área foliar com
7 sintomas de oídio), de todas as folhas, iniciaram com o aparecimento dos primeiros
8 sintomas, que surgiram 10 dias após a transferência para a casa-de-vegetação com
9 plantas doentes, e, seguiram semanalmente, totalizando cinco avaliações. A partir
10 destes dados, foi calculada a severidade média por planta em cada avaliação.
11 Posteriormente, foi calculada a área abaixo da curva do progresso da doença
12 (AACPD) (Campbell e Madden, 1990). O delineamento experimental foi inteiramente
13 casualizado, com quatro repetições, sendo cada repetição composta de um vaso com
14 duas plantas. A temperatura na casa-de-vegetação variou de 25 a 32°C.

15 2.7 Análise estatística

16 Todos os ensaios foram realizados duas vezes e, para análise estatística, os
17 dados foram agrupados, pois apresentavam individualmente os mesmos resultados.
18 As análises estatísticas foram realizadas pelo teste de comparações múltiplas de
19 médias de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico SAS® 9.0.

1 3 Resultados

2 3.1 Inibição da germinação de esporos de *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* f. 3 sp. *phaseoli*, *Colletotrichum lindemuthianum* e *Phakopsora pachyrhizi*

4 Os resultados dos testes de germinação de esporos mostram que os produtos
5 testados reduziram significativamente a germinação dos esporos de todos os
6 patógenos, com exceção do *C. lindemuthianum* (Figura 1). As inibições sobre os
7 conídios de *F. solani* com a aplicação dos produtos a base de *B. subtilis*, *B. firmus* e
8 *B. amyloliquefaciens* atingiram 79, 79 e 81%, respectivamente. Enquanto que as
9 inibições relacionadas aos conídios de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* foram de até 88,
10 84 e 95% e dos uredósporos de *P. pachyrhizi* foram de até 72, 69 e 82%,
11 respectivamente. As maiores porcentagens de inibição ocorreram quando os produtos
12 foram aplicados na maior concentração para *F. solani* e *P. pachyrhizi*. Não houve essa
13 relação no ensaio com *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*.

14 3.2 Inibição do crescimento micelial de *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* f. sp. 15 *phaseoli*, *Corynespora cassiicola* e *Colletotrichum lindemuthianum*

16 Nos testes de inibição do crescimento micelial, os isolados de *B. subtilis*, *B.*
17 *firmus* e *B. amyloliquefaciens* inibiram o desenvolvimento de *Fusarium oxysporum* f.
18 sp. *phaseoli* em 7, 10 e 26%, respectivamente. No entanto, apenas o isolado de *B.*
19 *amyloliquefaciens* que inibiu significativamente o desenvolvimento de *F. solani* em
20 27%. Todos os isolados também inibiram o crescimento micelial de *C. cassiicola* e *C.*
21 *lindemuthianum* em até 41 e 30%, respectivamente. De maneira geral, os confrontos
22 com o isolado de *B. amyloliquefaciens* apresentaram as maiores inibições do
23 desenvolvimento do patógenos (Figura 2 e 3).

24 3.3 Controle do mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) em folhas destacadas

25 Em testes com folhas destacadas, a aplicação preventiva de *B.*
26 *amyloliquefaciens* reduziu em até 43% o diâmetro das lesões causadas por *S.*
27 *sclerotiorum*, enquanto que *B. subtilis* reduziu em até 45% e *B. firmus* em 30% (Tabela
28 1.). Na aplicação preventiva os produtos avaliados obtiveram maior eficiência, com as
29 diminuições na área lesionada de até 45%, enquanto que o fungicida reduziu em 83%.

1 O fungicida procimidona reduziu a severidade do mofo branco em todas as formas de
2 aplicação.

3 3.4 Controle da ferrugem da soja em folhas destacadas (*Phakopsora pachyrhizi*)

4 Nos testes em folhas destacadas, todos os isolados, independente da
5 concentração, reduziram a severidade da doença em até 96% com a aplicação
6 preventiva, em até 70% com a aplicação simultânea e em até 47% com a aplicação
7 curativa (Tabela 2.). O fungicida reduziu a severidade independente do momento de
8 aplicação e, de maneira geral, para os produtos biológicos há uma maior eficiência de
9 controle quando aplicados de forma preventiva.

10 3.5 Controle do oídio da soja (*Erysiphe diffusa*) e da abobrinha (*Podosphaera* 11 *xanthii*) em plantas mantidas em casa-de-vegetação

12 Os produtos à base de *B. subtilis*, *B. firmus* e *B. amyloliquefaciens* não
13 reduziram a severidade do oídio da soja e da abobrinha, e também as áreas abaixo
14 da curva de progresso das doenças em condições de casa-de-vegetação (Figuras 4
15 e 5, respectivamente). Neste estudo, apenas o fungicida reduziu significativamente a
16 doença.

1 4 Discussão

2 Os resultados obtidos indicam que os produtos à base de *B. subtilis*, *B. firmus*
3 e *B. amyloliquefaciens* se mostraram promissores no controle dos fitopatógenos pois,
4 em testes preliminares, reduziram a severidade da ferrugem da soja (*P. pachyrizhi*), o
5 diâmetro das lesões do mofo branco (*S. sclerotiorum*) e reduziram o desenvolvimento
6 micelial de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* e *C. cassiicola*. Apesar de todos os isolados
7 também reduzirem o desenvolvimento micelial de *C. lindemuthianum*, nenhum isolado
8 reduziu a germinação dos conídios deste patógeno. *B. amyloliquefaciens* também
9 pode ser considerado promissor em relação a *F. solani*, pois reduziu seu
10 desenvolvimento micelial e germinação dos esporos.

11 A principal vantagem dos produtos testados nestes estudos é em relação a
12 formulação, pois todos encontravam-se em meio líquido e, neste tipo de formulação
13 são encontrados, além das células, os metabólitos produzidos por espécies do gênero
14 *Bacillus* (Kumar et al., 2014). Essa combinação pode ser responsável pela ação
15 imediata destes produtos na inibição da germinação dos esporos de *P. pachyrhizi*, *F.*
16 *solani* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Figura 1.). Apesar dos metabólitos não
17 terem sido qualificados ou quantificados, é reconhecido na literatura que *Bacillus* spp.
18 possui efeito antagônico a fitopatógenos (Dalal e Kulkarni, 2013) atribuído,
19 principalmente, à produção de açúcares aminados e lipopeptídeos (Ongena e
20 Jacques, 2008; Cawoy et al., 2011; Bettiol et al., 2012) com capacidade de causar o
21 rompimento de membranas celulares (Frac e Jezierska-Tys, 2010). Os metabólitos
22 produzidos por *Bacillus* são considerados termicamente estáveis, possuem atividade
23 em uma ampla faixa de pH (Li et al., 2012) e efeito antimicrobiano duradouro na
24 superfície foliar (Wagacha et al., 2007) que podem justificar os resultados nos testes
25 de folhas destacadas em relação ao diâmetro da lesão de *S. sclerotiorum* e a
26 severidade de *P. pachyrizhi* (Tabelas 1 e 2).

27 Resultados similares de inibição da germinação de esporos (superior a 70%) e
28 diminuição da severidade (superior a 90%) de *P. pachyrizhi* em folhas destacadas
29 foram encontrados por Dorighello et al., 2015 ao utilizar os isolados de *B. subtilis* QST
30 713 e *Bacillus pumilus* QST 2808. Também são relatados por Rahman et al., (2016) e
31 por Sun et al., (2017) os isolados de *B. amyloliquefaciens* (RBN-88 e RBN 92) e *B.*
32 *subtilis* (LHS11 e FX2), respectivamente, são antagônicos a *S. sclerotiorum* por
33 produzirem substâncias que causam deformações no micélio e o rompimento celular.

1 Souza et al. (2015) demonstram que o isolado de *B. subtilis* (BREIII-107) inibiu, devido
2 a produção de lipopeptídeos que causaram a ruptura celular, o desenvolvimento
3 micelial de *F. solani*, *C. cassiicola* e *C. lindemuthianum* em 31, 40 e 53%,
4 respectivamente. Esses valores são similares aos obtidos no presente estudo, com
5 inibição destes patógenos, respectivamente, de até 46, 50 e 51% relativo a confronto
6 com *B. amyloliquefaciens*.

7 Estudos realizados por Jensen et al. (2002) demonstraram que o isolado de *B.*
8 *subtilis* GO3 foi eficaz no controle de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* em condições de
9 casa-de-vegetação e campo, além de promover aumento de até 31% na produtividade
10 do feijoeiro. Apesar destes resultados, os autores relatam uma maior consistência de
11 resultados nas condições de vegetação e, em condições de campo, no ano onde
12 ocorreram condições ambientais favoráveis ao patógeno, o efeito do isolado não foi
13 evidente. Essas informações reforçam a necessidade da integração dos métodos de
14 controle para que, em condições altamente favoráveis a doença, não ocorram
15 prejuízos econômicos. Apesar dos produtos testados não terem reduzido o progresso
16 do oídio da soja e oídio da abobrinha, outros isolados de *Bacillus* podem ser
17 prospectados, pois nossos resultados não estão em conformidade com a literatura
18 onde *B. amyloliquefaciens* S13-3 (Yamamoto et al., 2015) reduziu a severidade do
19 oídio do tomate (*Oidium neolycopersici*) e *B. amyloliquefaciens* LJ02 (Li et al., 2015)
20 reduziu a severidade do oídio do pepino (*Sphaerotheca fuliginea*) através da indução
21 de resistência sistêmica. Também no trabalho realizado por Cai et al. (2017), o
22 controle do oídio do trigo (*Blumeria graminis*) foi mediado pelo isolado de *Bacillus*
23 *valezensis* CC09 que possui em seu genoma diversos agrupamentos de genes
24 responsáveis pela produção de surfactina, iturina, bacilosina, entre outros.

25 Nos estudos envolvendo agentes de controle biológico e na experimentação
26 agrícola de modo geral, os testes se iniciam em condições controladas e os agentes
27 promissores devem, posteriormente, ser testados no campo, pois nem sempre a
28 correlação entre ensaios *in vitro* e *in vivo* são observadas (Bettiol, 1991; Ghini e
29 Nakamura, 2001). Como exemplo, nos ensaios realizados por Dorighello et al., (2015),
30 a eficiência do isolado de *B. subtilis* QST 713 em controlar a ferrugem da soja diminuiu
31 à medida que os testes passaram de condições controladas para a condição de
32 campo. Portanto, novos testes considerando as situações reais de ocorrência destas
33 doenças, devem ser realizados, pois não é possível estabelecer nos testes em
34 condições controladas as mesmas variáveis que afetam o campo, como amplas

1 variações ambientais de temperatura, umidade e radiação ultravioleta que irão afetar
2 microrganismos de ocorrência natural, além dos agentes de controle biológico.

3 Além disso, o sucesso no controle de doenças de plantas por produtos
4 biológicos pode estar atrelado a, pelo menos, cinco aspectos que devem ser
5 considerados: 1) homogeneidade de aplicação; os produtos aplicados em condições
6 de campo devem atingir de maneira homogênea todo dossel, uma vez que, de
7 maneira geral, o posicionamento do produto no terço médio e inferior do dossel ficam
8 comprometidos (Cunha et al., 2006); 2) Momento de aplicação; de acordo com Reiss
9 e Jorgensen (2017) e Twizeyimana e Hartman (2017), este aspecto pode ser decisivo
10 para o sucesso do controle e a aplicação deve ser direcionada para o momento de
11 maior vulnerabilidade do patógeno, ou seja, antes do estabelecimento da relação
12 parasitária; 3) Número de aplicações; o trabalho de Baker et al. (1985) relaciona o
13 controle da ferrugem do feijão (*Uromyces phaseoli*) com o aumento do número de
14 aplicações passando de uma para três vezes na semana. Hu et al. (2016) apresentam
15 resultados em que a incidência de *S. sclerotiorum* diminui com o aumento no número
16 de aplicações; 4) Concentração do produto; estudos de Mantecón (2008) mostraram
17 que o controle obtido em condições de campo está relacionada a concentração do
18 produto aplicado. Neste caso, o aumento da concentração de células de QST 2808
19 de $6,7 \times 10^6$ para $2,7 \times 10^7$ UFC/ml foi responsável pelo controle da septoriose da soja
20 (*Septoria glycines*). Da mesma forma, Gao et al. (2015) demonstraram que apenas
21 concentrações superiores de 1×10^7 UFC/ml de *B. subtilis* E1R-j foram eficientes no
22 controle do oídio do trigo (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*). 5) Formulação; De acordo
23 com Phae e Sodha (1991), as características do meio de cultivo podem influenciar na
24 concentração de células e nos metabólitos produzidos por estes microrganismos e,
25 estas características, podem interferir no controle obtido (Li et., 2013). Essas
26 informações devem ser consideradas nos próximos estudos para obtenção de dados
27 redundantes e, de acordo com testes em condições reais de ocorrência da doença,
28 seja possível a recomendação destes produtos como método efetivo de controle ou
29 integrante de um pacote de manejo.

30

1 Referências

- 2 Agrios, G.N., 2005. Plant pathology. San Diego: Elsevier. 922 p.
- 3 Al-Sadi, A.M. Al-Masoodi, R.S., Al-Ismaïli, M., Al-Mahmooli, I.H., 2015. Population
4 structure and development of resistance to hymexazol among *Fusarium solani*
5 populations from date palm, citrus, and cucumber. J. Phytopathol. 163, 11-12.
- 6 Baker, K.F., Cook, R.J., 1974. Biological control of plant pathogens. San Francisco:
7 WH Freeman and Co. 110 p.
- 8 Baker, C.J.; Stavely, J.R.; Mock, N., 1985. Biocontrol of bean rust by *Bacillus subtilis*
9 under field conditions. Plant Dis. 69, 770-772.
- 10 Bettiol, W., 1991. Seleção de microrganismos antagônicos a fitopatógenos. In:
11 Bettiol, W., (Ed.), Controle Biológico de Doenças de Plantas. Jaguariúna:
12 EMBRAPA-CNPDA. 223-236.
- 13 Bettiol, W., Morandi, M.A.B., Pinto, V.Z., Paula Junior, T.J., Corrêa, E.D., Moura,
14 A.B., Lucon, C.M.M., Costa, J.C.B., Bezerra, J.L., 2012. Produtos comerciais a
15 base de agentes de biocontrole de doenças de plantas. Jaguariúna: Embrapa
16 Meio Ambiente. 155 p.
- 17 Borriss, R., 2016. Phytostimulation and biocontrol by the plant-associated *Bacillus*
18 *amyloliquefaciens* FZB42: An update. Em: Islan, M.T., Rahman, M., Pandey, P.,
19 Jha, C.K. Aeron, A. (Eds.), Bacilli and Agrobiotechnology. 1, 163-184.
- 20 Cabral, W.C., Diniz Campos, H., Costa, L.S.A.S., 2016. Simon, A. *In vitro*
21 susceptibility of *Corynespora cassiicola* isolate from Brazil fields to fungicide. Afric.
22 J. Agric. Res. 11, 1699-1711.
- 23 Cai, X., Liu, C. Wang, B., Xue Y., 2017. Genomic and metabolic traits endow *Bacillus*
24 *velezensis* CC09 with potential biocontrol agent in control of wheat powdery
25 mildew disease. Microbiol. Res. 196, 89-94.
- 26 Campbell, C.L., Madden, L.V., 1990. Introduction to plant disease epidemiology.
27 Willey, New York. 532p.
- 28 Carvalho, D.D.C., Mello, S.C.M., Lobo Junior M., Geraldine, A.M., 2011. Biocontrole
29 de patógenos de sementes e promoção do crescimento de mudas de feijoeiro por
30 *Trichoderma harzianum*. Pesq. Agropec. Bras. 46, 822-828.
- 31 Cawoy, H., Bettiol, W., Fickers, P., Ongena M. 2011. *Bacillus*-Based biological
32 control of plant diseases. In: Stoytcheva M. Pesticides in the Modern World -
33 Pesticides Use and Management, ISBN 978-953-307-459-7, DOI: 10.5772/17184.
34 P.273-302.
- 35 Crow, W., 2014. Effects of a commercial formulation of *Bacillus firmus* i-1582 on golf
36 course bermudagrass infested with *Belonolaimus longicaudatus*. J. Nematol. 46,
37 331-335.

- 1 Cunha, J. P. A. R., Reis, E. F., Santos, R. O., 2006. Controle químico da ferrugem
2 asiática da soja em função de ponta de pulverização e de volume de calda. Cien.
3 Rural. 36, 1360-1366.
- 4 Dalal, J.; Kulkarni, N., 2013. Antagonistic and plant growth promoting potentials of
5 indigenous endophytic bacteria of soybean [*Glycine max* (L) Merril]. Curr. Res.
6 Microbiol. Biotechnol. 1, 62-69.
- 7 Dorighello D.V., Bettiol W., Maia N.B., de Campos Leite R. M. V. B., 2015.
8 Controlling asian soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) with *Bacillus* spp. and
9 coffee oil. Crop Prot. 67, 59-65.
- 10 Ellis, J., 2017. Can plant microbiome studies lead to effective biocontrol of plant
11 diseases? Mol. Plant Microbe Interact. 10. 12-16.
- 12 Frac, M., Jezierska-Tys, S., 2010. Microbial diversity of soil environment. Post.
13 Mikrobiol. 49, 47-58.
- 14 Gardener, B.B., 2004. Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. in agricultural
15 systems. Phytopathol. 94, 1252-1258.
- 16 Gao, X., Gong, Y., Huo, Y., Han, Q., Kang, Z., Huang, L., 2015. Endophytic *Bacillus*
17 *subtilis* strain E1R-J is a promising biocontrol agent for wheat powdery mildew.
18 Biomed Res. Int. 20, 1-8.
- 19 Ghini, R., Nakamura, D., 2001. Seleção de antagonistas e nutrientes que induzem
20 supressividade de solos a *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em microcosmos e
21 *in vivo*. Summa Phytopathol. 27, 318-322.
- 22 Godoy, C.V., Koga, L.J., Canteri, M.G., 2006. Diagrammatic scale for assessing
23 soybean rust. Fitopatol Bras. 31, 63-68.
- 24 Hartman, G.L., Pawlowshi, M.L., Herman, T.K., Eastburn, D., 2016 Organically grown
25 soybean production in the USA: constraints and management of pathogens and
26 insect pestes. Agron. 6, 10.3390.
- 27 Henry, G., Thonart, P., Ongena, M., 2012. PAMPs, MAMPs, DAMPs and others: An
28 update on the diversity of plant immunity elicitors. Biotechnol. Agron. Soc. Environ.
29 16, 257-268.
- 30 Hu, X., Roberts, D., Xie, L., Maul, J.E., Yu, C., Li, Y., Jiang, M., Liao, X., Che, Z.,
31 Liao, X., 2016. Formulation of *Bacillus subtilis* BY-2 suppress *Sclerotinia*
32 *sclerotiorum* on oilseed rape in the field. Biol. Control. 70, 54-64.
- 33 Jensen, C.E., Percich, J.A., Graham, P.H., 2002. Integrated management strategies
34 of bean root rot with *Bacillus subtilis* and *Rhizobium* in Minnesota. Field Crops
35 Res. 74, 107-115.
- 36 Kobori, R.F., Brunelli, K.R., Gioria, R., 2016. Impacto potencial das mudanças
37 climáticas sobre as doenças da alface no Brasil. Em: Ghini, R., Hamada, E.,
38 Bettiol, W.(Eds), Impacto das mudanças climáticas sobre as doenças da alface no
39 Brasil. 1, 131-142.

- 1 Kumar, Y., Singh, P.K., Sing A.K., Mash, H., Peter, J.K., Rath., S., 2014. Production
2 optimization of alpha amylase from *Bacillus altitudinis*. Int. J. Sci. Engin. Tech.
3 Res. 3, 564-573.
- 4 Lahlai, R., Peng, G., Mcgregor, L., Gossen, B. D., 2011. Mechanisms of the
5 biofungicide Serenade (*Bacillus subtilis* QST 713) in suppressing clubroot. Bio.
6 Sci. Technol. 21, 1351-1362.
- 7 Li, H., Wang, X., Han, M., Zhao, Z., Wang, M., Tang, Q., Liu, C., Kemp, B., Gu, Y.,
8 Shuang, J., Xue, Y., 2012. Endophytic *Bacillus subtilis* ZZ120 and its potential
9 application in control of replant diseases. Afric. J. Biotech. 11, 231-242.
- 10 Li, H., Zhao, J., Feng, H., Huang, L., Kang, Z. Li, H., 2013. Biological control of wheat
11 stripe rust by an endophytic *Bacillus subtilis* strain E1R-j in greenhouse and field
12 trials. Crop Prot. 43, 201-206
- 13 Li, Y., Gu, Yilin., Li., J., Xu, M., Wei, Q., Wang, Y., 2015. Biocontrol agent *Bacillus*
14 *amyloliquefaciens* LJ02 induces systemic resistance against cucurbits powdery
15 mildew. Front Microbiol. 6, 833.
- 16 Madigan, M.; John, M.; Kelly B.; Daniel, B.; David, S., 2016. Microbiologia de Brock,
17 14° ed.. Porto Alegre: Artmed, 960 p.
- 18 Mantecón, J. D., 2008. Efficacy of chemical and biological strategies for controlling
19 the soybean brown spot (*Septoria glycines*). Cienc. Investig. Agrar. 38, 211-214.
- 20 Mattiazzi, P., 2003. Efeito do oídio (*Microsphaera diffusa* Cooke & Peck) na
21 produção e duração da área foliar sadia da soja. 49f. Dissertação (Mestrado) –
22 Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba. 49p.
- 23 Ongena, M.; Jacques, P., 2008. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant
24 disease biocontrol. Trends Microbiol. 16, 115-125.
- 25 Park, M.J., Kim, B.S., Choi, Y., Cho, S.E., Shin, H.D., 2015. First report of powdery
26 mildew caused by *Golovinomyces ambrosiae* on sunflower in Korea. Plant Dis. 99,
27 557.
- 28 Pastor-Corrales, M.A., Tu, J.C., 1989. Anthracnose. Em: Schwartz, H.F., Pastor-
29 Corrales, M.A. (Eds.), Bean Production Problems in the Tropics. 1, 77-104.
- 30 Petkar, A., Langston, D.B., Buck, J.W., Stevenson, K.L., Ji, Pingsheng., 2017.
31 Sensitivity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* to prothioconazole and
32 thiophanate-methyl and gene mutation conferring resistance to thiophanate-
33 methyl. Plant Dis. 101, 366-371.
- 34 Phae, C., Sodha, M., 1991. Investigation of optimal conditions for separation of iturin
35 an antifungal peptide produced by *Bacillus subtilis*. J. Ferment. Bioeng.71, 118-
36 121.
- 37 Rahman, M.D., Hossain, D.M., Suzuki, K., Shiiya, A., Suzuki, K., Dey, T.P., Nonaka,
38 M. Harada., 2016. Suppressive effects of *Bacillus* spp. on mycelia, apothecia and

- 1 sclerotia formation of *Sclerotinia sclerotiorum* and potential as biological control of
2 white mold on mustard. Australas. Plant Pathol. 45, 103-117.
- 3 Rai, M., Carpinella, M., 2006. Naturally occurring bioactive compounds. Amsterdam:
4 Elsevier; p. 502.
- 5 Reiss, A.; Jorgensen, L.N., 2017. Biological control of yellow rust of wheat (*Puccinia*
6 *striiformis*) with Serenade® ASO (*Bacillus subtilis* strain QST 713). Crop Prot. 93,
7 1-8.
- 8 Ryu, C.M., Farag, M.A., Hu, C.H., Reddy, M.S., Kloepper, J.W., Paré, P.W., 2004.
9 Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. Plant Physiol. 134,
10 1017–1026.
- 11 Saharan, B.S., Nehra, V., 2011. Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A critical
12 review. Life Sci. Med. Res. 21, 1-30.
- 13 Santoyo, G., Orozco-Mosqueda, M.D., Govindappa, M., 2012. Mechanisms of
14 biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus*
15 and *Pseudomonas*: a review. Biocontrol Sci Technol. 22, 855-872.
- 16 Scherb, C.T., Mehl, A., 2006. FRAC (Fungicide Resistance Action Committee) e
17 *Phakopsora Pachyrhizi*: Detached Leaf Test. Disponível em: [http://www.frac.info/
18 Monitoring_Methods/anhang/PHAKPA_detached_leaf_monitoring_method_BCS_
19 2006_V1.pdf](http://www.frac.info/Monitoring_Methods/anhang/PHAKPA_detached_leaf_monitoring_method_BCS_2006_V1.pdf) (acesso 14/10/15).
- 20 Schmitz, H.K., Medeiros, C.A., Craig, I.R., Stammler, G., 2013. Sensitivity of
21 *Phakopsora pachyrhizi* towards quinone-outside-inhibitors and demethylation-
22 inhibitors, and corresponding resistance mechanisms. Pest Manag. Sci. 70, 378-
23 388.
- 24 Sousa, V.M., Siqueira, C.S., Machado, J.C., 2016. Conventional PCR for detection of
25 *Corynespora cassiicola* in soybean seeds. J. Seed Sci. 38, 85-91.
- 26 Souza, R.D., Mendonça, E.A.F., Soares, M.A., 2015. Atividade antagônica a
27 microrganismos patogênicos por bactérias endofíticas isoladas de *Echinodorus*
28 *scaber*. Summa Phytophatol. 41, 229-232.
- 29 Sun, G., Yao, T., Feng, C., Chen, L., Li, J., Wang, L., 2017. Identification and
30 biocontrol potential of antagonistic bacteria strain against *Sclerotinia sclerotiorum*
31 and their growth-promoting effects on *Brassica napus*. Biol. Control. 104, 35-43.
- 32 Tongon, R., Kasen, S., 2016. Fungal metabolites from *Chaetomium brasiliense* to
33 inhibit *Fusarium solani*. J. Agric. Technol. 12, 1465-1474.
- 34 Twizeyimana, M., Hartman, G.L., 2017. Sensitivity of *Phakopsora pachyrhizi* isolates
35 to fungicides and reduction infection based on fungicide and timing of application.
36 Plant Dis. 101, 121-128.
- 37 Vilivelli, S.L.S., Vos, P., Kromann, P., Declerck, S. Prestwich, B.D. Biological control
38 agents: from field to market, problems, and challenges. Trends Biotechnol. 32,
39 493-495.

- 1 Wagacha, J. M., Muthomi, J. W., Mutitu, E. W., Mwaura, F. B., 2007. Control of bean
2 rust using antibiotics produced by *Bacillus* and *Streptomyces* species-translocation
3 and persistence in snap beans. J. Appl. Sci. Environ. Manag. 11, 165 - 168.
- 4 Wang, J., Bradley, C.A., Stenzel, O., Pedersen, D.K., Carlson, U.R., Chilvers, M.I.,
5 2017. Baseline sensitivity of *Fusarium virguliforme* to fluopyram fungicide. Plant
6 Dis. 101, 576-582.
- 7 Xavier, S.A.; Canteri, M.G.; Barros, D.C.M.; Godoy, C.V., 2013 Sensitivity of
8 *Corynespora cassiicola* from soybean to carbendazim and prothioconazole. Trop.
9 Plant Pathol. 38, 431-435.
- 10 Yamamoto, S., Shiraish, S., Kawagoe, Y., Mochizuki, M., Suzuki, S., 2015. Impact
11 *Bacillus amyloliquefaciens* S13-3 on control of bacterial wilt and powdery mildew
12 in tomato. Pest Manag. Sci. 71, 722-727.
- 13 Yuliar, Y., Nion, Y.A., Toyota, K., 2015. Recent trends in control methods for bacterial
14 wilt diseases caused by *Ralstonia solanacearum*. Microbes Environ. 30, 1-11
- 15 Zhao, P., Quan, C., Wang, Y., Wang, J., Fan, S., 2014. *Bacillus amyloliquefaciens* Q-
16 426 as a potential biocontrol agent against *Fusarium oxysporum* f. sp. *spinaciae*. J.
17 Bas. Microbiol. 54, 448-456.
- 18 Zhou, F., Zhu, F.X., Zhang, X.L., Zhang, A.S., 2014. first report of dimethachlon
19 resistance in field isolates of *Sclerotinia sclerotiorum* on oilseed rape in shaanxi
20 province of northwestern china. Plant Dis. 98, 568.

1 Tabela 1: Efeito de *Bacillus subtilis*, *Bacillus firmus* e *Bacillus amyloliquefaciens*, em três momentos
 2 de aplicação, sobre o diâmetro (mm) da lesão causada por *Sclerotinia sclerotiorum* em folhas
 3 destacadas de soja da cultivar BRS 316RR.

Tratamento	Concentração	Momento de aplicação		
		Preventivo	Simultâneo	Curativo
<i>B. subtilis</i>	1 x 10 ⁷	29,2 abB	41,1 aA	24,8 dC
	1 x 10 ⁶	18,8 cC	35,2 bA	24,4 dB
	1 x 10 ⁵	29,4 abB	25,1 dC	37,0 abA
<i>B. firmus</i>	1 x 10 ⁷	23,9 bcB	32,5 bcA	24,5 dB
	1 x 10 ⁶	34,1 aB	41,7 aA	39,3 aA
	1 x 10 ⁵	34,0 aA	35,3 abA	32,8 bcA
<i>B. amyloliquefaciens</i>	1 x 10 ⁸	20,8 cB	32,8 bcA	31,5 bcA
	1 x 10 ⁷	19,5 cB	34,3 bcA	31,8 bcA
	1 x 10 ⁶	28,7 abB	29,0 cdB	33,5 abcA
Fungicida	5 g/l	5,7 dA	5,3 eA	5,75 eA
Testemunha	Água	34,3 aA	33,3 bcA	29,5 cdB
Coeficiente de variação		9,75		

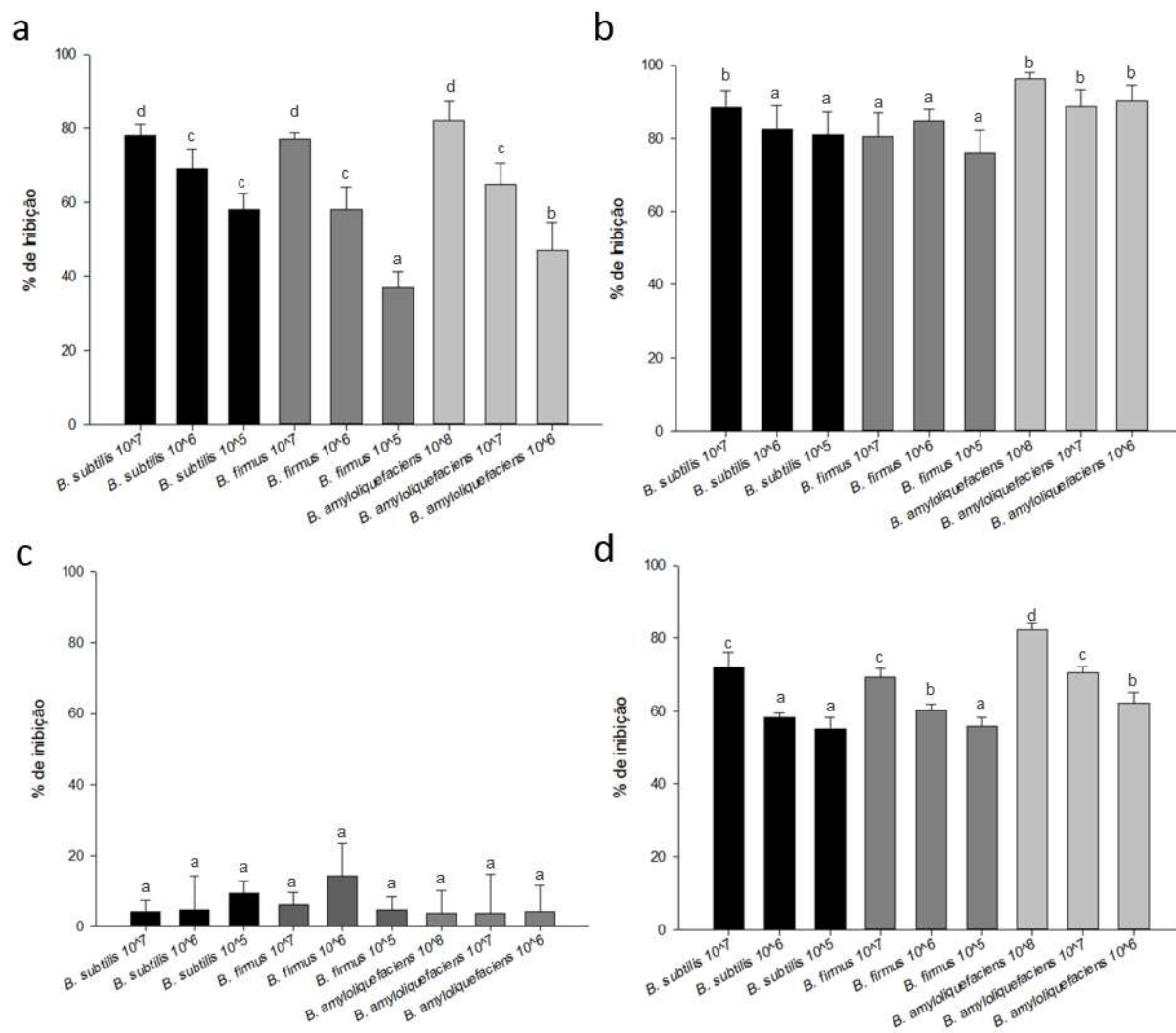
4 Médias seguidas por letras minúsculas iguais nas colunas e maiúsculas iguais na linha, não
 5 diferem entre si pelo teste de Tukey (0,05 probabilidade). Fungicida = Sumilex® = procimidona
 6 (Sumitomo Chemical Company, Osaka, Japão).
 7

1 Tabela 2: Efeito da aplicação de *Bacillus subtilis*, *Bacillus firmus* e *Bacillus amyloliquefaciens*, em três
 2 momentos de aplicação, na severidade (%) da ferrugem da soja (*Phakopsora pachyrhizi*) em folhas
 3 destacadas de soja da cultivar BRS 316RR.

Tratamento	Concentração	Momento de aplicação		
		Preventivo	Simultâneo	Curativo
<i>B. subtilis</i>	1 x 10 ⁷	6,1 bcC	30,8 bcdB	46,0 aA
	1 x 10 ⁶	3,8 bcB	29,5 bcdeA	37,4 abA
	1 x 10 ⁵	6,0 bcB	22,9 cdeA	24,1 cdA
<i>B. firmus</i>	1 x 10 ⁷	7,0 bcB	21,4deA	27,9 bcdA
	1 x 10 ⁶	14,3 bB	39,0 bA	19,0 dB
	1 x 10 ⁵	1,4 cC	33,3 bcdA	20,1 dB
<i>B. amyloliquefaciens</i>	1 x 10 ⁸	1,6 cC	17,2eA	20,9 dA
	1 x 10 ⁷	1,7 cC	34,1 bcA	23,3 dB
	1 x 10 ⁶	2,7 bcB	32,7 bcdA	25,5 bcdA
Fungicida	5 g/l	1,0 cA	1,0 fA	0,6 eA
Testemunha	Água	36,2 aB	57,aA	36,0 abcB
Coeficiente de variação		26,8		

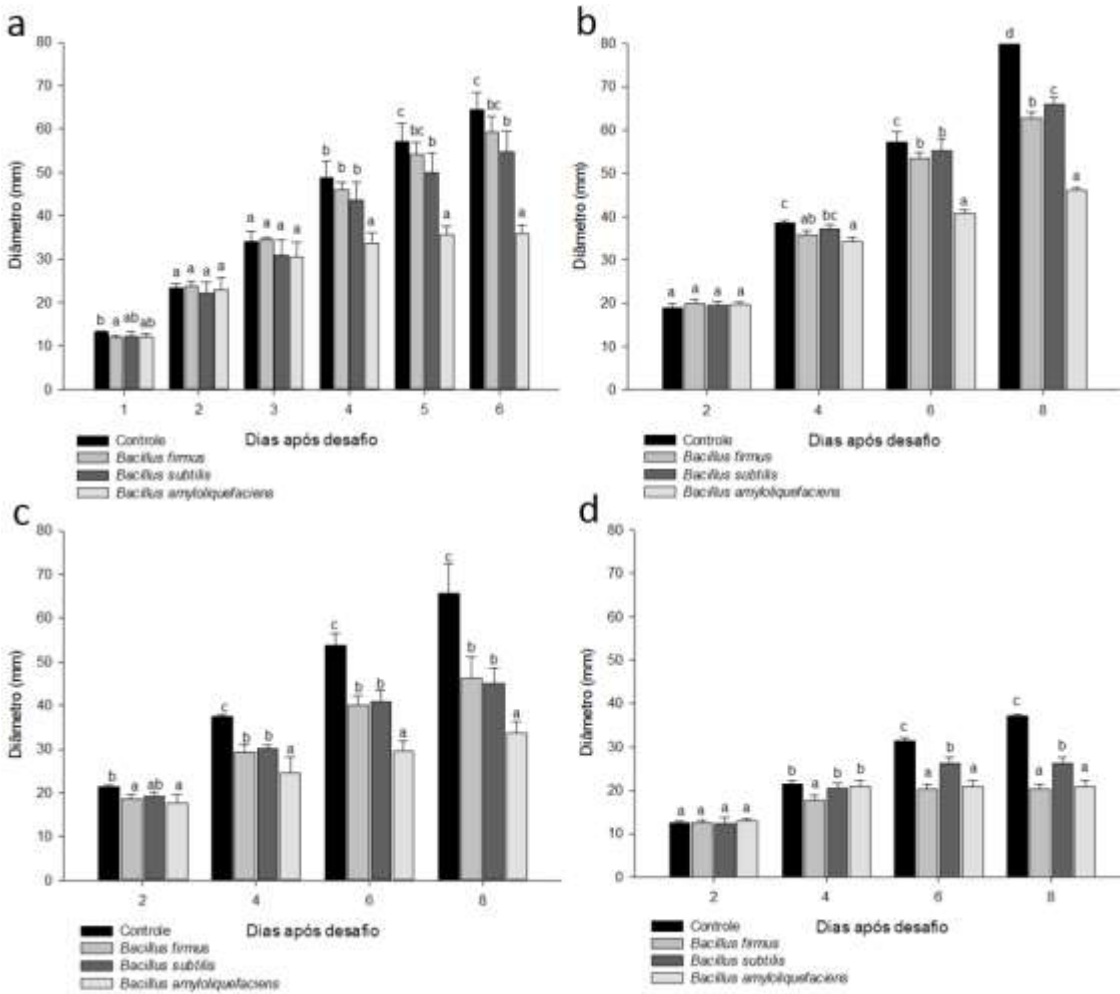
4 Médias seguidas por letras minúsculas iguais nas colunas e maiúsculas iguais na linha, não
 5 diferem entre si pelo teste de Tukey (0,05 probabilidade). Fungicida = Ópera® = piraclostrobina +
 6 epoxiconazol (BASF, Schwarzheide, Alemanha).
 7

1 Figura 1: Germinação de esporos de *Fusarium solani* (a), *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (b),
 2 *Colletotrichum lindemuthianum* (c) e *Phakopsora pachyrhizi* (d) por isolados de *Bacillus subtilis*, *Bacillus*
 3 *firmus* e *Bacillus amyloliquefaciens*.



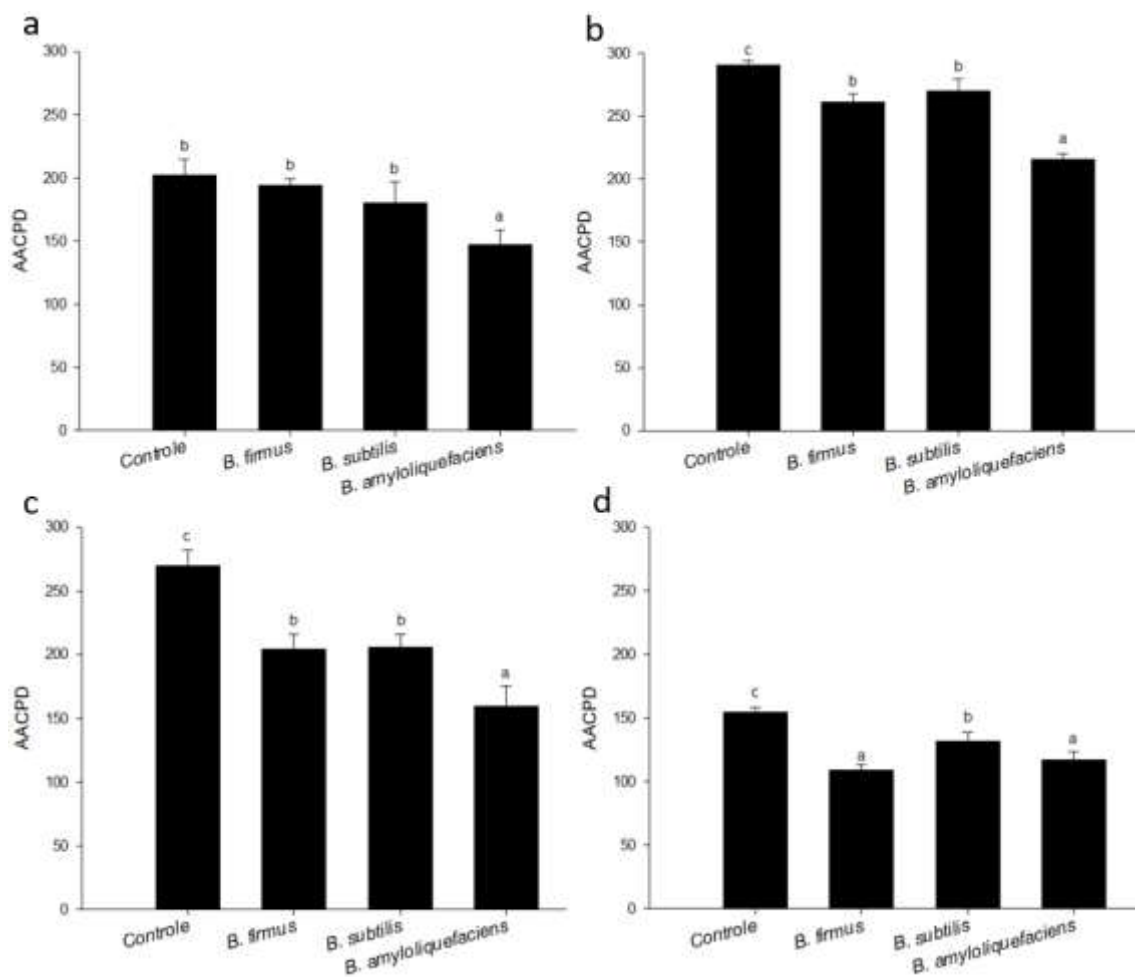
4
5
6

1 Figura 2: Crescimento micelial de *Fusarium solani* (a), *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (b),
 2 *Corynespora cassiicola* (c) e *Colletotrichum lindemuthianum* (d) em confronto com os isolados de
 3 *Bacillus subtilis*, *Bacillus firmus* e *Bacillus amyloliquefaciens*.



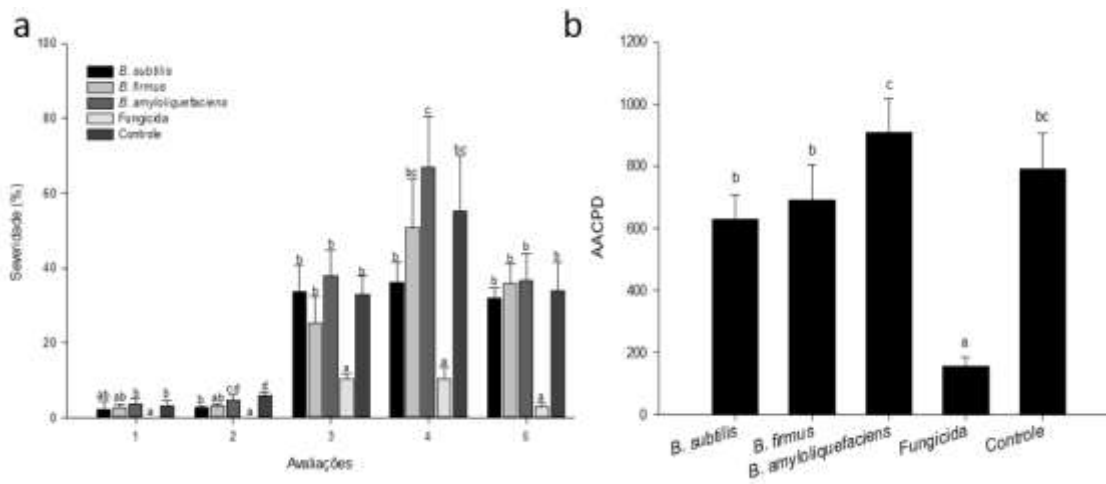
4
5
6

- 1 Figura 3: Área abaixo da curva do progresso da doença para as avaliações do crescimento micelial
 2 de *Fusarium solani* (a), *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (b), *Corynespora cassiicola* (c) e
 3 *Colletotrichum lindemuthianum* (d) em confronto com os isolados de *Bacillus subtilis*, *Bacillus firmus* e
 4 *Bacillus amyloliquefaciens*.

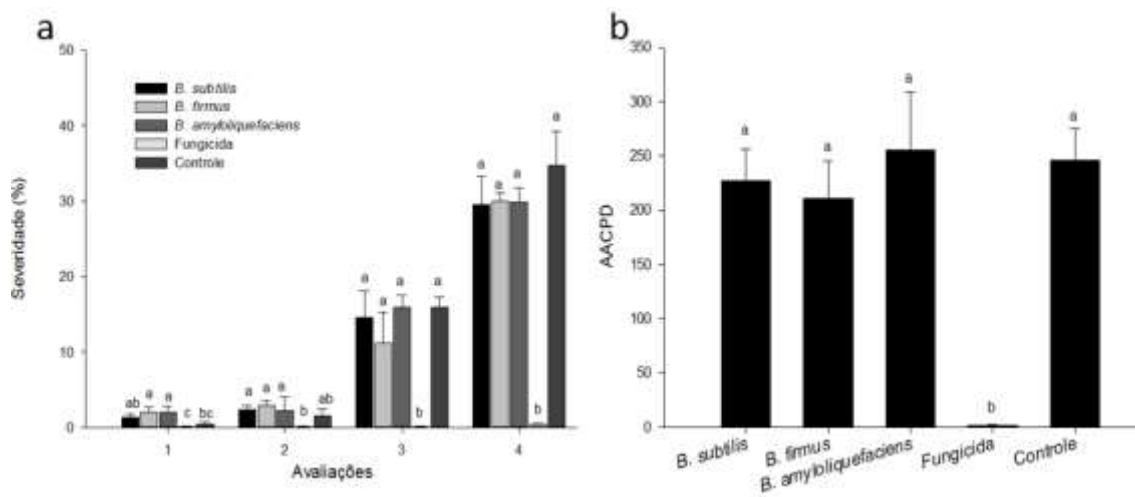


5
6

- 1 Figura 4: Efeito da aplicação *Bacillus subtilis*, *Bacillus firmus*, *Bacillus amyloliquefaciens* e fungicida
 2 comercial (Piraclostrobina + Epoxiconazol) sobre a severidade (a) e área abaixo da curva de
 3 progresso da doença (b) do oídio da abobrinha (*Podosphaera xanthii*) em plantas da cultivar Caserta
 4 CAC cultivadas em casa-de-vegetação.



- 1 Figura 5: Efeito da aplicação *Bacillus subtilis*, *Bacillus firmus*, *Bacillus amyloliquefaciens* e fungicida
 2 comercial (Piraclostrobina + Epoxiconazol) sobre a severidade (a) e área abaixo da curva de
 3 progresso da doença (b) do oídio soja (*Erysiphe diffusa*) em plantas da cultivar BRS 316RR
 4 cultivadas em casa-de-vegetação.



5

1 **4 Seleção de isolados de *Bacillus* antagônicos a *Sclerotinia sclerotiorum* e**
2 **promotores de crescimento de soja²**

3 Dalton Vinício Dorighello^{1*}, Thiago Costa Ferreira¹, Fabiana Fantinatti Garboggini²,
4 Nataly Ruiz Quiñones², Wagner Bettiol³

5 ¹Faculdade de Ciências Agronômicas (FCA) – Universidade Estadual Paulista Júlio
6 de Mesquita Filho (UNESP)

7 ²Universidade de Campinas - UNICAMP

8 ³Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Meio Ambiente

9 *Autor para correspondência: E-mail: dalton.agro@gmail.com;

10

11 **RESUMO**

12 A utilização de microrganismos na agricultura vem se destacando, principalmente
13 pela utilização de bactérias do gênero *Bacillus*, que são aplicadas para o controle
14 de pragas e doenças, bem como para a promoção de crescimento, resultando em
15 ganhos produtivos. Desta forma, este trabalho teve como objetivo avaliar o
16 potencial de *Bacillus* quanto à antibiose a *Sclerotinia sclerotiorum*, promoção de
17 crescimento e atividade das enzimas peroxidase (PO), polifenoloxidase (PPO) e
18 fenilalanina amônia-liase (FAL) em plantas de soja. Para isso, foi realizada uma
19 seleção para verificar o antagonismo de *Bacillus* em confronto com *S. sclerotiorum*
20 e outro para verificar o efeito da promoção de crescimento das plantas. Os isolados
21 selecionados como promissores foram, posteriormente, avaliados em casa-de-
22 vegetação em relação a capacidade de promover crescimento e aumentarem a
23 atividade das enzimas relacionadas à defesa das plantas através da inoculação de
24 sementes, com ou sem a co-inoculação do *Bradyrhizobium japonicum*. Os
25 resultados demonstraram que a seleção realizada *in vivo* para promotores de
26 crescimento foi eficiente, pois todos os isolados selecionados diferiram da
27 testemunha em pelo menos um dos componentes avaliados. Apesar de apenas o

² Este capítulo foi redigido em formato de artigo de acordo com as normas da revista Crop Protection.

- 1 isolado de *Bacillus* AP-25 (*Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum*) ter aumentado a
- 2 atividade da PO, este e os demais inibiram em mais de 30% o crescimento de *S.*
- 3 *sclerotiorum*. Assim, existe potencial para que os isolados selecionados possam
- 4 ser utilizados como promotores de crescimento na cultura da soja, além de
- 5 poderem exercer papel do controle desta doença.
- 6 **Palavra-chave:** Promoção de crescimento, *Bacillus*, Soja.

1 1 Introdução

2 As bactérias do gênero *Bacillus* compõe parte significativa dos produtos
3 biológicos comercializados no mundo (Gutierrez-Manero et al., 2003). Isso se deve
4 a sua distribuição cosmopolita (Claus e Barkeley, 1986), versatilidade em produzir
5 diversas substâncias de interesse vegetal como fito-hormônios e solubilizadores
6 minerais (Calvo et al., 2010; Huang et al., 2014) e a capacidade de controlar
7 patógenos importantes como *Sclerotinia sclerotiorum* (Rahman et al., 2016).

8 *S. sclerotiorum* é um fungo necrotrófico que causa prejuízos a importantes
9 culturas, principalmente, na cultura na soja, pois o fungo encontra-se amplamente
10 distribuído entre os maiores produtores mundiais do grão, incluindo os Estados
11 Unidos, Brasil e Argentina, entre outros (Wrather et al., 2001). Nos últimos anos,
12 diversos microrganismos de controle biológico têm sido selecionados por
13 apresentarem potencial no controle deste patógeno, entre eles *Clonostachys rosea*
14 (Rodríguez et al., 2015), *Trichoderma harzianum* (Zhang et al., 2016) e,
15 principalmente, isolados de *Bacillus* (Hu et al, 2016; Sun et al., 2017) devido à
16 facilidade de multiplicação, estabilidade do formulado (Meng et al., 2015) e por
17 produzirem substâncias antimicrobianas estáveis termicamente e com ação em
18 uma ampla faixa de pH (Li et al., 2012, Kurata et al., 2017).

19 As bactérias do gênero *Bacillus* podem ser consideradas rizobactérias
20 promotoras de crescimento em planta (RPCP) (Lugtenberg e Kamilova, 2009), pois
21 apresentam habilidade de colonizar a rizosfera e promover o crescimento vegetal
22 (Compant et al., 2010). As rizobactérias são essenciais para a reciclagem de
23 nutrientes (Glick, 2012) e possuem potencial como biofertilizantes (Saharan e
24 Nehra, 2011) para incremento da produtividade, além de poder beneficiar a planta
25 durante períodos de estresses (Kavamura et al., 2013). Como RPCP, estudos
26 realizados por Jain et al. (2016) mostraram que isolados de *Bacillus* podem
27 incrementar, em soja, o peso fresco da parte aérea e da raiz, além de aumentar o
28 número de raízes laterais. Mena-Violante e Olalde-Portugal (2007) verificaram
29 aumento do tamanho e melhoria da textura de frutos de tomate com o uso de *B.*
30 *subtilis* BEB-13. Ainda com tomateiro, utilizando *B. pumilus* 48 foi observado
31 incrementos na altura das plantas nos estágios iniciais do desenvolvimento (Silva

1 et al., 2008), além do relato do aumento de 145% na velocidade de germinação das
2 sementes (Kefela et al., 2015) e aumento na absorção de nutrientes.

3 Bai et al. (2002) demonstraram versatilidade destes microrganismos, pois a
4 sua utilização em co-inoculação com *Bradyrhizobium japonicum* foi responsável
5 pelo incremento de biomassa e produtividade em plantas de soja. Também a co-
6 inoculação de RPCP com *Rhizobium phaseoli* em feijão aumentou a absorção de
7 fósforo e matéria seca (Stajković et al., 2011).

8 Parte dos mecanismos responsáveis por esses efeitos foram demonstrados
9 por Pinglan et al. (2015) que, ao analisar o genoma do isolado de *B.*
10 *amyloliquefaciens* L-H15, verificaram genes responsáveis pela produção de ácido
11 indolacético (AIA), acetoina, além de iturina A e formação de biofilme. Além disso,
12 algumas cepas de *B. subtilis* são capazes de produzir a enzima fosfatase e 2,3
13 butanediol (Kanchiswamy et al., 2015) e estimularem enzimas relacionadas à
14 defesa da planta, como PO, PPO e FAL (Jetiyanon, 2007), tornando esses
15 microrganismos promissores agente de biocontrole e RPCP.

16 Assim, estes microrganismos podem impulsionar ganhos produtivos na
17 cultura da soja. Dessa forma, o presente estudo teve por objetivos realizar a
18 seleção de isolados de *Bacillus* antagonistas a *S. sclerotiorum* e com capacidade
19 de promover crescimento em plantas de soja.

1 2 Material e Métodos

2 2.1 Seleção de isolados de *Bacillus* antagônicos a *Sclerotinia sclerotiorum*

3 O isolado de *S. sclerotiorum* pertencente a coleção da Embrapa Meio
4 Ambiente foi multiplicado em meio batata-dextrose-ágar (BDA) e incubado por 4
5 dias a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ para a obtenção do inóculo para a realização dos estudos. Destas
6 placas, foram retirados discos de micélio de 5 mm que foram, em seguida,
7 dispostos no centro das placas de Petri (90 x 15 mm) contendo BDA para confronto
8 com os isolados de *Bacillus* spp.

9 Em placas de Petri contendo BDA foram multiplicados 138 isolados de
10 *Bacillus* spp. e incubados por 2 dias a uma temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Após a
11 incubação, as placas receberam 5 mL de água destilada esterilizada e as colônias
12 foram suspensas, com auxílio de uma alça de uma alça de Drigalski. Para realizar
13 a transferência das suspensões de *Bacillus* para as placas contendo o disco de
14 micélio, a borda de um funil de vidro de 60 mm de diâmetro, esterilizada, foi imersa
15 na suspensão dos isolados e suavemente encostada na superfície de meio BDA,
16 como um carimbo, em torno do disco de micélio. As placas com os discos de micélio
17 de *S. sclerotiorum* e os isolados de *Bacillus* foram mantidas a $25 \pm 2^\circ\text{C}$. O
18 crescimento do patógeno foi avaliado quando, na placa sem qualquer confronto, o
19 patógeno atingia 60 mm de diâmetro. Cada ensaio foi composto por quatro
20 repetições (placas) e os resultados transformados em % de inibição pela equação:
21 Inibição (%) = $((C-T)/C)*100$, onde C = crescimento do fungo sem confronto e T =
22 crescimento do fungo em confronto (Rahman et al., 2016).

23 2.2 Seleção dos isolados de *Bacillus* antagônicos a *Sclerotinia sclerotiorum* para 24 promoção de crescimento de plantas de soja.

25 Para verificar o possível efeito dos isolados de *Bacillus* pertencentes a
26 coleção da Embrapa Meio, que foram promissores no antagonismo a *S.*
27 *sclerotiorum*, em promoverem o crescimento em plantas de soja através da
28 inoculação via tratamento de sementes, foram realizados estudos em casa-de-
29 vegetação.

1 Para o tratamento das sementes, previamente, os isolados de *Bacillus* spp.
2 foram cultivados em placas de Petri com meio de cultura BDA por 1 dia. Essas
3 placas receberam 5 ml de solução salina (0,85% NaCl) para suspensão das
4 colônias bacterianas e, em seguida, esta suspensão foi calibrada para 10^8 células
5 mL^{-1} em espectrofotômetro ($\text{DO}_{550}=0,1$) através de diluições seriadas. As
6 sementes desinfestadas por 30 segundos em solução de álcool etílico 70% e 2
7 minutos em hipoclorito de sódio a 0,5%, foram imersas por cerca de 3 minutos nas
8 suspensões bacterianas, retiradas e colocadas sobre gaze para secar. As
9 sementes do tratamento controle, sem inoculação da bactéria, foram imersas pelo
10 mesmo período na solução salina a 0,85% esterilizada.

11 Três ensaios foram realizados utilizando as sementes tratadas com os
12 isolados que apresentaram inibições significativas, *in vitro*, para *S. sclerotiorum*.
13 Os dois primeiros ensaios foram arrançados em esquema fatorial (20×2), sendo
14 utilizados 19 isolados e a testemunha (sem bactéria) e duas cultivares distintas
15 (BMX POTÊNCIA RR e BRS 113), com quatro repetições. O terceiro ensaio seguiu
16 o delineamento inteiramente casualizado com 20 isolados e a testemunha (sem
17 bactéria) com quatro repetições, sendo utilizada apenas a cultivar BMX POTÊNCIA
18 RR.

19 A cultivar BMX POTÊNCIA RR apresenta as seguintes características: grupo
20 de maturação 6,7; com hábito de crescimento indeterminado; alto índice de
21 ramificação; resistente ao acamamento; resistente ao cancro da haste (*Diaporthe*
22 *phaseolorum* f. sp. *meridionalis*) e a podridão de Phytophthora (*Phytophthora*
23 *sojiae*); moderadamente resistente a mancha olho de rã (*Cercospora sojina*) e
24 suscetível a pústula bacteriana (*Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*). Enquanto
25 a cultivar BRS 113 pertence ao grupo de maturação 7.3 com hábito de crescimento
26 determinado, resistência parcial ao acamamento, resistente ao cancro da haste
27 (*Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*), suscetível a podridão de Phytophthora
28 (*Phytophthora sojiae*) e resistente a mancha olho de rã (*Cercospora sojina*).

29 Cinco sementes de cada cultivar foram semeadas por vaso de 400 mL com
30 substrato composto de areia e solo de cultivo, na proporção 1:1, autoclavado e,
31 após a germinação, foi realizado um desbaste, mantendo em cada vaso as duas
32 plântulas mais vigorosas. As avaliações foram realizadas após 21 dias, com as

1 plantas sendo avaliadas quanto à altura, peso fresco da parte aérea e peso fresco
2 de raiz.

3 2.3 Ensaio em casa-de-vegetação com oito isolados selecionados como
4 promissores ao antagonismo a *Sclerotinia sclerotiorum* e para promoção de
5 crescimento.

6 Oito isolados foram selecionados nos estudos anteriores e avaliados em
7 casa-de-vegetação para determinar se esses isolados promoveriam o crescimento
8 em co-inoculação com *Bradyrhizobium japonicum* e estimulariam enzimas
9 relacionadas a defesa. Os tratamentos foram arranjados em esquema fatorial (9x2),
10 sendo utilizado oito isolados e a testemunha (sem a bactéria), com ou sem
11 inoculação de *B. japonicum* (produto comercial Masterfix®), com 10 repetições.
12 Para o tratamento das sementes com os isolados de *Bacillus* foi utilizada a mesma
13 metodologia descrita no item anterior.

14 Cinco sementes foram semeadas por vaso com capacidade de 400 mL
15 contendo substrato composto de areia e solo de cultivo, na proporção 1:1,
16 autoclavado. Após a disposição das sementes no substrato, foi realizada a
17 inoculação de *B. japonicum*, com o auxílio de uma pipeta, dispensando sobre cada
18 semente 10 µL do produto comercial contendo 10⁸ UFC mL⁻¹. Após a germinação,
19 foi realizado um desbaste, mantendo em cada vaso as duas plântulas mais
20 vigorosas da cultivar BMX POTÊNCIA RR.

21 As avaliações foram realizadas aos 21 e 28 dias após a semeadura. As
22 plantas foram avaliadas quanto à altura, peso fresco da parte aérea e peso fresco
23 de raiz, peso seco da parte aérea e peso seco da raiz e níveis de clorofila, através
24 do medidor portátil SPAD-502 Plus. Para o peso seco da parte aérea e da raiz, as
25 partes foram armazenadas em sacos de papel, colocadas em estufa a 60 ± 5°C e
26 pesadas após 48 horas. Para a avaliação com o medidor de clorofila, as leituras
27 foram realizadas no folíolo central de dois trifólios. Antes das avaliações,
28 aproximadamente um grama de tecido foliar fresco foi reservado para a
29 determinação das enzimas PO, PPO e FAL.

1 2.4 Expressão das enzimas Peroxidase (PO), Polifenoloxidase (PPO) e
2 Fenilalanina amônia-liase (FAL) em folhas de soja

3 As atividades das enzimas PO, PPO e FAL e proteínas totais foram
4 determinadas utilizando cinco extratos (repetição) por tratamento para cada
5 enzima. A análise das enzimas foi realizada utilizando-se as folhas dos trifólios
6 expandidos que foram coletados 21 e 28 dias após a emergência das plantas de
7 soja. Imediatamente as folhas foram acondicionadas em envelopes de papel
8 alumínio e depositadas em nitrogênio líquido e, posteriormente, armazenados em
9 ultrafreezer a -80°C até o preparo dos extratos.

10 Na preparação dos extratos foi utilizado, aproximadamente, 1 g de folhas de
11 soja de cada repetição que foram maceradas em nitrogênio líquido em um
12 almofariz, com auxílio de um pistilo. O pó formado foi novamente macerado em 9
13 mL da solução contendo polivinilpirrolidona a 1%, fosfato de sódio 50 mM, pH
14 6.5 e fluoreto de fenilmetilsulfonila 1 mM (PMSF). Os extratos foram centrifugados
15 a 11000 rpm, a 4 °C, durante 25 min para posterior recuperação dos sobrenadantes
16 que foram depositados em microtubos e armazenados em ultrafreezer a -80°C
17 (Baracat-Pereira et al., 2001).

18 Para a quantificação da atividade das proteínas totais, foi adicionado 20 µL
19 de extrato para 200 µL de solução de Bradford:Água (7:3) para posterior leitura de
20 absorvância em espectrofotômetro a 595 nm após 5 minutos. A curva padrão
21 utilizada para comparação dos dados foi preparada com albumina gerando a
22 equação $y = 2235,1x - 322,03$ ($R^2 = 0,9458$) com os dados expressos em mg mL^{-1}
23 de proteína.

24 A enzima FAL foi quantificada conforme Almeida et al. (2012), com algumas
25 modificações em relação aos volumes. Antes da leitura a 290 nm, foi preparada
26 uma solução 90 µL de tampão Borato 100 mM (pH 8,8) e 90 µL de L-fenilalanina
27 60 mM em tampão borato com posterior adição de 10 µL do extrato. Após 20
28 minutos de incubação a 37°C a reação foi interrompida com adição de 15 µL de
29 HCl 6N (Pascholati et al, 1986; Cakir e Sule, 2009). Os dados foram comparados a
30 curva-padrão para o ácido cinâmico que gerou a equação $y = 163,13x + 10,243$ (R^2
31 $= 0,9661$) com dados expressos em $\mu\text{g}_{\text{ác trans cin}} \text{mg}^{-1} \text{ proteína min}^{-1}$.

32 A atividade de PPO foi determinada utilizando-se 200 µL de pirocatequina a
33 20 mM em tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 6,8, e 20 µL de extrato. A leitura de

1 absorvância foi realizada em espectrofotômetro a 420 nm, em 10 ciclos de 60
2 segundos. Para o cálculo da atividade foram utilizadas a primeira e última leitura
3 com os resultados expressos em unidades de PPO $\text{mg}^{-1}_{\text{tecido}} \text{min}^{-1}$, sendo que uma
4 unidade é definida como um incremento de absorvância de 0,001 por minuto de
5 reação por miligrama de tecido (Duangmal; Apenten, 1999).

6 A atividade da enzima PO foi determinada pela reação de 20 μL do extrato,
7 90 μL de tampão fosfato de sódio 0,01 mM, pH 6,5, 90 μL de peróxido de hidrogênio
8 em 50 mL de tampão fosfato de sódio e 90 μL guaiacol em 25 mL de tampão fosfato
9 de sódio, com leitura em espectrofotômetro a absorvância a 470 nm, em 20 ciclos
10 de 30 s, a 30°C (Hammerschmidt et al., 1982). Os resultados foram expressos em
11 unidades de PO $\text{mg}^{-1}_{\text{tecido}} \text{min}^{-1}$, sendo que uma unidade foi definida como um
12 incremento de absorvância de 0,01 por min de reação por mg de tecido (Halfeld-
13 Vieira et al., 2006).

14 2.5 Identificação molecular e análise filogenética dos oito isolados selecionados

15 Os isolados de *Bacillus* spp. foram reativados em placas contendo BDA, para
16 checagem da pureza e viabilidade. Em sequência, os isolados foram repicados em
17 tubos de ensaio contendo 5 ml de caldo glicose-extrato de levedura, seguindo-se
18 de incubação por 72 h a 28 °C e 150 rpm. A extração do DNA total das culturas foi
19 realizada com o kit Ultra Clean® Microbial DNA Isolation MO Bio, de acordo com
20 especificações do fabricante. O sequenciamento foi realizado utilizando-se o
21 sequenciador 3500 Genomic Analyzer (Applied Biosystems). As sequências
22 obtidas foram comparadas com aquelas de linhagens-tipo utilizando-se o servidor
23 EzTaxon-e. O alinhamento das sequências foi realizado com o programa Clustal W
24 (Thompson et al., 1994). Árvores filogenéticas foram inferidas utilizando o método
25 de neighbor-joining, com o programa MEGA 6 – Molecular Evolutionary Genetics
26 Analysis.

27 2.6 Testes bioquímicos dos oito isolados selecionados.

28 Para avaliar a produção de ácido cianídrico (HCN), o método utilizado foi
29 adaptado de Bakker e Schippers (1987). Os isolados foram multiplicados em
30 tripticaseína de soja-ágar (TSA) por 96 horas a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ e os discos de 5 mm

1 contendo o crescimento dos *Bacillus* foram retirados e inoculados em Placas de
2 Petri previamente preenchidas com TSA modificado (4g de TSA e 15 g de ágar por
3 litro de água destilada). Na tampa destas placas foi colocado um disco de papel de
4 filtro embebido com a solução de ácido pícrico (0,5% v/v) e Na₂CO₃ (2,0% p/v) sem
5 contato com o meio de cultura. As placas foram mantidas a 28°C ± 2°C por 24
6 horas. A produção de HCN foi indicado pela mudança de tonalidade do papel
7 (branco para amarelo ou marrom-alaranjado).

8 Para avaliar a produção de ácido indolacético (AIA) os isolados foram
9 multiplicados em TSA acrescido de 1,021 g L⁻¹ de L-triptofano, precursor do AIA, a
10 28°C ± 2°C por 24 horas. Após este tempo, foi colocada uma membrana de
11 nitrocelulose autoclavada sobre o crescimento de cada isolado e despejado 1mL
12 de Salkowski (1 mL de solução de FeCl₃.6H₂O 0,5 mol L⁻¹ em 50 mL de HClO₄
13 35,0%) por placa. A mudança da coloração da membrana de branco para rosado
14 indica os isolados produtores de AIA.

15 A solubilização de fosfato foi avaliada transferindo um disco de 5 mm dos
16 isolados multiplicados em meio TSA para o meio de cultura NBRIP (Nautiyal, 1999)
17 composto de [10,0 g de glicose, 5,0 g de MgCl₂.6H₂O, 0,25 g de MgSO₄.7H₂O, 0,2
18 g de KCl, 0, (NH₄)₂SO₄, 5,0 g de Ca₃(PO₄) e 15 g de agar por 1000 mL de água
19 destilada] e posterior incubação a 28°C ± 2°C por sete dias. O aparecimento de um
20 halo transparente no meio de cultura, em torno dos discos identificou os isolados
21 solubilizadores de fosfato.

22 Para avaliar a assimilação de nitrogênio, 100 µl de suspensão de
23 crescimento de *Bacillus*, previamente multiplicado em tripticaseína de soja-broth
24 (TSB) a 28°C ± 2°C, foram transferidos em vidros de penicilina preenchidos com
25 NFB autoclavado [5,0 g de ácido málico, 0,5 g de K₂HPO₄, 0,2 g de MgSO₄.7H₂O,
26 0,1 g de NaCl, 0,002 g de CaCl₂.2H₂O, 2 mL de solução de micronutrientes (0,04 g
27 de CuSO₄.5H₂O, 1,20 g de ZnSO₄.7H₂O, 1,40 g de H₃BO₃, 1,00 g de
28 Na₂MoO₄.2H₂O e 1,175 g de MnSO₄.H₂O com o acréscimo de 1000 mL de água
29 destilada), 2 mL de azul de bromotimol (solução de 0,5% em 0,2N KOH); 4 mL de
30 FeEDTA (solução 1,64%), 1mL de solução de vitaminas (10 mg de biotina, 20 mg
31 de piridoxol- HCl dissolvidos em banho-maria e com o complemento com água
32 destilada até completar o volume de 100 mL de solução) e 4,5 g de KOH] com pH
33 ajustado para 6,5 – 6,8 com a adição de NaOH (Dobereiner et al., 1995; Quecine,

1 2010). Estes foram incubados em BOD por sete dias a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e avaliados de
2 acordo com a metodologia proposta por Quecine (2010) com a identificação dos
3 isolados assimiladores de nitrogênio pelo crescimento no terços médio e inferior do
4 meio de cultura, com mudança de coloração de verde para azul.

5 Para avaliar a produção de sideróforos, 100 μl de suspensão de crescimento
6 de *Bacillus* multiplicado em tripticaseína de soja-broth (TSB) a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ foram
7 transferidos para meio líquido KB (20,0 g de proteose peptona n° 3; 1,5 g de
8 K_2HPO_4 ; 1,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 15 mL de glicerol e 1000 mL de água destilada),
9 em Erlenmeyer mantidos em mesa agitadora, na temperatura de $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por sete
10 dias. Logo 1 mL deste crescimento foi centrifugado durante cinco minutos a
11 aproximadamente 9500 rpm (Dobereiner et al., 1995). Após a centrifugação, 100
12 μL do sobrenadante de cada cultura foram adicionados a poços de microplacas
13 juntamente com 100 μl do reagente Cromo Azurol. Os isolados que apresentaram
14 a coloração alaranjada ou amarelada foram considerados produtores de
15 sideroforos.

16 A catalase foi determinada adicionando 500 μl de Peróxido de hidrogênio e
17 100 μl de suspensão de crescimento de *Bacillus*, previamente crescido $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$
18 em tripticaseína de soja- broth (TSB). Havendo a formação de bolhas o isolado é
19 considerado catalase positivo (Romeiro, 2001; Maringoni, 2010).

20 2.7 Análise estatística

21 As análises estatísticas foram realizadas pelo teste de comparações
22 múltiplas de médias de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o programa
23 estatístico SAS® 9.0.

1 3 Resultados

2 3.1 Seleção de isolados antagonicos a *Sclerotinia sclerotiorum*

3 O desempenho dos 138 isolados de *Bacillus* spp. em retardar o crescimento
4 de *S. sclerotiorum* foi variável, com inibições que variaram de 0 à 76,73% (Tabela
5 1.)

6 3.2 Seleção dos isolados com antagonismo a *Sclerotinia sclerotiorum* para 7 promoção de crescimento de plantas de soja.

8 Os três ensaios realizados em casa-de-vegetação para a seleção de
9 isolados com potencial para promoção de crescimento, permitiram a seleção de
10 oito isolados: AP 40, AP 117, AP 51, AP 25, AP 03, QST 713, AP106 e QST 2808.
11 Esses isolados foram selecionados por proporcionarem às plantas inoculadas,
12 superioridade significativa em pelo menos um dos componentes avaliados.

13 No primeiro ensaio, as plantas da cultivar BMX POTÊNCIA RR inoculadas
14 com os isolados AP 40 e AP 117 diferiram da testemunha em relação à altura, com
15 incrementos de 28,5% e 28%, respectivamente. As plantas inoculadas com esses
16 isolados também apresentaram peso fresco de raiz e peso fresco da parte aérea
17 superiores aos da testemunha (Tabela 2). Da mesma forma, as plantas da cultivar
18 BMX POTÊNCIA RR inoculadas com os isolados AP 51 e AP 25 diferiram da
19 testemunha em relação a peso fresco de raiz, com incrementos de 22 e 26%,
20 respectivamente (Tabela 2). Com isso, esses isolados foram considerados
21 promissores e selecionados.

22 No segundo ensaio, os isolados QST 713 e AP 03 foram selecionados por
23 proporcionaram as plantas da cultivar BMX POTÊNCIA RR incrementos
24 significativos em relação a altura (24 e 21%, respectivamente) e ao peso fresco da
25 parte aérea (75% e 73%, respectivamente) (Tabela 3).

26 De maneira geral, nos dois ensaios, as plantas da cultivar BMX POTÊNCIA
27 RR inoculadas com os isolados de *Bacillus*, apresentavam resultados mais
28 expressivos em comparação com a cultivar BRS 113. Desta forma, no terceiro
29 ensaio, apenas a cultivar BMX POTÊNCIA RR foi avaliada. Assim, neste estudo,
30 os isolados QST 2808 e AP 106, por proporcionaram incremento na altura (30 e

1 32%, respectivamente), peso fresco de raiz (21 e 56%, respectivamente) e peso
2 fresco da parte aérea (11 e 12,5%, respectivamente), foram selecionados como
3 promissores (Tabela 4).

4 3.3 Ensaio em casa-de-vegetação com utilização dos oito isolados selecionados
5 pelo teste de antibiose e promoção de crescimento.

6 Na avaliação realizada 21 dias após a semeadura, em relação à altura das
7 plantas, os isolados AP 51, AP 106 e AP 117, apresentaram resultados
8 significativos com incrementos de até 21% em co-inoculação com *B. japonicum* e
9 de até 33% na ausência do inoculante. Todos os isolados, exceto QST 713,
10 promoveram incremento neste componente na ausência do inoculante, com
11 eficiência igual ou superior comparado às utilizações em co-inoculação (Tabela 5).
12 Os isolados AP 51, AP 106 e AP 117 também proporcionaram às plantas
13 incrementos no peso fresco da parte aérea na ausência do inoculante, além dos
14 isolados AP 51 e AP 106 também promoverem incrementos em co-inoculação com
15 *B. japonicum* (Tabela 5). Além disto, todos os isolados, na ausência do inoculante,
16 promoveram incrementos no peso seco da raiz e peso seco da parte aérea. Na
17 avaliação aos 21 dias, não houve resultados significativos na determinação da
18 atividade da enzima polifenoloxidase (PPO) e Fenilalanina amônia-liase (FAL),
19 além dos níveis de clorofila . Apenas o isolado AP 25 proporcionou aumento de
20 102% na atividade da enzima peroxidase (PO) na ausência do inoculante (Tabela
21 6).

22 No entanto, na segunda avaliação, realizada 28 dias após a semeadura, não
23 foram encontrados resultados significativos na atividade da PO, além da PPO.
24 Apenas os isolados AP 03, AP 25 e QST 713 aumentaram a atividade da FAL em
25 70, 190 e 174%, respectivamente, em co-inoculação com *B. japonicum* (Tabela 8).
26 Nesta avaliação todos os isolados, com exceção de AP 03 e QST 713, promoveram
27 incrementos nas alturas das plantas de até 35% na ausência do inoculante. No
28 entanto, não foram constatados incrementos significativos na utilização destes
29 isolados em co-inoculação com *B. japonicum*. Apenas o isolado AP 117 promoveu
30 incremento no peso fresco de raiz em co-inoculação, não havendo diferenças
31 significativas entre os resultados de peso seco de raiz, parte aérea fresca e seca.

1 Os resultados indicam que os isolados AP 51, AP 106 e AP 117, no geral,
2 foram os que proporcionaram maior número de diferenças significativas entre as
3 variáveis analisadas.

4 3.4 Identificação molecular e análise filogenética

5 De acordo com os resultados do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA
6 (Figura 1) foi possível determinar que o isolado AP 03 tem 99,71 % de similaridade
7 com *Bacillus velezensis* (1.498 bp); o isolado AP 25 tem 99,93 % de similaridade
8 com *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* (1.494 bp); o isolado AP 40 tem 99,78 %
9 de similaridade com *Bacillus velezensis* (1.492 pb); o isolado AP 51 tem 99,71 %
10 de similaridade com *Bacillus velezensis* (1.490 bp); o isolado AP 106 apresenta
11 99,93 % de similaridade com *Bacillus siamensis* (1.486 pb); e o isolado AP 117
12 apresenta 99,72 % de similaridade com *Bacillus siamensis* (1.504 pb).

13 Com base na análise filogenética os isolados foram agrupados em quatro
14 diferentes clados e se agrupam basicamente em três diferentes espécies do gênero
15 *Bacillus*.

16 3.5 Testes bioquímicos

17 A relação de resultados dos testes bioquímicos estão sintetizadas na Tabela
18 9. Desta forma, todos isolados foram considerados positivos para o teste de
19 Catalase. Para ácido cianídrico (HCN) e ácido indolacético (AIA) todos os isolados
20 foram considerados negativos. Para solubilização de fosfato apenas o isolado QST
21 713 foi positivo. Para assimilação de nitrogênio, todos os isolados, exceto AP 40,
22 QST 713 e QST 2808, foram positivos. Na produção de sideróforos, os isolados AP
23 03, AP 106, AP 117 e QST 713 foram considerados positivos.

1 4 Discussão

2 Com base nos resultados referentes a promoção de crescimento, todos os
3 isolados de *Bacillus*, para uma ou mais variável analisada, apresentaram resultados
4 superiores quando comparados á testemunha (Tabelas 5 e 7). Essas informações
5 demonstram que a seleção de isolados de *Bacillus* spp. realizadas *in vivo* foi
6 eficiente. Os isolados AP 03, AP 51, AP 106 e AP 117 tiveram resposta positiva à
7 assimilação de nitrogênio (Tabela 9) e isso pode explicar o porque esses isolados
8 apresentaram resultados iguais ou superiores em comparação às utilizações em
9 co-inoculação com *B. japonicum* para altura de plantas (Tabela 5). Além disso, os
10 isolado AP 51, AP 106 para peso fresco da parte aérea (Tabela 5) e AP 117 para
11 peso fresco de raiz (Tabela 7), apresentaram incrementos significativos em co-
12 inoculação com *B. japonicum* quando comparados com testemunha com
13 inoculante. Apesar das plantas terem sido mantidas por um curto período, é
14 esperado que esse maior aporte inicial, produza resultados de acordo com o estudo
15 realizado por Araújo e Hungria (1999) em condições de campo, onde a co-
16 inoculação de *Bradyrhizobium* spp. e isolados de *Bacillus*, inclusive o AP 03,
17 aumentaram o rendimento da cultura da soja em 27%, além de aumentar a
18 nodulação e a ocupação dos nódulos por toda a raiz. Este mesmo isolado ao ser
19 utilizado em cana-de-açúcar (Cardoso e Araújo, 2011), além de também promover
20 crescimento, retardou a reprodução de *Meloidogyne* sp. e *Heterodera glycines*
21 (Araújo et al., 2002), importantes nematoides para a cultura da soja (Mitchum,
22 2016).

23 Os isolados selecionados AP 51, AP 106, QST 2808, AP 117, AP 03, AP 25,
24 QST 713 e AP 40 também proporcionaram significativa inibição de crescimento de
25 *S. sclerotiorum*, atingindo 35,43%, 32,70%, 36,28%, 55,97%, 42,89% 42,75%,
26 41,10% e 38,20% de inibição (Tabela 1), respectivamente. Apesar dos resultados
27 de antagonismo das cepas de *Bacillus* spp. utilizadas por Rahman et al. (2016) e
28 Sun et al. (2017) atingirem até 85,14% e 82,5% respectivamente, os resultados
29 obtidos aqui são significativos e evidenciam o potencial de bactérias desse gênero
30 no controle de *Sclerotinia*.

31 Apesar da capacidade de alguns microrganismos estimularem o crescimento
32 vegetal estar relacionada, de acordo com Machado et al. (2016), a duas vias de

1 ação: direta, através de produção de substâncias que serão aproveitadas pelas
2 plantas como AIA (Cendales et al., 2017) e solubilização de fosfato (Mishra et al.,
3 2016) ou indireta, através do efeito antagônico a fitopatógenos (Dalal e Kulkarni,
4 2013), os resultados dos isolados para os testes bioquímicos de produção de AIA
5 e solubilização de fosfato (Tabela 9) não permitem essa interpretação. No entanto,
6 de acordo com García-Lopez e Delgado (2016), o isolado QST 713 aumentou em
7 40% a absorção de fósforo por plantas de pepino, não só pela capacidade de
8 solubilizar diferentes fontes deste nutriente, mas também por produzir compostos
9 orgânicos capazes de competir com os sítios adsorção de P, tornando-o mais
10 disponível a planta, bem como por exercer efeito acidificante na rizosfera e
11 favorecer a absorção de fósforo. Assim, devido aos isolados AP 03, AP 106 e AP
12 117 também serem eficientes na produção de sideróforos (Tabela 9) é possível
13 relacioná-los a esse mecanismo. Bem como pode ser relacionado aos estudos de
14 Tahir et al. (2017) onde a promoção de crescimento foi intermediada pelos voláteis
15 do isolado de *Bacillus subtilis* (SYST2) por aumentarem a taxa de fotossíntese e
16 regularem a produção de fitohormônios, além de alterarem a expressão de genes
17 relacionados a produção de auxinas, giberilinas, expansina, citocinina e etileno.
18 Espécies de *Bacillus* são relatadas, não só pela produção de moléculas
19 sinalizadoras à expressão de genes que podem ser relacionados a promoção de
20 crescimento, mas também pela produção direta de fito hormônios como auxina
21 (Talboys et al., 2014), Citocinina (Park et al., 2017) e giberilinas (Shahzad et al.,
22 2016) que devem ser investigados nestes isolados em estudos futuros.

23 A análise da região 16S dos isolados utilizados neste estudo confirma que
24 todos isolados testados pertencem ao gênero *Bacillus* (Figura 1) e que, o
25 sequenciamento completo do genoma de bactérias desse gênero, como o realizado
26 por Chen et al. (2007), pode revelar diversos agrupamentos gênicos responsáveis
27 pela produção de antibióticos, enzimas, sideróforos entre outras substâncias. No
28 entanto, a expressão gênica que comanda a produção destas substâncias pode
29 depender de fatores bióticos ou abióticos específicos (Beauregard et al., 2012;
30 Chen et al., 2013; Chubukov e Sauer, 2014), a exemplo de isolados de *Bacillus* spp.
31 relatados como produtores de diversos lipopeptídeos (Ongena e Jaques, 2007),
32 que nem sempre poderão ser detectados pois, apesar da biologia molecular poder
33 apontar os agrupamentos genéticos e as substâncias resultantes destes, as

1 condições do ambiente poderão exercer efeito predominante na produção (Davis e
2 Ryan, 2012).

3 Estudos apontam que a atividade das enzimas PO, PPO e FAL aumentam
4 consideravelmente nos primeiros dias após o contato com *Bacillus* spp., e podem
5 diminuir com o decorrer do tempo (Chen et al., 2010; Li et al., 2015). Essas
6 informações podem explicar os resultados deste estudo, pois apenas as plantas
7 inoculadas com o isolado AP 25 apresentaram maior atividade da enzima PO na
8 primeira avaliação, não diferindo da testemunha na segunda avaliação, o que
9 sugere, portanto, a necessidade de avaliações mais próximas à inoculação ou
10 mesmo a necessidade de novas inoculações para que a atividade seja mantida
11 (García-Gutiérrez et al., 2013; Kumar et al., 2016). Por outro lado, pelos isolados
12 AP 03, QST 713 e AP 25 aumentarem a atividade da FAL em 70, 190 e 174%
13 respectivamente, em co-inoculação com *B. japonicum* apenas na segunda
14 avaliação, a expressão pode estar relacionada ao estabelecimento das bactérias
15 nas raízes.

16 Neste estudo, para inoculação das sementes, apenas as células suspensas
17 dos isolados selecionados foram utilizadas. Diversos trabalhos relacionam o tipo de
18 formulação (Phae e Sodha, 1991) e também a concentração de células (Mantecón,
19 2008) com o sucesso obtido no controle de doenças e também com a capacidade
20 do microrganismos colonizarem a rizosfera, uma vez que os metabólitos,
21 prontamente disponíveis em algumas formulações, podem dar vantagem ao
22 bioagente na competição com outros microrganismos por esse nicho (Lahlali et al.,
23 2011; Stubbendieck e Straight, 2016). Desta forma, novos estudos podem ser
24 direcionados para observar esse possível efeito, bem como para investigar quais
25 as substâncias são produzidas por esses isolados, uma vez que, devida a grande
26 diversidade, são pouco compreendidas as suas rotas de produção, funcionalidades
27 (Davies e Ryan, 2012) e novas descobertas são constantemente relatadas (Kurata
28 et al., 2017).

29 Os resultados quantitativos obtidos da promoção de crescimento podem ser
30 distintos, pois na interação entre a RPCP e planta, a variedade vegetal pode
31 influenciar a colonização das raízes pela produção de substâncias que estimulam
32 determinado microrganismo (Yaryura et al., 2008), bem como na produção de
33 substâncias produzidas pelas RPCP. Esta complexa relação, apesar dos avanços

1 tecnológicos, ainda é pouco compreendida (Hardoim et al., 2015) e isso explica a
2 falta de produtos comerciais confiáveis para esse fim.

3 Os candidatos a agentes de controle biológico e promotores de crescimento
4 precisam, segundo Santoyo et al. (2012), reunir características como: crescimento
5 rápido e colonização de diferentes ambiente, capacidade de competição, utilização
6 de diferentes fontes de nutrientes, sobrevivência sob estresse, síntese de
7 metabolitos com alta atividade antimicrobiana e, por fim, capacidade de promover
8 crescimento em plantas. Desta forma, os isolados aqui utilizados, possuem
9 potencial para serem explorados neste sentido, a medida que os mecanismos e
10 substâncias envolvidos nos resultados apresentados sejam elucidados.

11

12 **Agradecimentos**

13 Dalton V. Dorighello e Wagner Bettiol agradecem a Coordenação de
14 Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES e ao Conselho Nacional
15 de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pelas bolsas de estudo. Os
16 autores agradecem Fábio Brandi, da Bayer Crop Science pela doação dos produtos
17 à base de *B. subtilis* e *B. pumilus*.

18

1 Referências

- 2 Araújo, F.F., Hungria, M., 1999. Nodulação e rendimento de soja co-infectada com
3 *Bacillus subtilis* e *Bradyrhizobium japonicum* – *Bradyrhizobium elkanii*. Pesq.
4 Agropec. Bras. 34, 1633-1643.
- 5 Araújo, F.F., Silva, J.F.V., Araújo, A.S.F., 2002. Influência de *Bacillus subtilis* na
6 eclosão, orientação e infecção de *Heterodera glycines* em soja. Cienc. Rural.
7 32, 197-202.
- 8 Bai, Y., Zhou, X., Smith, D. L., 2003. Aumento do crescimento de plantas de soja
9 resultante da co-inoculação de cepas de *Bacillus* com *Bradyrhizobium*
10 *japonicum*. Crop Sci. 43, 1774-1781.
- 11 Bakker, A.W.; Schippers, B., 1987. Microbial cyanide production in the rhizosphere
12 in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas* spp. mediated plant
13 growth stimulation. Soil Biol. Biochem. 19, 451-457.
- 14 Baracat-Pereira, M.C., Oliveira, M.G.A., Barros, E.G., Moreira, M.A., Santoro,
15 M.M., 2001. Biochemical properties of soybean leaf lipoxygenases: presence of
16 soluble and membrane-bound forms. Plant Physiol. Biochem. 39, 91-98.
- 17 Beauregard, P.B., Chai, Y., Vlamakis, H., Losick, R., Kolter, R., 2012. *Bacillus*
18 *subtilis* biofilm induction by plant polysaccharides. PNAS. 10, 1621-1630.
- 19 Cakir, O., Sule, A., 2009. Defensive and secondary metabolism in *Astragalus*
20 *chrysochlorus* cell cultures, in response to yeast extract stressor. J. Environ.
21 Biol. 30, 51-55.
- 22 Calvo, P., Ormeno, O.E., Martínez, R.E., Zuniga, D., 2010. Characterization of
23 *Bacillus* isolates of potato rhizosphere from Andean soils of Peru and their
24 potential PGPR characteristics. Braz. J. Microbiol. 41, 899-906.
- 25 Cardoso, R.B., Araújo, F.F., 2011. Multiplicação de *Bacillus subtilis* em vinhaça e
26 viabilidade no controle da meloidoginose em cana de açúcar. Rev. Bras. Eng.
27 Agric. Ambient. 15, 1283-1288.
- 28 Cendale, T.C., Gonzáles, C.A.R., Cuásquer, C.P.V., Alzate, O.A.T., Rodríguez,
29 A.H. 2017. Efecto de *Bacillus* sobre la germinación y crecimiento de plântulas
30 de tomate (*Solanum lycopersicum* L). Acta Biolo. Colomb. 22, 37-44.
- 31 Chen, et al., 2007. Comparative analysis of the complete genome sequence of the
32 plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. Nat.
33 Biotechnol. 25, 1007-1014.
- 34 Chen, F., Wang, M., Zheng, Y., Luo, J., Yang, X., Wang, X., 2010. Quantitative
35 changes of plant defense enzymes and phytohormone in biocontrol of
36 cucumber *Fusarium* wilt by *Bacillus subtilis* B579. World J. Microbiol.
37 Biotechnol. 26, 675-684.

- 1 Chen, Y., Yan F., Chai, Y., Liu, H., Kolter, R., Losick, R., Guo, J., 2013. Biocontrol
2 of of tomato wilt disease by *Bacillus subtilis* isolates from natural environments
3 depends on conserved genes mediating biofilm formation. J. Appl. Environ.
4 Microbiol. 15, 848-864.
- 5 Chubukov, V., Sauer, U., 2014. Environmental dependence of stationary-phase
6 metabolism in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. J. Appl. Environ. Microbiol.
7 80, 2901-2909.
- 8 Claus, D., Berkeley C.W., 1986. The genus *Bacillus*. P. H. A. Sneath (ed) Bergey's
9 manual of systematic bacteriology. Williams and Wilkins. Baltimore. v.2, 1105–
10 1139.
- 11 Compant, S., Clément, C., Sessitsch, A., 2010. Plant growth-promoting bacteria in
12 the rhizo and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms
13 involved and prospects for utilization. Soil Biol. Biochem. 42, 669- 678.
- 14 Dalal, J.; Kulkarni, N., 2013. Antagonistic and plant growth promoting potentials of
15 indigenous endophytic bacteria of soybean (*Glycine max* (L) Merril). Curr. Res.
16 Microbiol. Biotechnol. 1, 62-69.
- 17 Davies, J., Ryan, K.S., 2012. Introduction the parvome: bioactive compounds in
18 the microbial world. ACS Chem. Biol. 7, 252-259.
- 19 Dobereiner, J., Baldani, V.L.D., Baldini, J.I., 1995. Como isolar e identificar
20 bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Brasília: EMBRAPA – SP:
21 Itaguaí, RJ: EMBRAPA – CNPAB, 1995, 60 p.
- 22 Duangmal, K.; Apenten, R.K.O., 1999. A comparative study for
23 polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum*
24 *tuberosum* var. Romano). Food Chem. 64, 351-359.
- 25 García-Gutiérrez, L., Zerouh, H., Romero, D., Cubero, J., Vicente, A., Pérez-
26 García, A., 2013. The antagonistic strain *Bacillus subtilis* UMAF6639 also
27 confers protection to melon plants against cucurbit powdery mildew by activation
28 of jasmonate and salicylic acid dependent defence responses. Microb.
29 Biotechnol. 6, 264-274.
- 30 García-Lopez, A.M., Delgado, A., 2016. Effect of *Bacillus subtilis* on phosphorus
31 uptake by cucumber as affected by iron oxides and the solubility of the
32 phosphorus source. Agric. Food Sci. 25, 216-224.
- 33 Glick, B.R., 2012. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and
34 Applications. New York, Hindawi Publishing Corporation, Scientifica. 33p.
- 35 Gutierrez-Manero, F.J., Probanza, A., Ramos, B., Colon Flores, J.J., Lucas
36 Garcia, J.A., 2003. Ecology, Diversity and screening strategies of plant growth
37 promoting Rhizobacteria (PGPR), J. Plant. Nutr. 26, 1101-1115.
- 38 Halfeld-Vieira, B.A., Vieira Júnior, J.R., Romeiro, R.S., Silva, H.S.A., Baracat-
39 Pereira, M.C., 2006. Induction of systemic resistance in tomato by the

- 1 autochthonous phylloplane resident *Bacillus cereus*. Pesq. Agropec. Bras. 41,
2 1247-1252.
- 3 Hammerschmidt, R.; Nuckles, E.; Kuc, J., 1982. Association of enhanced
4 peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to
5 *Colletotrichum lagenarium*. Physiol. Plant Pathol. 20, 73-80.
- 6 Hardoim, P.R., Van Overbeek, L.S., Berg, G., Pirttilä, A.M., Compant, S.,
7 Campisano, A., Döring, M., Sessitsch, A., 2015. The hidden world within plants:
8 ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial
9 endophytes. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 79, 203-320.
- 10 Hu, X., Roberts, D., Xie, L., Maul, J.E., Yu, C., Li, Y., Jiang, M., Liao, X., Che, Z.,
11 Liao, X., 2016. Formulation of *Bacillus subtilis* BY-2 suppress *Sclerotinia*
12 *sclerotiorum* on oilseed rape in the field. Biol. Control. 70, 54-64.
- 13 Huang, X. F., Chaparro, J. M., Reardon, K. F., Zhang, R.; Shen, Q., Vivanco, J.
14 M., 2014. Rhizosphere interactions: root exudates, microbes, and microbial
15 communities. Botany. 92, 267-275.
- 16 Jain, S., Kumari, S., Vaishnav, A., Choudhary, D.K., Sharma, K.P., 2016. Isolation
17 and characterization of plant growth promoting bacteria from soybean
18 rhizosphere and their effect on soybean plant growth promotion. Int. J. Advanc.
19 Sci. Tec. Res. 5, 397-410.
- 20 Jetiyanon, K., 2007. Defensive-related enzyme response in plants treated with a
21 mixture of *Bacillus* strains (IN937a and IN937b) against different pathogens.
22 Biol. Control. 42, 178-185.
- 23 Kanchiswamy, C., Malnoy, M., Maffei, M., 2015. Bioprospecting bacterial and
24 fungal volatiles for sustainable agriculture. Trends Plant Sci. 20, 206–211.
- 25 Kavamura, V.N., Santos, S.N., Silva, J.L., Parma, M.M., Avila, L.A., 2013.
26 Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under
27 drought. Microbiol. Res. 168, 183–191.
- 28 Kefela, T., Gachomo, E.W., Kotchoni, S.O., 2015. *Paenibacillus polymyxa*,
29 *Bacillus licheniformis* and *Bradyrhizobium japonicum* IRAT FA3 promote faster
30 seed germination rate, growth and disease resistance under pathogenic
31 pressure. J. Plant Biochem. Physiol. 3, 2-5.
- 32 Kumar, S., Chauhan, P.S., Agrawal, L., Raj, R., Srivastava, A., Gupta, S.,
33 Shashank, K.M., Yadav, S., Singh, P., Shri, K.R., Nautiyal, C.S., 2016.
34 *Paenibacillus lentimorbus* inoculation enhances tobacco growth and
35 extenuates the virulence of cucumber mosaic virus. Plos One. 6. e0149980.
- 36 Kurata, A., Yamaura, Y., Tanaka, T., Kato, C., Nakasone, K., Kishimoto, N., 2017.
37 Antifungal peptidic compound from the deep-sea bacterium *Aneurinibacillus* sp.
38 YR247. World J. Microbiol. Biotechnol. 33, 1-8.

- 1 Lahlali, R., Peng, G., McGregor, L., Gossen, B.D., Hwang, S.F., McDonald, M.,
2 2011 Mechanisms of the biofungicide Serenade (*Bacillus subtilis* QST713) in
3 suppressing clubroot. *Biocontrol Sci. Technol.* 21, 1351-1362.
- 4 Li, H., Wang, X., Han, M., Zhao, Z., Wang, M., Tang, Q., Liu, C., Kemp, B., Gu, Y.,
5 Shuang, J., Xue, Y., 2012. Endophytic *Bacillus subtilis* ZZ120 and its potential
6 application in control of replant diseases. *Afric. J. Biotech.* 11, 231-242.
- 7 Li, Yunlong., Gu, Yilin., Li., J., Xu, M., Wei, Q., Wang, Y., 2015. Biocontrol agent
8 *Bacillus amyloliquefaciens* LJ02 induces systemic resistance against cucurbits
9 powdery mildew. *Front Microbiol.* 6, 833.
- 10 Lugtenberg, B., Kamilova, F., 2009. Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annu.*
11 *Rev. Microbiol.* 63, 541-556.
- 12 Machado, P.C., Andrade, P.H.M., Quecine, M.C., Lacava, P.T., 2016. Potencial de
13 promoção de crescimento vegetal de bactérias endofíticas associadas a
14 *Jatropha curcas* L. *Cienc. Tecnol.* 8, 1-14.
- 15 Mantecón, J. D., 2008. Efficacy of chemical and biological strategies for controlling
16 the soybean brown spot (*Septoria glycines*). *Cienc. Investig. Agr.* 38, 211-214.
- 17 Maringoni, A.C. 2010. Técnicas em Fitobacteriologia. FEPAF, Botucatu - SP, 40 p.
- 18 Mena-Violante, H. G.; Olalde-Portugal, V., 2007. Alteration of tomato fruit quality
19 by root inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): *Bacillus*
20 *subtilis* BEB-13bs. *Sci. Hortic.* 113, 103-106.
- 21 Meng, X., Yu, J., Yu, M., Yin, X., Liu, Y., 2015. Dry flowable formulations of
22 antagonistic *Bacillus subtilis* strain T429 by spray drying to control rice blast
23 disease. *Biol. Control.* 85, 46-51.
- 24 Mishra, S., Mahato, S.K., Basi, S., Basi-Chipalu, S., 2016. Comparative study on
25 plant growth promotion by endophytic *Pseudomonas* spp. and *Bacillus* spp. of
26 *Solanum Lycopersicum*. *Int. J. Appl. Sci. Biotechnol.* 4, 464-469.
- 27 Mitchum, M.G., 2016. Soybean resistance to the soybean cyst nematode
28 *Heterodera glycines*: an update. *Phytopathol.* 106, 1444-1450.
- 29 Nautiyal, C.S., 1999. An efficient microbiological growth medium for screening
30 phosphate solubilizing microorganisms. *Microbiol. Lett.* 170, 265-270.
- 31 Ongena, M., Jacques, P., 2007. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant
32 disease control. *Trends Microbiol.* 16, 115-125.
- 33 Park, Y.G., Mun, B.G., Kang, S.M., Hussain, A., Shahzad, R., 2017 *Bacillus*
34 *aryabhatai* SRB02 tolerates oxidative and nitrosative stress and promotes the
35 growth of soybean by modulating the production of phytohormones. *Plos One.*
36 12. e0173203.

- 1 Pascholati, S. F., Nicholson, R. L., Butler, L. G., 1986. Phenylalanine ammonia-
2 lyase activity and anthocyanin accumulation in wounded maize mesocotyls. J.
3 Plant Phytopathol. 115, 165-172.
- 4 Phae, C., Sodha, M., 1991. Investigation of optimal conditions for separation of
5 iturin an antifungal peptide produced by *Bacillus subtilis*. J. Ferment. Bioeng.
6 71, 118-121.
- 7 Pinglan, L.; QingMao, S.; Yuzhu, H., Yuxuan, Q., 2015. Complete genome
8 sequence of *Bacillus amyloliquefaciens* L-H15, a plant growth promotion
9 rhizobacteria isolated from cucumber seedling substrate. J. Biotechnol. 200, 59-
10 60.
- 11 Quecine, M.C., 2010. Aspectos biotecnológicos da interação entre bactérias e
12 cana-de-açúcar (*Saccharum* sp). Tese (Doutorado), Programa de Pós
13 graduação em Genética e Melhoramento de Plantas. Escola Superior de
14 Agricultura "Luiz de Queiroz". Piracicaba.
- 15 Rahman, M.D., Hossain, D.M., Suzuki, K., Shiiya, A., Suzuki, K., Dey, T.P.,
16 Nonaka, M. Harada., 2016. Suppressive effects of *Bacillus* spp. on mycelia,
17 apothecia and sclerotia formation of *Sclerotinia sclerotiorum* and potential as
18 biological control of white mold on mustard. Australas. Plant Pathol. 45, 103-
19 117.
- 20 Rodríguez, M.A., Rothen, C., Lo, T.E., Cabrera, G.M., Godeas, A.M. Suppressive
21 soil against *Sclerotinia sclerotiorum* as a source of potential biocontrol agents:
22 selection and evaluation of *Clonostachys rosea* BAF1646. Biocontrol Sci.
23 Technol. 25, 1388-1409.
- 24 Romeiro, R.S., 2001. Métodos em bacteriologia de plantas. Viçosa: UFV, 278.
- 25 Saharan, B.S., Nehra, V., 2011. Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A critical
26 review. Life Sci. Med. Res. 21, 1-30.
- 27 Santoyo, G., Orozco-Mosqueda, M.D., Govindappa, M., 2012. Mechanisms of
28 biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of
29 *Bacillus* and *Pseudomonas*: a review. Biocontrol Sci Technol. 22, 855-872.
- 30 Shahzad, R., Waqas, M., Khan, A.L., Asaf, S., Khan, M.A., Kang, S.M., Yun, B.W.,
31 Lee, I.J., 2016. Seed-borne endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* RWL-1
32 produces gibberellins and regulates endogenous phytohormones of *Oryza*
33 *sativa*. Plant Physiol. Biochem. 106, 236-243.
- 34 Silva, J.R.C., Souza, R.M., Zacarone, A.B., Silva, L.H.C.P., Castro, M.A.S., 2008.
35 Bactérias endofíticas no controle e inibição in vitro de *Pseudomonas syringae*
36 pv. *tomato*, agente da pinta bacteriana do tomateiro. Cienc. Agrotec. 32, 1062-
37 1072.
- 38 Stajković, O., Delić, D., Jošić, D., Kuzmanović, Đ., Rasulić, N., Knežević-Vukčević,
39 J., 2011. Improvement of common bean growth by co-inoculation with

- 1 *Rhizobium* and plant growth-promoting bacteria. Rom. Biotechnol. Lett. 16,
2 5919-5926.
- 3 Stubbendieck, R.M., Straight, P.D., 2016. Multifaceted interfaces of bacterial
4 competition. J. Bacteriol. 198, 2145-2155.
- 5 Sun, G., Yao, T., Feng, C., Chen, L., Li, J., Wang, L., 2017. Identification and
6 biocontrol potential of antagonistic bacteria strain against *Sclerotinia*
7 *sclerotiorum* and their growth-promoting effects on *Brassica napus*. Biol.
8 Control. 104, 35-43.
- 9 Tahir, H. A. S., Gu, Q., Wu, H., Raza, W., Hanif, A., Wu, L., Gao, X., 2017. Plant
10 growth promotion by volatile organic compounds produced by *Bacillus subtilis*
11 SYST2. Front. Microbiol. 8, 171.
- 12 Talboys, P. J., Owen, D. W., Healey, J. R., Withers, P. J. and Jones, D. L., 2014.
13 Auxin secretion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 both stimulates root
14 exudation and limits phosphorus uptake in *Triticum aestivium*. BMC Plant Biol.
15 14, 51.
- 16 Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar S., 2011.
17 MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood,
18 evolutionary distance, and maximum parsimony methods. molecular. Biol. Evol.
19 28, 2731-2739.
- 20 Wrather, J.A., Anderson, T.R., Arsyad, D.M., Tan, Y., Ploper, L.D., Porta-Puglia,
21 A., 2001. Soybean disease loss estimates for the top ten soybean-producing
22 countries in 1998. Can. J. Plant Pathol. 23, 115–121.
- 23 Yaryura, P., Leon, M., Correa, O., Kerber, N., Pucheu, N., Garcia, A., 2008.
24 Assessment of the role of chemotaxis and biofilm formation as requirements for
25 colonization of roots and seeds of soybean plants by *Bacillus amyloliquefaciens*
26 BNM339. Curr. Microbiol. 56, 625-632
- 27 Zhang, F., Ge, H., Zhang, Fan., Guo, N., Wang, Y., Chen, L., Ji, X., Li, C., 2016.
28 Biocontrol potential of *Trichoderma harzianum* isolate T-aloe against *Sclerotinia*
29 *sclerotiorum* in soybean. Plant Physiol. Biochem. 100, 64-74.
- 30

1 Tabela 1: Porcentagens de inibição do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* em
 2 confronto com os isolados de *Bacillus* spp.

ID	Inibição (%)										
	%	ID	%	ID	%	ID	%	ID	%	ID	%
AP 91	76,73	AP 74	40,00	AP 14	34,96	AP 48	30,23	AP 164	25,55	AP 63	17,95
AP 104	67,68	AP 105	39,76	AP 49	34,62	AP 281	29,90	AP 503	25,55	AP 95	16,50
AP 100	62,62	AP 186	39,37	AP 262	34,40	AP 93a	29,86	AP 150	25,29	AP 204	15,95
AP 135	61,72	AP 115	39,25	AP 73	34,23	AP 162	29,81	AP 114a	25,15	AP 322	15,94
AP X	58,57	AP 111	39,20	AP 44	34,18	AP 42	29,65	AP 60	24,85	AP 23	15,69
AP 100a	57,09	AP 40	38,20	AP 580	34,15	AP 93	29,56	AP 22	24,68	AP 212	15,01
AP 504	56,67	AP 192	38,15	AP 312	34,15	AP 340	29,29	AP 326	24,18	AP 519	14,69
AP 117	55,97	AP 110	37,94	AP 97	33,94	AP 88	29,08	AP 131	23,72	AP 324	14,31
AP 140	53,63	AP 59	37,65	AP 137	33,93	AP 193	28,85	AP 210	23,20	AP 254	12,75
AP 121	52,58	AP 89	37,40	AP 275	33,89	AP 12a	28,79	AP 1	22,85	AP 343	11,61
AP 82	51,75	AP 287	37,04	AP 43	33,75	AP 216	28,75	AP 209	22,45	AP 346	8,05
AP 109	51,16	AP 108	37,01	AP 349	33,65	AP 268	28,69	AP 297	22,13	AP 27	6,25
AP 183	50,18	AP 6	36,95	AP 61	33,63	AP 239	28,03	AP 227	21,95	AP 92	2,46
AP 86	49,70	AP 54	36,66	AP 90	33,38	AP 167	27,55	AP 329	21,50	AP 214	0,00
AP 507	47,86	AP 124	36,60	AP 106	32,70	AP 420	27,43	AP 511	21,00	AP 21	0,00
AP 14a	47,43	AP 46	36,38	AP 80	32,29	AP 219	27,25	AP 31	21,00	AP 339	0,00
AP 85	43,33	QST 2808	36,28	AP 119	31,84	AP 345	27,19	AP 114	21,00	AP 251	0,00
AP 03	42,89	AP 276	36,06	AP 56	31,35	AP 120	27,13	AP 15	20,00	AP 70	0,00
AP 25	42,75	AP 181	35,65	AP 38	31,33	AP 165	27,01	AP 8	19,40	AP 01	0,00
AP 505	42,13	AP 29	35,46	AP 12	31,15	AP 64	26,89	AP 338	18,98	AP 20	0,00
AP 365	41,36	AP 51	35,43	AP 43a	31,04	AP 173	26,82	AP 198	18,88	AP 123	0,00
AP 323	41,16	AP 11	35,26	AP 508	30,90	AP 284	26,67	AP 101	18,06	AP 94	0,00
QST 713	41,10	AP 143	35,18	AP 6a	30,23	AP 77	25,63	AP 41	18,04	AP 213	0,00

3

Legenda (% inibição)	0-20	20-40	40-60	>60
----------------------	------	-------	-------	-----

4

5

1 Tabela 3: Efeito dos isolados de *Bacillus* spp. na altura e pesos das massas frescas de raiz e parte
 2 aérea de plantas de soja das cultivares BMX POTÊNCIA RR e BRS 113 no primeiro ensaio.

Isolados	Altura (cm)		Raiz (g)		Peso fresco (g)	
	BMX Potência	BRS 113	BMX Potência	BRS 113	BMX Potência	BRS 113
AP 51	16,75 abA	14,37 aB	5,87 abA	5,03 abcdB	8,24 abcdA	6,88 aB
AP 42	14,81 abcA	14,87 aA	5,38 abcdA	4,44 cdB	7,85 abcdeA	7,5 aA
AP 91	12,81 cB	15,81 aA	4,05 eA	4,3 dA	7,03 eA	7,57 aA
AP 214	15,93 abcA	15 aA	4,7 deA	4,97 abcdA	7,62 abcdeA	7,42 aA
AP 25	17,1 abA	14,75 aB	6,05 abA	4,65 abcdA	8,37 abcA	7,28 aB
AP 165	15,94 abcA	15,37 aA	4,82 cdeA	4,92 abcdA	7,85 abcdeA	7,33 aA
AP 204	12,75 cA	14,62 aA	4,69 deB	5,29 abcA	7,23 deA	7,27 aA
AP 213	14,1 abcA	16 aA	4,69 deA	4,77 abcdA	7,63 abcdeA	7,48 aA
AP 251	15,75 abcA	15 aA	5,6 abcdA	4,26 dB	7,51 bcdeA	7,17 aA
AP 90	15 abcA	16,18 aA	4,84 cdeA	4,97 abcdA	7,13 eA	7,5 aA
AP 92	13,87 abcA	15,75 aA	5,13 bcdA	4,7 abcdA	7,4 bcdeA	7,41 aA
AP 114	15,56 abcA	15 aA	5,6 abcdA	4,5 bcdB	7,39 bcdeA	7,34 aA
AP 104	14,12 abcA	16 aA	5,28 abcdA	5,42 abA	6,93 eA	7,38 aA
AP 338	15,75 abcA	15,43 aA	4,66 deA	4,15 dA	7,82 abcdeA	7,65 aA
AP 340	15,12 abcA	16,31 aA	4,87 cdeA	4,44 cdA	7,47 bcdeA	7,38 aA
AP 21	14,81 abcA	14,5 aA	5,7 abcA	5,6 aA	7,37 cdeA	7,02 aA
AP 40	17,5 aA	15,3 aB	5,97 abA	4,72 abcdB	8,4 abA	6,77 aB
AP 117	17,43 aA	15,18 aB	6,12 aA	4,66 abcdB	8,55 aA	6,8 aB
AP 210	13,87 abcA	15,17 aA	5,52 abcdA	4,74 abcdB	7,66 abcdeA	6,8 aB
Testemunha	13,62 bcA	14,87 aA	4,81 cdeA	4,22 dB	7,31 deA	6,9 aA
CV(%)	9,47		7,59		5,31	

3 Médias seguidas por letras minúsculas iguais nas colunas e maiúsculas iguais na linha, não
 4 diferem entre si pelo teste de Tukey (0,05 probabilidade).
 5

1 Tabela 4: Efeito dos isolados de *Bacillus* spp. na altura e pesos das massas frescas de raiz e parte
 2 aérea de plantas de soja das cultivares BMX POTÊNCIA RR e BRS 113 no segundo ensaio.

Isolados	Altura (cm)		Raiz (g)		Peso fresco (g)	
	BMX Potência	BRS 113	BMX Potência	BRS 113	BMX Potência	BRS 113
QST 713	20,56 aA	12,31 aB	6,8 aA	3,77 abcB	8,88 aA	5,3 abB
AP 219	17,5 bcA	12,5 aB	6,13 abcA	3,94 abcB	7,25 abcA	6,1 abB
AP 15	15,81 cdA	12,62 aB	5,58 abcdeA	3,71 abcB	7 abcdA	5,82 abB
AP 01	16,56 cdA	12 aB	5,4 bcde	3,78 abcB	6,56 cdA	6,2 abA
AP 77	17,06 cdA	12,87 aB	6,31 abA	3,43 cB	7,04 abcdA	5,35 abB
AP 173	17,68 bcA	12,93 aB	5,75 abcdeA	4,39 abcB	6,81 bcdA	5,42 abB
AP 46	14,62 dA	12,06 aB	4,74 deA	4,59 abcA	7,25 abcA	5,85 abB
AP 227	15,12 cdA	12,75 aB	5,88 abcdA	4,47 abcB	7,05 abcA	5,1 abB
AP 108	15,75 cdA	13,5 aB	5,23 bcdeA	4,89 abA	6,12 cdA	7,02 aA
AP 284	15,87 cdA	13 aB	4,47 eA	4,27 abcA	6,43 cdA	5,76 abA
AP 167	16,81 cdA	13,56 aB	5,92 abcdA	3,92 abcB	6,65 cdA	6,07 abA
AP 86	14,68 cdA	13,12 aB	5,44 abcdeA	4,04 abcB	6,87 bcdA	5,91 abA
AP 123	16,43 cdA	12,68 aB	5,24 bcdeA	4,5 abcA	6,98 abcdA	5,87 abB
AP 6A	15 cdA	13 aB	4,92 cdeA	3,9 abcB	6,72 cdA	5,96 abA
AP 03	20,06 abA	11 aB	5,86 abcdA	4,1 abcB	8,75 abA	6,31 abB
AP 114	15,31 cdA	11,43 aB	6,31 abA	5 aB	6,93 abcdA	6,21 abA
AP 12	16,62 cdA	13,5 aB	5,69 abcdeA	4,95 abA	6,94 abcdA	6,25 abA
AP 38	16,68 cdA	13,43 aB	5,66 abcdeA	4,45 abcB	7,35 abcA	6abB
AP 137	15,93 cdA	11,68 aB	5,42 abcdeA	3,6 bcB	6,87 bcdA	4,8 bB
Testemunha	16,56 cdA	11,31 aB	5,75 abcdeA	4,42 abcB	5,05 dA	5,2 abA
CV(%)	7,36		10,87		12,18	

3 Médias seguidas por letras minúsculas iguais nas colunas e maiúsculas iguais na linha, não
 4 diferem entre si pelo teste de Tukey (0,05 probabilidade).
 5

1 Tabela 5: Efeito dos isolados de *Bacillus* spp. na altura e pesos das massas frescas de raiz e parte
 2 aérea de plantas de soja da cultivar BMX POTÊNCIA RR no terceiro ensaio.

Isolados	BMX Potência		
	Altura (cm)	Raiz (g)	Parte aérea (g)
AP 181	15,75 abc	4,69 bcdef	8,06 ab
AP 209	14,25 abc	5,13 bcde	7,58 ab
AP 186	12,5 c	4,05 f	7,03 ab
AP 27a	14,87 abc	4,7 bcdef	7,62 ab
QST 2808	18,12 ab	5,68 b	8,12 a
AP 48	15,50 abc	4,82 bcdef	7,85 ab
AP 25	13 c	4,35 def	7,23 ab
AP 511	13,75 abc	5,68 b	7,63 ab
AP 88	16,25 abc	5,13 bcde	7,51 ab
AP 56	14 abc	5,58 bc	8,13 a
AP 94	13,75 abc	4,11 ef	7,4 ab
AP 43	14,25 abc	5,04 bcdef	7,89 ab
AP 106	18,5 a	7,31 a	8,22 a
AP 20	16,25 abc	4,98 bcdef	7,82 ab
AP 204	16 abc	5,25 bcd	7,97 ab
AP 54	14 abc	4,25 def	7,62 ab
AP 505	13,5 abc	4,88 bcdef	6,83 b
AP 80	17,25 abc	4,94 bcdef	7,52 ab
AP 73	14,5 abc	4,72 bcdef	7,66 ab
AP 312	14,62 abc	4,63 cdef	7,92 ab
Testemunha	14 abc	4,69 bcdef	7,31 ab
CV(%)	12,63	7,85	6,4

3 Médias seguidas por letras iguais nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey
 4 (0,05 probabilidade).

5 Tabela 5: Efeito dos isolados de *Bacillus* spp. na altura, pesos das massas frescas e secas de raiz e parte aérea de plantas de soja da cultivar BMX Potência
 6 RR co-inoculadas com *Bradyrhizobium japonicum* aos 21 dias após a semeadura.

Isolados	Altura (cm)		Peso fresco raiz (g) ^{ns}		Peso seco raiz (g)		Peso fresco parte aérea (g)		Peso seco parte aérea (g)	
	Inoculante		Inoculante		Inoculante		Inoculante		Inoculante	
	Com	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com	Sem
AP 51	19,80 abA	20,05 abA	8	8,18	4,26 aA	4,31 aA	6,51 aA	6,00 aB	4,51 aA	4,33 aB
AP 106	20,45 aA	19,75 abA	7,9	7,55	4,19 aA	4,20 aA	6,25 abA	6,07 aA	4,12 bA	4,16 abA
QST 2808	17,40 bcB	20,15 aA	7,88	7,96	4,28 aA	4,29 aA	5,64 dA	5,83 abA	4,00 bA	4,01 bA
AP 117	20,40 aA	19,90 abA	7,83	7,73	4,38 aA	4,28 aA	6,10 bcA	6,13 aA	4,18 bA	4,04 bB
AP 03	16,50 cA	18,00 abA	7,95	7,37	4,30 aA	4,21 aA	5,90 bcdA	5,92 abA	4,05 bA	4,12 bA
AP 25	17,30 bcB	19,50 abA	7,6	7,82	4,31 aA	4,16 aB	5,81 cdA	5,85 abA	4,09 bA	4,02 bA
QST 713	18,30 abcA	17,50 bcA	7,72	7,48	4,32 aA	4,24 aA	5,86 bcdA	5,80 abA	4,12 bA	4,07 bA
AP 40	17,65 bcA	18,95 abA	7,39	7,28	4,27 aA	4,22 aA	5,75 cdA	5,76 abA	4,05 bA	4,04 bA
Testemunha	16,90 cA	15,10 cB	7,1	7	4,27 aA	3,81 bB	5,79 cdA	5,59 bA	4,08 bA	3,71 cB
CV(%)	7,02		6,24		7,27		3,29		2,24	

7 Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey (0,05 probabilidade). ^{ns} = Não
 8 significativo.

9 Tabela 6: Efeito dos isolados de *Bacillus* spp. no nível de clorofila (unidades SPAD) e na expressão das enzimas Peroxidase (PO), Polifenoloxidase (PPO) e
 10 Fenilalanina amônia-liase (FAL) em folhas de soja da cultivar BMX Potência RR co-inoculadas com *Bradyrhizobium japonicum* aos 21 dias após a
 11 semeadura.

Isolados	Unidades SPAD ^{ns}		PO (U mg ⁻¹ tecido min ⁻¹)		PPO (U mg ⁻¹ tecido min ⁻¹)		FAL (μgác trans cin mg ⁻¹ proteína min ⁻¹)	
	Inoculante		Inoculante		Inoculante		Inoculante	
	Com	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com	Sem
AP 51	36,18 ^{ns}	35,9 ^{ns}	174,09 aA	85,02 abB	45,46 cA	42,04 bA	5,48 cA	3,53 cA
AP 106	35,6	36,55	144,41 aA	99,90 abB	54,99 bcA	44,62 abA	4,06 cA	1,38 cA
QST 2808	37,9	36,92	170,37 aA	104,58 abB	63,84 abA	51,34 abB	2,13 cA	2,98 cA
AP 117	35,01	37,03	193,96 aA	67,65 abB	59,00 abcA	55,18 abA	1,48 cA	4,08 cA
AP 03	36,02	35,32	165,21 aA	62,76 abB	64,39 abA	59,91 aA	16,53 bB	35,96 aA
AP 25	36,9	35,47	164,74 aA	113,06 aB	76,23 aA	48,58 abB	19,18 bA	23,65 bA
QST 713	35,55	35,62	145,30 aA	54,71 bB	71,39 abA	52,15 abB	20,87 bA	24,02 bA
AP 40	36,04	36,02	185,72 aA	57,53 bB	66,73 abA	58,21 abA	22,41 bB	42,58 aA
Testemunha	35,14	33,28	163,41 aA	55,82 bB	69,36 abA	56,52 abA	34,53 aA	33,81 abA
CV(%)	3,97		22,02		14,81		22,18	

12 Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey (0,05 probabilidade). ^{ns} = Não
 13 significativo.

14 Tabela 7: Efeito dos isolados de *Bacillus* spp. na altura, pesos das massas frescas e secas de raiz e parte aérea de plantas de soja da cultivar BMX Potência
 15 RR co-inoculadas com *Bradyrhizobium japonicum* aos 28 dias após a semeadura.

Isolados	Altura (cm)		Peso fresco raiz (g)		Peso seco raiz (g) ^{ns}		Peso fresco parte aérea (g) ^{ns}		Peso seco parte aérea (g) ^{ns}	
	Inoculante		Inoculante		Inoculante		Inoculante		Inoculante	
	Com	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com	Sem
AP 51	23,1 aB	25,85 aA	9 abA	7,23 abcB	6,27 ^{ns}	4,84 ^{ns}	9,3 ^{ns}	8 ^{ns}	6,8 ^{ns}	5,83 ^{ns}
AP 106	22,56 aA	24,9 abA	9,05 abA	5,99 cB	6,13	4,51	9	8,21	6,78	5,79
QST 2808	21,4 aA	23,2 abA	8,96 abA	7,18 abcB	5,97	4,9	8,89	7,67	6,73	5,66
AP 117	24,05 aA	24 abA	9,33 aA	7,72 abB	6,28	4,62	9,42	8,4	6,79	5,76
AP 03	21,05 aA	22,5 abcA	9,05 abA	6,45 bcB	5,87	4,35	9	7,79	6,69	5,83
AP 25	21,6 aB	25 abA	9,18 abA	6,31 cB	6,04	4,33	8,59	7,85	6,76	5,78
QST 713	22,35 aA	21,3 bcA	8,83 abA	7,07 abcB	5,83	4,39	8,82	7,61	6,82	5,76
AP 40	20,9 aB	25,4 aA	9,05 abA	7,82 aB	5,93	4,69	8,63	7,93	6,73	5,78
Testemunha	21,65 aA	19,1 cB	8 bA	6,77 abcB	6,01	4,23	8,49	7,07	6,59	5,61
CV(%)	8,51		8,2		6		6,42		5,32	

16 Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey (0,05 probabilidade).^{ns} = Não
 17 significativo.

18 Tabela 8: Efeito dos isolados de *Bacillus* spp. no nível de clorofila (unidades SPAD) e na expressão das enzimas Peroxidase (PO), Polifenoloxidase (PPO) e
 19 Fenilalanina amônia-liase (FAL) em folhas de soja da cultivar BMX Potência RR co-inoculadas com *Bradyrhizobium japonicum* aos 28 dias após a
 20 semeadura.

Isolados	Unidades SPAD		PO (U mg ⁻¹ tecido min ⁻¹) ^{ns}		PPO (U mg ⁻¹ tecido min ⁻¹) ^{ns}		FAL (µgác trans cin mg ⁻¹ proteína min ⁻¹)	
	Inoculante		Inoculante		Inoculante		Inoculante	
	Com	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com	Sem
AP 51	33,47 aA	33,98 abA	186,65 ^{ns}	222,05 ^{ns}	35,02 ^{ns}	48,73 ^{ns}	7,48 eA	1,87 cA
AP 106	36,02 aA	36,07 aA	163,13	215,74	32,1	65,44	2,47 eA	2,19 cA
QST 2808	35,04 aA	33,42 abA	216,09	247,57	35,96	65,93	3,55 eA	1,33 cA
AP 117	35,26 aA	37,02 aA	181,61	247,42	34,44	66,51	12,87 deA	0,73 cB
AP 03	36,72 aA	31,29 bB	154,16	164,05	44,85	71	46,67 bA	33,47 abB
AP 25	35,29 aA	33,41 aA	123,73	159,3	41,34	70,2	79,79 aA	24,82 bB
QST 713	36,04 aA	34,49 aB	160,43	162,57	31,4	48,75	75,27 aA	24,76 bB
AP 40	36,7 aA	34,49 aA	162,95	169,6	41,85	76,6	44,37bcA	26,59 bB
Testemunha	36,78 aA	34,73 abA	193,03	195,87	46,18	76,7	27,44 cdB	44,76 aA
CV(%)	5,55		17,85		23,81		25,03	

21 Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey (0,05 probabilidade). ^{ns} = Não
 22 significativo.

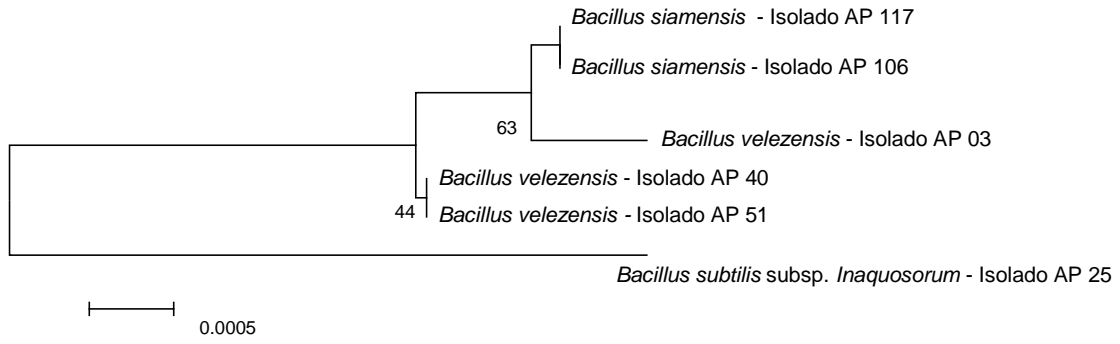
1 Tabela 9: Produção de ácido cianídrico (HCN), ácido indolacético (AIA), solubilização de fosfato
 2 (P), assimilação de nitrogênio (N), catalase (CAT) e sideróforos (SID) pelos isolados de *Bacillus*
 3 spp.

Isolados	HCN	AIA	P	N	CAT.	SID
AP 51	-	-	-	+	+	-
AP 106	-	-	-	+	+	+
QST 2808	-	-	-	-	+	-
AP 117	-	-	-	+	+	+
AP 03	-	-	-	+	+	+
AP 25	-	-	-	+	+	-
QST 713	-	-	+	-	+	+
AP 40	-	-	-	-	+	-

4 (+) = Positivo; (-) = Negativo
 5

1

Figura 6: Análise molecular filogenética dos seis isolados selecionados pelo método da máxima verossimilhança.



1 **5 Manejo da ferrugem asiática da soja com *Bacillus subtilis* e óleo de café**
2 **em aplicações sequenciais e alternadas com fungicida³**

3 Dalton Vinicio Dorighello^{1*}, Regina Maria Villas Bôas de Campos Leite², Wagner
4 Bettiol³

5 ¹Faculdade de Ciências Agronômicas (FCA) - Universidade Paulista Júlio de
6 Mesquita Filho (UNESP)

7 ²Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Soja

8 ³Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Meio Ambiente

9 *Autor para correspondência: E-mail: dalton.agro@gmail.com

10

11

12 **RESUMO**

13 Estimativas colocam o Brasil, a partir de 2020, como o maior produtor mundial de
14 soja, com produção superior a 100 milhões de toneladas. A ferrugem asiática da
15 soja, desde seu primeiro relato no país, pelo seu alto potencial destrutivo, tem sido
16 considerada a doença chave na cultura. Das medidas de controle da doença, as
17 sucessivas aplicações de fungicidas durante o ciclo da cultura tem sido a mais
18 eficiente. Essa ferramenta permitiu o avanço da produção, apesar das perdas
19 anuais superarem US\$1 bilhão. Com os relatos de populações de *Phakopsora*
20 *pachyrhizi* menos sensíveis às principais moléculas, perda na eficiência de controle
21 e dificuldade na obtenção de novas moléculas, é fundamental que novas
22 ferramentas sejam testadas para integrarem um programa de manejo. Em
23 condições de campo, foi planejado estudar a eficiência de um produto biológico à
24 base de *Bacillus subtilis* QST-713 e de um à base de óleos de grãos de café
25 torrados, em aplicações sequenciais e alternadas com a do fungicida
26 piraclostrobina + epoxiconazol. Os resultados de dois ensaios nos campos
27 experimentais mostraram que as aplicações sequenciais desses três produtos
28 reduziram a área abaixo da curva de progresso da doença e aumentaram o índice

³ Este capítulo foi redigido em formato de artigo de acordo com as normas da revista Crop Protection.

1 de vegetação por diferença normalizada. Apesar destes resultados, somente as
2 aplicações sequenciais de *Bacillus* apresentaram produtividade e peso de 100
3 sementes semelhantes às da aplicação sequencial de fungicida. As aplicações
4 alternadas destes produtos, exceto com óleo de café no segundo ensaio, apesar
5 das diferentes respostas de controle, também tiveram produtividades iguais ao da
6 aplicação sequencial do fungicida. Os resultados permitem sugerir a utilização do
7 produto à base de *B. subtilis* QST-713 para controle da ferrugem asiática da soja e
8 para compor um programa de manejo da doença. No entanto, esses resultados
9 foram obtidos sobre baixa intensidade da doença e, por isso, respostas diferentes
10 podem ser encontradas em condições de alta intensidade.

11 **Palavras chave:** *Bacillus*, soja, *Phakopsora pachyrhizi*.

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

1 1 Introdução

2 A soja é a cultura agrícola mais importante do Brasil, desde o início dos anos
3 2000, com área plantada de, aproximadamente, 32,96 milhões de hectares e
4 produção na safra 2015/2016 de 95 milhões de toneladas, com ocupação de 49%
5 da área total de grãos do país (IBGE, 2016; CONAB, 2016). A preocupação com
6 pragas e doenças aumentam devido às dimensões econômicas que a cultura
7 representa. Assim, os problemas fitossanitários podem comprometer a produção
8 nacional, entre eles, cerca de 40 doenças causadas por vírus, fungos, nematoides
9 e bactérias ocorrem na cultura (Henning, 2009). No entanto, a doença com maior
10 potencial de dano aos produtores no momento é a ferrugem asiática da soja,
11 causada por *Phakopsora pachyrhizi*. Essa doença é considerada a mais importante
12 desde a sua constatação no país, com prejuízos que anualmente ultrapassam um
13 bilhão de dólares, com perdas relatadas em todas as regiões produtoras (Yorinoni
14 e Lazzarotto, 2004; Yorinori et al., 2005; Langenbach et al., 2016; Consórcio
15 Antiferrugem, 2017).

16 A sustentabilidade do manejo de doenças de plantas depende da integração
17 de diferentes ferramentas (Goulart et al., 2011). O uso de cultivares de ciclo
18 precoce, a eliminação de plantas voluntárias, a semeadura no início da época
19 recomendada, o vazio sanitário (por meio da ausência de cultivo de soja na
20 entressafra) e o monitoramento da lavoura durante todo o ciclo estão entre as
21 medidas preconizadas para o manejo da ferrugem asiática da soja, aliados a
22 informações geradas pelo monitoramento das populações de *Phakopsora*
23 *pachyrhizi* quanto a sensibilidade as moléculas de fungicidas e programas de
24 melhoramento para a obtenção de variedades de soja resistente à ferrugem
25 (Yorinori e Wilfrido, 2002; Murithi et al., 2016; Langenbach et al., 2016). No entanto,
26 o controle ainda é realizado, quase que exclusivamente, com o uso de fungicidas,
27 principalmente dos grupos do triazóis, estrobirulinas, triazolinthione e, mais
28 recentemente, carboxamidas, além de suas misturas (Godoy e Canteri, 2004;
29 Godoy et al., 2013). Estudos onde são testados os principais fungicidas disponíveis
30 no mercado apontam para uma perda anual gradual de eficiência de controle frente
31 às populações de *P. pachyrhizi*, que estão cada vez menos sensíveis a essas
32 moléculas (Godoy et al. 2013; Godoy et al. 2014; Godoy et al. 2015; Godoy et al.

1 2016). Inclusive, segundo comunicado de Klappach (2017) pelo FRAC, ao grupo
2 das carboxamidas na safra 2015/2016 e, principalmente, na de 2016/2017.

3 Atualmente, a utilização de microrganismos, componentes de programas de
4 controle biológico, têm aumentado significativamente em todo o mundo por dois
5 motivos impulsionados por organizações não governamentais, políticas públicas e
6 consumidores preocupados com altos níveis de resíduos encontrado nos
7 alimentos, o uso demasiado de agrotóxicos e questões relacionadas a
8 sustentabilidade (van Lenteren et al., 2017). Produtos biológicos que tem como
9 principal componente isolados de *Bacillus* spp., compõe parte deste mercado e,
10 devido resultados promissores destes organismos controlarem patógenos como,
11 *Meloidogyne* spp. (Machado et al., 2012), *Rhizoctonia solani* (Peng et al., 2014),
12 *Fusarium oxysporum* (Xu et al., 2014), *Sclerotinia sclerotiorum* (Gao et al., 2014)
13 *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Leão et al., 2016), *Ralstonia*
14 *solenacearum* (Wu et al., 2017) existe a perspectiva de um crescimento cada vez
15 maior deste setor.

16 No entanto, os agentes de biocontrole e os produtos alternativos ainda não
17 foram estudados com detalhes para este patossistema (Goellner et al., 2010). Mas,
18 informações como a diminuição da formação de urédias, aumento das lesões com
19 menor esporulação e diminuição da germinação (Ward et al. 2012), redução da
20 severidade (Saksirirat e Hoppe, 1991), aumento do rendimento monetário líquido
21 (Jahagirdar et al., 2012), além de resultados promissores em condições controladas
22 (Dorighello et al., 2015), encorajam a integração destas ferramentas com o controle
23 químico, buscando atingir maior sanidade e sustentabilidade das lavouras, além de
24 diminuir o risco de resistência aos fungicidas (Hui et al., 2013).

25 *Bacillus* spp. são fontes potenciais para o desenvolvimento de biofungicidas
26 pois apresentam características como produção de ampla gama de metabólitos,
27 produção de estrutura de resistência e facilidade de multiplicação, entre outras
28 (Ongena e Jacques, 2008; Cawoy et al., 2011). O potencial de *Bacillus subtilis* no
29 controle de ferrugens de plantas é relatado para a ferrugem do cafeeiro (*Hemileia*
30 *vastatrix*) (Haddad et al., 2009), ferrugem da soja (*Phakopsora pachyrhizi*)
31 (Dorighello et al., 2015) e ferrugem do feijoeiro (*Uromyces phaseoli*) (Baker et al.,
32 1985; Bettioli et al., 1992; Yuen et al., 2001).

1 As utilizações isoladas de *Bacillus* spp. (Singh et al., 2016) e óleos vegetais
2 (Chen et al., 2015) para controle de ferrugens não apresentaram controles
3 satisfatórios quando comparados com os fungicidas convencionais considerados
4 padrões. Desta forma, a investigação sobre a integração dessas ferramentas pode
5 ser a chave para redução no uso de fungicidas e impulsionar o posicionamento dos
6 produtos alternativos. Essa abordagem integrada que explore diferentes
7 ferramentas pode ser determinante para a produção sustentável de soja no futuro
8 (Langenbach et al., 2016).

9 Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência de controle da
10 ferrugem asiática da soja utilizando um produto biológico à base de *Bacillus subtilis*
11 QST 713 (Serenade®) e um produto alternativo à base de óleo de café torrado em
12 aplicações sequenciais e alternadas com o fungicida Piraclostrobina +
13 Epoxiconazol, formando diferentes arranjos de aplicação, mas visando a redução
14 do uso de fungicidas na cultura.

1 2 Material e Métodos

2 Dois ensaios foram instalados no campo experimental da Embrapa Soja em
3 Londrina, PR (23°11'30.33"S e 51°10'57.80"O). Ambos os ensaios foram
4 conduzidos na safra de verão 2013/2014, em dois campos. Os campos estavam
5 separados por uma área de mata, portanto com microclimas distintos. Os ensaios
6 foram conduzidos de forma comercial e a cultivar utilizada foi a BMX POTÊNCIA
7 RR que possui as seguintes características: grupo de maturação 6,7; com hábito
8 de crescimento indeterminado; alto índice de ramificação; resistente ao
9 acamamento; resistente ao cancro da haste (*Diaporthe phaseolorum* f. sp.
10 *meridionalis*) e a podridão de Phytophthora (*Phytophthora sojae*); moderadamente
11 resistente a mancha olho de rã (*Cercospora sojina*) e suscetível a pústula
12 bacteriana (*Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*). A semeadura do Campo 1 foi
13 realizada no dia 19/11/2013 e a do Campo 2 no dia 27/11/2013.

14 Os tratamentos consistiram nas aplicações alternadas entre *B. subtilis*
15 (Serenade® - Bayer CropScience, Tlaxcala, México), óleo de café torrado
16 (Fornecido pelo Pesquisador Nilson Molina Maia, Instituto Agronômico de
17 Campinas, Campinas, Brasil) e o fungicida Piraclostrobina + Epoxiconazol (Ópera®
18 - Basf, Schwarzheide, Alemanha), de acordo com os esquemas de aplicação
19 apresentado na Tabela 1.

20 As parcelas foram compostas de seis linhas de seis metros num
21 espaçamento de 0,5 metro entrelinhas. O óleo de café foi obtido por meio da
22 prensagem a frio de grãos de café torrados e encontrava-se na sua forma bruta. A
23 concentração utilizada foi de 10% diluído em água + 0,5% de Tween 20. O fungicida
24 à base de piraclostrobina + epoxiconazol (Ópera®) foi aplicado na dose de 0,5 L
25 ha⁻¹, correspondente a 66,5 g + 25 g ha⁻¹ dos ingredientes ativos, respectivamente.
26 O biofungicida à base de *Bacillus subtilis* (Serenade®) foi pulverizado na
27 concentração de 2 L ha⁻¹. Todos os produtos foram aplicados preventivamente, com
28 intervalos de 15 dias a partir do estágio fenológico de Reprodução (R1) (Ritchie et
29 al., 1986). A aplicação dos produtos foi realizada utilizando um pulverizador costal
30 pressurizado com CO₂ (pressão constante de 45 PSI), com volume de aplicação de
31 200 L ha⁻¹, totalizando quatro aplicações (Tabela 1). Todas as aplicações foram

1 realizadas nas primeiras horas da manhã, garantindo umidade superior a 60% e
2 temperatura inferior a 30°C.

3 As avaliações da severidade da doença foram realizadas com auxílio da
4 escala diagramática proposta por Godoy et al. (2006), nos terços inferior, médio e
5 superior das plantas, considerando a média das três notas como a nota de
6 severidade da planta. Essas avaliações foram realizadas em cinco plantas de cada
7 uma das duas linhas centrais de cada parcela. As avaliações de severidade foram
8 realizadas antes das 2^a, 3^a e 4^a aplicação e após 15 dias da última aplicação. Os
9 dados de severidade foram utilizados para calcular a Área Abaixo da Curva de
10 Progresso da Doença (AACPD) (Campbell e Madden, 1990).

11 O Índice de Vegetação por Diferença Normalizada (NDVI) foi determinado
12 por meio de sensoriamento remoto utilizando um equipamento para determinar os
13 níveis de clorofila (Greenseeker® - Trimble, Vale do Silício, Califórnia). Para tanto
14 foram avaliadas as linhas centrais de todas as parcelas antes das 3^a e 4^a aplicações
15 e após 15 dias da última aplicação. O NDVI, em uma escala de 0 a 1, relaciona-se,
16 pelos maiores valores a uma vegetação mais densa e vigorosa e, pelos menores
17 valores, as áreas desnudas e de vegetação estressada.

18 A produtividade e o peso de 100 sementes foram calculados a 13% de
19 umidade considerando todas as plantas das duas linhas centrais. A colheita foi
20 realizada com uma colheitadora de grãos (Semina1400 – Semina, Caxias do Sul,
21 Rio Grande do Sul). Com os dados por parcela foi estimada a produtividade por
22 hectare.

23 O delineamento experimental foi o de blocos casualizados com quatro
24 repetições e as análises estatísticas foram realizadas pelo teste de comparações
25 múltiplas de médias de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o programa
26 estatístico SAS® 9.0.

1 3 Resultados

2 Todos os esquemas de aplicação dos produtos à base de *B. subtilis*, óleo de
3 café torrado e fungicida químico reduziram significativamente a área abaixo da
4 curva de progresso da doença (AACPD) quando comparados com a testemunha
5 (Tabelas 2 e 3). As reduções na AACPD no campo 1 variaram, em relação à
6 testemunha, de 41% referente a aplicação somente de Serenade® ou de óleo de
7 café a 67% com a aplicação somente do fungicida (Tabela 2). No campo 2, estas
8 reduções foram de 22%, 53% e 69% com as quatro aplicações de óleo de café, *B.*
9 *subtilis* e fungicida, respectivamente (Tabela 3). Os resultados observados nas
10 duas primeiras avaliações de severidade, em ambos ensaios, indicam que a
11 ocorrência inicial da doença no campo foi de baixa intensidade (Tabelas 2 e 3).
12 Entretanto, ocorreu aumento mais acentuado na terceira e na quarta avaliação.

13 As aplicações intercaladas de óleo de café com o fungicida reduziram a
14 AACPD em relação a testemunha, mas semelhantemente às reduções observadas
15 para as aplicações intercaladas do fungicida com água, em ambos os campos. O
16 uso alternado de *B. subtilis* QST 713 com o fungicida, apesar de ter se mostrado
17 menos eficiente do que quando o fungicida foi aplicado nas quatro vezes, promoveu
18 um incremento de controle em relação ao esquema onde foram aplicadas duas
19 vezes o fungicida. A utilização sequencial de *B. subtilis* QST 713 e do óleo de café
20 reduziram a AACPD quando comparado com a testemunha, mas apresentaram
21 desempenho inferior aos tratamentos onde o fungicida estava presente (Tabelas 2
22 e 3).

23 A maior produtividade, no campo 1, foi obtida com a aplicação intercalada
24 de *Bacillus* e de fungicidas (47% superior à testemunha), seguida de quatro
25 aplicações sequenciais de fungicida e das aplicações intercaladas de fungicida e
26 *Bacillus* (41% superior à testemunha), de quatro aplicações de *Bacillus* apenas
27 (39% superior à testemunha) e da sequencia fungicida e água, 32% superior à
28 testemunha (Tabela 2). No campo 2, a maior produtividade foi observada para as
29 quatro aplicações sequencias de fungicida (38% superior à testemunha), seguida
30 dos tratamentos com aplicações intercaladas de fungicida e água, *Bacillus* e
31 fungicida e as quatro de *Bacillus*, todas com produtividade 33%, 32% e 28%
32 superior à testemunha (Tabela 3). As aplicações de óleo de café em todas as

1 épocas aumentaram em 3% e 8% a produtividade em relação à testemunha nos
2 dois campos (Tabelas 2 e 3).

3 A aplicação sequencial de fungicida e a aplicação alternada de *B. subtilis*
4 QST 713 e fungicida (B-F-B-F) e (F-B-F-B) diferiram da testemunha para o peso de
5 100 sementes no campo 1 (Tabela 2). No Campo 2, as aplicações sequencias de
6 fungicida e também as de *B. subtilis* QST 713, além dos arranjos de aplicação F-A-
7 F-A e B-F-B-F diferiram da testemunha, evidenciando que, além do fungicida, o
8 isolado de *B. subtilis* QST 713 pode influenciar nos componentes da produtividade
9 (Tabela 3).

10 Nas avaliações de NDVI, as aplicações sequencias do fungicida e de *B.*
11 *subtilis*, além do arranjo B-F-B-F diferiram da testemunha nas três avaliações no
12 campo 1. No campo 2, além da aplicação sequencial do fungicida, o arranjo F-B-F-
13 B também diferiram da testemunha em todas as avaliações, indicando que esses
14 tratamentos podem contribuir para a melhor manutenção do dossel.

1 4 Discussão

2 Os produtos biológicos, conforme discutido por Dorighello et al. (2015),
3 podem ser uma alternativa a patossistemas considerados difíceis se integrados a
4 outras ferramentas de manejo, como o uso de fungicida. Para a severidade da
5 ferrugem da soja, em aplicação sequencial, o produto biológico à base de *B. subtilis*
6 QST-713 apresentou em todas as avaliações um melhor desempenho quando
7 comparado à testemunha nos dois campos avaliados. Apesar deste desempenho
8 ser inferior ao da aplicação quinzenal do fungicida, o nível de controle obtido foi
9 suficiente para garantir produtividade semelhante. Nos dois ensaios o ataque da
10 doença ocorreu, inicialmente, com baixa intensidade e os valores de severidade
11 obtidos nas primeiras avaliações, durante a floração, podem ter contribuído para
12 que produtividade se mantivesse. Valores distintos de severidade, com valores
13 iguais de produtividade são conhecidos (Mesquini et al., 2011) e, comparado aos
14 fungicidas convencionais, os resultados obtidos pelos produtos biológicos à base
15 *Bacillus* spp. têm sido mais variáveis (Wei et al., 2016).

16 Reiss e Jorgensen (2017) verificaram eficiência de mais de 60% para o
17 controle da ferrugem amarela do trigo utilizando o produto à base de *B. subtilis*
18 QST-713 quando a doença ocorria em baixa intensidade. No entanto, em um
19 segundo ensaio, sobre alta intensidade, a eficiência de controle caiu para menos
20 de 30%. Esse fato levou os autores sugerirem que o produto à base de *B. subtilis*
21 QST-713 esteja associado a utilização de fungicidas. Portanto, essas informações
22 expõem a necessidade do constante monitoramento das lavouras, bem como das
23 condições que favorecem/desfavorecem o progresso da doença para que seja
24 realizada a escolha do melhor método de controle para aquele momento. Ainda
25 segundo Reiss e Jorgensen (2017), um aspecto importante a ser considerado na
26 utilização de produtos biológicos é o momento de aplicação (“Timing”), uma vez
27 que seus resultados apontaram que as aplicações realizadas junto com a
28 inoculação ou um dia depois da inoculação obtiveram os melhores resultados,
29 quando comparados com as aplicações realizadas 2, 4 ou 6 dias depois da
30 inoculação. Neste sentido, os resultados obtidos de Twizeyimana e Hartman
31 (2017), em um ensaio onde a aplicação dos fungicidas foram realizadas em
32 diferentes tempos, antes e após a inoculação, apontam um aumento no número de

1 urédias e da esporulação a medida que a aplicação se afasta, para antes ou depois,
2 da inoculação.

3 Os resultados obtidos com a alternância da aplicação entre o fungicida e o
4 produto à base de *B. subtilis* QST-713, indicou que iniciar as aplicações com um ou
5 com outro, não interferiu nos resultados das variáveis analisadas (Tabelas 2 e 3).
6 Apesar dos fungicidas se destacarem como as ferramentas mais utilizadas no
7 manejo da ferrugem asiática da soja, principalmente pelo uso dos triazóis e suas
8 combinações com estrobilurinas (Tecnologias, 2011), essas moléculas têm
9 apresentado baixa eficiência de controle e sua utilização isolada tem contribuído
10 para a seleção de populações de *P. pachyrhizi* menos sensíveis aos fungicidas
11 inibidores da desmetilação (IDM) (Schmitz et al., 2014) e aos inibidores de quinona
12 oxidase (IQo) (Klosowski et al., 2016). Visto que, dos mais de 100 produtos
13 registrados para o controle de doença, apenas cinco apresentaram controle
14 superior a 60% (Alvim et al., 2009a; Alvim et al., 2009b; Godoy et al., 2015), a busca
15 por novas ferramentas, bem como o esquema de aplicação dos mesmos deve ser
16 incessante. Os resultados do presente trabalho indicam que o uso de produtos à
17 base de *B. subtilis* pode ser uma alternativa. Considerando o aumento na
18 disponibilidade de biofungicidas à base de *Bacillus* spp. no mercado brasileiro
19 (Agrofit, 2017), há necessidade de que outros produtos também sejam testados
20 considerando as aplicações intercalares com fungicidas químicos. Talvez essa seja
21 uma das principais contribuições do presente trabalho.

22 No âmbito do controle genético, o cenário é semelhante. Diversos genes de
23 resistência foram mapeados e cultivares comerciais estão disponíveis, mas essa
24 medida não dispensa o uso de fungicidas (Paul et al., 2013; Liu et al., 2016;
25 Langenbach et al., 2016). Apenas recentemente, o gene CcRpp1 de feijão-gandu
26 (*Cajanus cajan*) foi clonado e transferido a uma cultivar de soja a qual passou a
27 apresentar resistência total à ferrugem asiática da soja (Kawashima et al., 2016).
28 No entanto, a cultivar ainda não está disponível comercialmente. Dessa forma, uma
29 nova ferramenta, com comprovada ação de contato contra a ferrugem asiática da
30 soja é o produto à base de *B. subtilis* QST-713 (Dorighello et al., 2015), aumentando
31 as possibilidades de rotação de produtos e contribuindo para minimizar os
32 problemas com resistência do patógeno aos fungicidas.

1 O gênero *Bacillus* têm sido amplamente estudado e umas das características
2 desses organismos é a produção de diferentes metabólicos com ação contra
3 fitopatógenos. Em analogia com os fungicidas multi-sítios, que são essenciais
4 dentro de um programa de combate a resistência (FRAC, 2010), *Bacillus subtilis*
5 QST-713 ao atuar por antibiose têm, reconhecidamente, uma ampla gama de ação
6 (Kupper et al., 2010), mas também pode agir por indução de resistência do
7 hospedeiro (Fousia et al., 2016) e competição com o patógeno (Mohamed et al.,
8 2016). Este isolado foi obtido de um solo de um pomar de pêssego em Davis-CA
9 pela AgraQuest e se tornou um produto biológico promissor no controle de doenças
10 de plantas (Restuccia et al., 2006). O isolado produz, principalmente, surfactina e
11 iturina A (Kinsella et al., 2009) e atua contra patógenos como *Plasmodiophora*
12 *brassicae* (Peng et al., 2014), *Botrytis cinerea* (Santiago et al., 2016), *Puccinia*
13 *striiformis* (Reiss e Jørgensen, 2017) e *Phakopsora pachyrhizi* (Dorighello et al.,
14 2015). Frac e Jezierska-Tys (2010) descrevem o isolado como um “destruidor
15 generalizado de membranas celulares”. Como demonstrado por Li et al. (2013), a
16 utilização desse isolado, além de poder contribuir no controle e combate a
17 resistência de ferrugem asiática da soja, pode se tornar um importante aliado frente
18 a outros patógenos como *Corynespora cassiicola* e *Cercospora sojina*, que também
19 apresentaram relatos de perda de sensibilidade a fungicidas (Xavier et al., 2013;
20 Zhang et al., 2012; Avozani et al., 2014; Cabral et al., 2016;; Standish et al., 2016)

21 O índice NDVI têm sido amplamente utilizado na agricultura e seus valores
22 são, basicamente, relacionados com as condições do dossel, sendo que os maiores
23 índices são obtidos onde há maior cobertura vegetal (Guan et al., 2014). Desta
24 forma, por diferentes respostas serem obtidas de uma folha sadia e uma doente
25 (Silva et al., 2000), os dados apresentados, demonstram, na última avaliação, uma
26 superioridade de cobertura vegetal nas parcelas que receberam aplicações
27 sequenciais ou intercaladas do fungicida e também do produto biológico. Esse
28 índice pode ser considerado um indicativo do estado fitossanitário da lavoura, uma
29 vez que a ferrugem asiática da soja causa desfolha prematura das folhas, reduzindo
30 a cobertura vegetal.

31 As aplicações de óleo de café torrado, apesar de ter reduzido a severidade
32 da doença em comparação à testemunha, essa não foi suficiente para que não
33 houvesse perdas na produtividade. Os NDVI verificado com a aplicação sequencial

1 do óleo, foram similares ao da testemunha e, apesar de reações fitotoxicidade
2 serem comuns após a aplicação deste tipo de produtos (Brum et al., 2014;
3 Dorighello et al., 2015), nenhuma alteração visível foi constatada. Apesar de haver
4 poucos relatos relacionados ao uso de dos óleos vegetais, Silva et al. (2014), ao
5 utilizar óleos essenciais de *Hyptis marrubioides* (Hortelã do campo), *Aloysia*
6 *gratissima* (Alfazema), e *Cordia verbenacea* constataram redução do progresso da
7 ferrugem asiática da soja em casa-de-vegetação. Nas condições deste estudo,
8 apenas aplicações alternadas com o fungicida tiveram resultados superiores ao da
9 testemunha, mas inferiores aos das aplicações sequenciais de fungicidas e
10 produtividades iguais ao tratamento com aplicação sequencial.

11 Novos estudos devem ser realizados, principalmente em condições em que
12 a doença ocorra precocemente e com maior intensidade para observar o
13 comportamento dos produtos alternativos, principalmente do produto à base de
14 *Bacillus* que, nas condições deste trabalho, obteve um bom desempenho. Estudos
15 de Kawuki et al. (2004) mostraram que, em condições de baixa precipitação e
16 consequente baixa intensidade da doença, as perdas na produção ocasionadas
17 pela ferrugem asiática da soja foram de 10-15%, enquanto que na estação chuvosa
18 e de alta intensidade da doença, esses danos chegaram a 100%. O tratamento com
19 somente duas aplicações do fungicida ao longo do ciclo apresentou resultados
20 superiores ao da Testemunha e, apesar de ter apresentado resultados inferiores de
21 controle em relação a quatro aplicações do fungicida, manteve a mesma
22 produtividade com economia nas aplicações.

23 Os resultados evidenciam a necessidade de se realizar testes com outros
24 biofungicidas à base de *Bacillus* no manejo da ferrugem asiática da soja, pois
25 considerando os relatos de Godoy et al. (2015), bem como as informações de
26 Klappach (2017) pelo FRAC, a população de *Phakopsora pachyrhizi* está
27 gradualmente se tornando resistente aos principais fungicidas.

28 **Agradecimentos**

29 Dalton V. Dorighello e Wagner Bettiol agradecem a Coordenação de
30 Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES e ao Conselho Nacional
31 de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pelas bolsas de estudo. Os
32 autores agradecem Fábio Brandi, da Bayer Crop Science pela doação dos produtos
33 à base de *B. subtilis* e o fungicida. Também agradecem ao Dr. Nilson Maia, do IAC,

1 pela doação do óleo de café torrado. Ao Allan Flausino e ao Ângelo pelo auxílio na
2 condução dos experimentos.

3

4 Referências

- 5 Agrofit, 2017. Sistema de agrotóxicos fitossanitários do Ministério da Agricultura,
6 Pecuária e Abastecimento.
7 http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons (Acesso
8 em: 10/02/17)
- 9 Alvim, M.S., Juliatti, F.C., Alvim, J.R.M.G., Parreira, F.O.S., Silva, O. S., Juliatti,
10 B.C.M., Rezende, A.A., Martins, J.A.S., Sagata, E., 2009a. Avaliação de
11 fungicidas registrados no MAPA no controle da ferrugem da soja. Trop. Plant.
12 Pathol. 34, (Suplemento), S-84.
- 13 Alvim, M.S., Juliatti, F.C., Alvim, J.R.M.G., Parreira, F.O.S., Silva, O. S., Juliatti,
14 B.C.M., Rezende, A.A., Martins, J.A.S., Sagata, E., 2009b. Novos fungicidas no
15 controle da ferrugem na cultura da soja. Trop. Plant. Pathol. 34, (Suplemento),
16 S-98.
- 17 Avozani, A., Reis, E.M., Tonin, R.B., 2014. Sensitivity loss by *Corynespora*
18 *cassiicola*, isolated from soybean, to the fungicide carbendazim. Summa
19 phytopathol. 40, 273-276.
- 20 Baker, C. J., Stavely, J. R., Mock, N., 1985. Biocontrol of bean rust by *Bacillus*
21 *subtilis* under field conditions. Plant Dis. 69, 770-772.
- 22 Bettiol, W., Brandão, M.S.B., Saito, M.L., 1992. Controle da ferrugem do feijoeiro
23 com extratos e células formuladas de *Bacillus subtilis*. Summa Phytopathol. 18,
24 153-159.
- 25 Brum, R.B.C.S., Castro, G.C., Gama, F.R., Cardon, C.H., Santos, G.R., 2014.
26 Phytotoxicity of essential oils in watermelon, bean and rice plants. J. Biotec.
27 Biodivers. 5, 101-109.
- 28 Cabral, W.C., Diniz Campos, H., Costa, L.S.A.S., 2016. Simon, A. *In vitro*
29 susceptibility of *Corynespora cassiicola* isolate from Brazil fields to fungicide.
30 Afric. J. Agric. Res. 11, 1699-1711.
- 31 Campbell, C.L., Madden, L.V., 1990. Introduction to plant disease epidemiology.
32 Willey, New York. 532p.
- 33 Cawoy, H., Bettiol, W., Fickers, P., Ongena, M., 2011. Bacillus-based biological
34 control of plant diseases. In: Stoytcheva M., (Ed), Pesticides in the Modern
35 World – Pesticides Use and Management. Rijeka, Croatia: InTech; 2011. pp.
36 274–302

- 1 Conab, 2016. Companhia Nacional De Abastecimento. v. 3, Acompanhamento da
2 safra brasileira: safra 2015/2016. Publicação Online.
3 http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_06_09_16_49_15_bol
4 [etim_graos_junho__2016_-_final.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_06_09_16_49_15_bol). (Acesso em: 13/08/2016)
- 5 Dorighello D.V., Bettiol W., Maia N.B., de Campos Leite R. M. V. B., 2015.
6 Controlling Asian soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) with *Bacillus* spp. and
7 coffee oil. Crop Prot. 67, 59–65.
- 8 FRAC, 2010. (Fungicide Resistance Action Committee). Recommendations for
9 fungicide mixtures designed to delay resistance evolution. Publicação Online.
10 [http://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-recommendations-for-](http://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-recommendations-for-fungicide-mixtures/frac-recommendations-for-fungicide-mixtures---january-2010.pdf?sfvrsn=4)
11 [fungicide-mixtures/frac-recommendations-for-fungicide-mixtures---january-](http://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-recommendations-for-fungicide-mixtures/frac-recommendations-for-fungicide-mixtures---january-2010.pdf?sfvrsn=4)
12 [2010.pdf?sfvrsn=4](http://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-recommendations-for-fungicide-mixtures/frac-recommendations-for-fungicide-mixtures---january-2010.pdf?sfvrsn=4). (Acesso em: 15/10/2016)
- 13 Frac, M., Jezierska-Tys, S., 2010. Microbial diversity of soil environment. Post.
14 Mikrobiol. 49, 47-58.
- 15 Fousia, S., Paplomatas, E.J., Tjamos, S., 2016. *Bacillus subtilis* QST 713 confers
16 protection to tomato plants against *Pseudomonas syringae* pv *tomato* and
17 induces plant defence-related genes. J. Phytopathol. 164, 264-270.
- 18 Gao, X., Han, Q., Chen, Y., Qin H., Huang, L., Kang, Z., 2014. Biological control of
19 oilseed rape *Sclerotinia* stem rot by *Bacillus subtilis* strain Em7. Biocontrol Sci.
20 Technol. 24, 39-52.
- 21 Godoy, C.V., 2013. Eficiência de fungicidas para o controle da ferrugem-asiática
22 da soja, *Phakopsora pachyrhizi*, na safra 2012/13: resultados sumarizados dos
23 ensaios cooperativos. Circula técnica 99, Embrapa, Londrina – PR, Brasil, 7pp.
- 24 Godoy, C.V., 2014. Eficiência de fungicidas para o controle da ferrugem-asiática
25 da soja, *Phakopsora pachyrhizi*, na safra 2013/14: resultados sumarizados dos
26 ensaios cooperativos. Circula técnica 103, Embrapa, Londrina – PR, Brasil,
27 7pp..
- 28 Godoy, C.V., 2015. Eficiência de fungicidas para o controle da ferrugem-asiática
29 da soja, *Phakopsora pachyrhizi*, na safra 2014/15: resultados sumarizados dos
30 ensaios cooperativos. Circula técnica 111, Embrapa, Londrina – PR, Brasil,
31 7pp.
- 32 Godoy, C.V., 2016a. Eficiência de fungicidas para o controle da ferrugem-asiática
33 da soja, *Phakopsora pachyrhizi*, na safra 2015/16: resultados sumarizados dos
34 ensaios cooperativos. Circula técnica 119, Embrapa, Londrina – PR, Brasil, 6
35 pp.
- 36 Godoy, C.V., 2016b. Eficiência de fungicidas multissítios para o controle da
37 ferrugem-asiática da soja, *Phakopsora pachyrhizi*, na safra 2015/16: resultados
38 sumarizados dos ensaios cooperativos. Circula técnica 121, Embrapa, Londrina
39 – PR, Brasil, 7pp.

- 1 Godoy, C.V., Koga, L.J., Canteri, M.G., 2006. Diagrammatic scale for assessment
2 of soybean rust severity. *Fitopatol. Bras* 31, 63–68.
- 3 Goellner, K., Loehrer, M., Langenbach, C., Uwe Conrath, U., Kock, E.; Schaffrath,
4 U., 2010. *Phakopsora pachyrhizi*, the causal agent of Asian soybean rust. *Mol.*
5 *Plant Pathol.* 11, 169-177.
- 6 Guan, Q., Huang, W., Zhao, J., Liu, L., Liang, D., Huang, L., Wang, L., Yang, G.,
7 2014. Quantitative identification of yellow rust, powdery mildew and fertilizer
8 water stress in winter wheat using in-situ hyperspectral data. *Sens. Lett.* 12,
9 876-882.
- 10 Haddad, F., Maffia, L.A., Mizubuti, E.S.G., Teixeira, H., 2009. Biological control of
11 coffee rust by antagonistic bacteria under field conditions in Brazil. *Biol. Control.*
12 49, 114-119.
- 13 Henning, A.A. 2009 (*Glycine max* L. Merrill). *Informativo ABRATES.* 19, 9-12.
- 14 Hikishima, M., Canteri, M.G., Godoy, C.V., Koga, L.J., Silva, A.J., 2010.
15 Quantificação de danos e relações entre severidade, medidas de refletância e
16 produtividade no patossistema ferrugem asiática da soja. *Trop. Plant Pathol.*
17 35, 96-103.
- 18 Hui, L., Jhao, J., Feng, H., Huang, L. and Kang, Z., 2013. Biocontrol of wheat
19 stripe rust by an endophytic *Bacillus subtilis* strain E1R-j in green house and
20 field trials. *Crop Prot.* 43, 201-206.
- 21 Ibge, 2016. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Levantamento
22 Sistemático da Produção Agrícola. Publicação Online.
23 [http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/prevsaf/default.asp?t=1&z=t&o=26&u1=1&u2=](http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/prevsaf/default.asp?t=1&z=t&o=26&u1=1&u2=1&u3=1&u4=1)
24 [1&u3=1&u4=1](http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/prevsaf/default.asp?t=1&z=t&o=26&u1=1&u2=1&u3=1&u4=1). (Acesso em: 20/03/2016).
- 25 Jahagirdar, S., Patil, P.V., Benagi, V.I., 2012. Bio-formulations and indigenous
26 technology methods in the management of Asian soybean rust. *Int. J. Plant*
27 *Prot.* 5, 63-67.
- 28 Kawashima, C.G. et al., 2016. A pigeonpea gene confers resistance to Asian
29 soybean rust in soybean. *Nat. Biotechnol.* 34, p. 661-665.
- 30 Kawuki, R.S., Adipala, E., Tukamuhabwa, P., 2003. Yield loss associated with
31 soya bean rust (*Phakopsora pachyrhizi* Syd.) in Uganda. *J. Phytopathol.* 151, 7-
32 12.
- 33 Kinsella, K., Schulthess, C. P., Morris, T. M., and Stuart, J. D. 2009. Rapid
34 quantification of *Bacillus* antibiotics in the rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.*
35 41:374-379.
- 36 Klappach, K., 2017. Informativo 01/2017: Informação sobre carboxamidas em
37 ferrugem da soja. Publicação Online.
38 <http://www.fundacaomt.com.br/noticia/comunicado-importante-frac->

- 1 internacional-anuncia-oficialmente-mutacao-da-ferrugem-asiatica-no-brasil.
2 (Acesso em: 10/03/2017)
- 3 Kupper, K.C.; Gimenes-Fernandes, N.; Goes, A. de., 2003. Controle biológico de
4 *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos.
5 Fitopatol. Bras. 28, 251-257.
- 6 Langenbach, C., Campe, R., Beyer, S.F., Muller, A.N., Conrath U., 2016. Fighting
7 Asian soybean rust. Front. Plant Sci. 7, 797.
- 8 Leão, E.U., Silva, J.C., Medeiros, F.R., Macêdo, G.S.S.R., Adorian, G.C.,
9 Maringoni, A.C., 2016. Potencial in vitro de *Bacillus* spp. no controle de
10 *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em feijoeiro-comum. Summa
11 phytopathol. 42, 360-362.
- 12 Li, H., Zhao, J., Feng, H., Huang, L., Kang, Z. Li, H., 2013. Biological control of
13 wheat stripe rust by an endophytic *Bacillus subtilis* strain E1R-j in greenhouse
14 and field trials. Crop Prot. 43, 201-206.
- 15 Liu, M., Li, S., Swaminathan, S. Sahu, B.B., Leandro, F.L., Cardinal, A.J.,
16 Bhattacharyya, M., Song, Q., Walker, D.R. Cianzio, S.R., 2016. Identification of
17 a soybean rust resistance gene in PI 567104B. Theor. Appl. Genet. 129, 863-
18 877.
- 19 Machado, V., Berlitz, D.L., Matsumura, A.T.S., Santin, R.C.M., Guimarães, A.,
20 Silva, M.E., Fiuza, L.M., 2012. Bactérias como agentes de controle biológico de
21 fitonematóides. Oecol. Australis. 16, 165-182.
- 22 Mesquini, R.M., Schwan-Estrada, K.R.F., Vieira, R.A., Nascimento, J.F., 2011.
23 Controle e progresso temporal da ferrugem asiática da soja sob controle
24 alternativo em campo. Summa Phytopathol. 37, 24-29.
- 25 Mohamed, A., Hamza, A., Berbalah, A., 2016. Recent approaches for controlling
26 downy mildew of cucumber under greenhouse conditios. Plant Prot. Sci. 52, 1-
27 9.
- 28 Murithi, H.M., Beed, F., Tukamuhabwa, P., Thomma, B.P.H.J., Joosten, M.H.A.J.,
29 2016. Soybean production in eastern and southern Africa and threat of yield
30 loss due to soybean rust caused by *Phakopsora pachyrhizi*. Plant Pathol. 65,
31 176-188.
- 32 Ongena, M., Jacques, P., 2008. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant
33 disease biocontrol. Trends Microbiol. 16, 115-125.
- 34 Paul, C., Hartman, G.L., Wright, D.L., Walker, D.R., 2013. Adapting to soybean
35 genotypes with *Rpp1* or *Rpp6* rust resistance genes in field plots in the United
36 State. Plant Dis. 97, 1379.
- 37 Peng, D., Li, S., Wang, J., Chen, C., Zhou, M., 2014. Integrated biological and
38 chemical control of rice sheath blight by *Bacillus subtilis* NJ-18 and
39 jinggangmycin. Pest Manag. Sci. 70, 258-263.

- 1 Peng, G., Lahlali R., Hwang S., Pageau, D., Hynes, R. K., McDonald, M. R.,
2 Gossen, B. D., Strelkov, S. E., 2014. Crop rotation, cultivar resistance, and
3 fungicides/biofungicides for managing clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) on
4 canola. Can. J. Plant Pathol. 36, 99-112.
- 5 Reiss, A.; Jorgensen, L.N., 2017. Biological control of yellow rust of wheat (*Puccinia*
6 *striiformis*) with Serenade® ASO (*Bacillus subtilis* strain QST713). Crop Prot.
7 93, 1-8.
- 8 Restuccia, C., Giusino, F., Licciardello, F., Randazzo, C., Caggia, C., Muratore,
9 G., 2006. Biological control of peach fungal pathogens by commercial products
10 and indigenous yeasts. J. Food Prot. 69, 2465-2470.
- 11 Reunião...2010, Reunião de pesquisa de soja da região central do Brasil, 31.,
12 2010, Brasília, DF. Ata... Londrina: Embrapa, Londrina-PR, Brasil. Publicação
13 Online. http://www.cnpso.embrapa.br/download/Doc324_VE.pdf. (Acesso em:
14 08-03-2017).
- 15 Ritchie, S.W., Hanway, J.J., Thompson, H.E., Benson, G.O., 1985. How a
16 soybean plant develops. Ames, Iowa State University of Science and
17 Technology. 20p.
- 18 Santiago, R., Huiliñir, C., Cottet, L., Castillo, A., 2016. Microbiological
19 characterization for a new wild strain of *Paenibacillus polymyxa* with antifungal
20 activity against *Botrytis cinerea*. Biol. Control. 103, 251–260.
- 21 Silva, A.C.; Souza, P.E.; Amaral, D.C.; Zeviani, W.M.; Pinto, J.E.B.P., 2014.
22 Essential oils from *Hyptis marrubioides*, *Aloysia gratissima* and *Cordia*
23 *verbenacea* reduce the progress of Asian soybean rust. Acta Sci. Agron. 36,
24 159-166.
- 25 Silva, E.A., Silva, J.F.V., Monico, J.F.G., Hiromoto, D.M., 2000. Perspectivas no
26 manejo e controle localizado de doenças das culturas: uma abordagem no
27 manejo do nematóide do cisto da soja. In: Borém A (Ed.) Agricultura de
28 precisão. Viçosa MG. Universidade Federal de Viçosa. pp. 409-453.
- 29 Sinclair, J. B.; Hartman, G.L., 1999. Soybean rust. In: Hartman, G. L.; Sinclair, J.
30 B.; Rupe, J.C. (Ed.). Compendium of soybean diseases. 4^o ed. St. Paul:
31 American Phytopathological Society Press, p. 25-26.
- 32 Singh, V.K., Mathuria, R.C., Gogoi, R., Aggarwal, R., 2016. Impact of diferente
33 fungicides and bioagents, and fungicidal spray timing on wheat stripe rust
34 development and grain yield. Indian Phytopathol. 69, 357-362.
- 35 Standish, J.R., Tomaso-Peterson, M., Allen, T.W., Sabanadzovic, S., 2015.
36 Occurrence of QoI Fungicide Resistance in *Cercospora sojina* from Mississippi
37 Soybean. Plant Dis. 99, 1347-1352.
- 38 Tecnologias...2011. Tecnologias de produção de soja - Região Central do Brasil
39 2012 e 2013. Embrapa, Londrina-PR, Brasil, 264p.

- 1 Twizeyimana, M., Hartman, G.L., 2017. Sensitivity of *Phakopsora pachyrhizi*
2 isolates to fungicides and reduction infection based on fungicide and timing of
3 application. *Plant Dis.* 101, 121-128.
- 4 van Lenteren, J.C., Bolckmans, K., Kohl, J., Ravensberg, W.J., Urbaneja, A.,
5 2017. Biological control using invertebrates and microorganisms: plenty of new
6 opportunities. *BioControl*. DOI 10.1007/s10526-017-9801-4
- 7 Ward, N.A., Robertson, C.L., Chanda, A.K., Schneide, R.W., 2012. Effects of
8 *Simplicillium lanosoniveum* on *Phakopsora pachyrhizi*, the Soybean Rust
9 Pathogen, and Its Use as a Biological Control Agent. *Phytopathol.* 102, 749-
10 760.
- 11 Wei, F., Hu, X., Xu, X., 2016. Dispersal of *Bacillus subtilis* and its effect on
12 strawberry phyllosphere microbiota under open field and protection conditions.
13 *Sci. Rep.* 6, 22611.
- 14 Wu, K., Su, L. Fang, Z., Yuan, S., Wang, L., Shen, B., Shen, Q., 2017.
15 Competitive use of root exudates by *Bacillus amyloliquefaciens* with *Ralstonia*
16 *solanacearum* decreases the pathogenic population density and effectively
17 controls tomato bacterial wilt. *Sci. Hortic.* 218, 132-138.
- 18 Xavier, S.A., Canteri, M.G., Barros, D.C.M., Godoy, C.V., 2013. Sensitivity of
19 *Corynespora cassicola* from soybean to carbendazim and prothioconazole.
20 *Trop Plant Pathol.* 38, 431-435.
- 21 Xu, Z., Zhang, R., Wang, D., Qiu, M., Feng, H., Zhang, N., Shen, Q., 2014.
22 Enhanced control of cucumber wilt disease by *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9
23 by altering the regulation of its DegU phosphorylation. *App. Environ. Microbiol.*
24 80, 2941-2950.
- 25 Yorinori J.T., 2005. Epidemics of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Brazil
26 and Paraguay from 2001 to 2002. *Plant Dis.* 89, 675-677.
- 27 Yorinori, J. T., Lazzarotto, J. J., 2004. Situação da ferrugem asiática da soja no
28 Brasil e na América do Sul. Documentos 236, Embrapa, Londrina– PR, 27p.
- 29 Yorinori, J.T., Wilfrido, M.P., 2002. Ferrugem da soja: *Phakopsora pachyrhizi*
30 Sydow. Folder. Embrapa, Londrina– PR.
- 31 Yuen, G.Y., Steadman, J.R. Lindren, D.T., Schaff, D., Jochum, C., 2001. Bean rust
32 biological control using bacterial agents. *Crop Prot.* 20, 395-402.
- 33 Zhang, G., Pedersen, K.D., Phillips, D.V., Bradley, C.A., 2012. Sensitivity of
34 *Cercospora sojina* isolates to quinone outside inhibitor fungicides. *Crop Prot.*
35 40, 63-69.
- 36

- 1 Tabela 1: Esquema de aplicação dos produtos à base de *Bacillus subtilis* QST-713, óleo de café
 2 torrado e o fungicida comercial à base de Piraclostrobina + Epoxiconazol visando ao controle da
 3 ferrugem asiática da soja.

Tratamento	1ªAplicação	2ªAplicação	3ªAplicação	4ªAplicação
T1	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i>
T2	Óleo Café	Óleo Café	Óleo Café	Óleo Café
T3	Fungicida	Fungicida	Fungicida	Fungicida
T4	Fungicida	Água	Fungicida	Água
T5	<i>Bacillus</i>	Fungicida	<i>Bacillus</i>	Fungicida
T6	Fungicida	<i>Bacillus</i>	Fungicida	<i>Bacillus</i>
T7	Óleo Café	Fungicida	Óleo Café	Fungicida
T8	Fungicida	Óleo Café	Fungicida	Óleo Café
T9	Água	Fungicida	Água	Fungicida
T10	Testemunha	Testemunha	Testemunha	Testemunha

4

1 Tabela 2: Efeito da aplicação de produtos à base de *Bacillus subtilis* QST-713, óleo de café torrado e fungicida comercial (Piraclostrobina + Epoxiconazol)
 2 sobre a severidade da ferrugem da soja, área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), índice de vegetação por diferença normalizada (NDVI),
 3 peso de 100 sementes e produtividade no Campo Experimental 1, sob infestação de *Phakopsora pachyrizhi*.

Aplicações				Severidade (%)				AACPD	NDVI			Peso 100 sementes (g)	Produtividade (Kg.ha ⁻¹)
1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	1 ^o	2 ^o	3 ^o	4 ^o		1 ^o	2 ^o	3 ^o		
B	B	B	B	0,10 abc	4,38 b	12,35 b	33,33 b	234,2 b	0,73 a	0,71 a	0,62 ab	13,44 abc	2224,1 a
O	O	O	O	0,26 ab	2,41 bc	9,31 cd	43,13 a	233,9 b	0,73 a	0,68 bc	0,57 cd	11,97 bc	1642,9 c
F	F	F	F	0,04 c	1,61 c	8,52 d	17,15 e	131,2 e	0,73 a	0,71 a	0,63 a	14,94a	2260,0 a
F	A	F	A	0,13 abc	2,55 bc	12,12 bc	26,3 c	195,2 c	0,72 ab	0,69 ab	0,60 abc	13,04 abc	2110,9 ab
B	F	B	F	0,08 bc	2,31 bc	9,52 bcd	20,12 de	153,5 de	0,73 a	0,69 ab	0,60 abc	13,95 ab	2345,5 a
F	B	F	B	0,09 abc	3,39 bc	10,35 bcd	21,4 d	171,4 cd	0,72 ab	0,68 bc	0,63 a	14,00 ab	2263,3 a
O	F	O	F	0,13 abc	2,85 bc	9,9 bcd	26,65 c	183 cd	0,72 ab	0,68 bc	0,58 bcd	10,98 c	1769,8 bc
F	O	F	O	0,11 abc	2,15 bc	8,6 d	26,27 c	167,6 cd	0,72 ab	0,68 bc	0,57 cd	12,20 abc	2028,3 abc
A	F	A	F	0,11 abc	3,25 bc	10,85 bcd	27,7 c	196,1 c	0,71 ab	0,69 ab	0,54 de	12,60 abc	1951,2 abc
A	A	A	A	0,28 a	11,68 a	22,07 a	45,22 a	395,6 a	0,70 b	0,65 c	0,51 e	10,75c	1595,7 c
CV(%)				59,92	27,83	10,66	4,5	6,52	1,61	1,64	3,25	9,52	9,01

¹Médias seguidas por letras iguais, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey (0,05 probabilidade).

² B = *Bacillus subtilis* QST-713; O = Óleo de café torrado; F = Fungicida ((Piraclostrobina + Epoxiconazol- Ópera®); A = Água

4
5
6

1 Tabela 3: Efeito da aplicação de produtos à base de *Bacillus subtilis* QST-713, óleo de café torrado e fungicida comercial (Piraclostrobina + Epoxiconazol)
 2 sobre a severidade da ferrugem da soja, área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), índice de vegetação por diferença normalizada (NDVI),
 3 peso de 100 sementes e produtividade no Campo Experimental 2, sob infestação de *Phakopsora pachyrizhi*.

Aplicações				Severidade (%)				AACPD	NDVI			Peso 100 sementes (g)	Produtividade (Kg.ha ⁻¹)
1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	σ ₁	σ ₂	σ ₃	σ ₄		σ ₁	σ ₂	σ ₃		
B	B	B	B	0,29 b	3,4 c	12,75 e	30,1 de	219,42 d	0,71 a	0,63 ab	0,50 ab	12,69 a	2106,9 ab
O	O	O	O	0,75 a	7,75 b	19,6 b	47,12 b	359,55 b	0,66 b	0,57 cd	0,35 c	11,44 ab	1780,7 bc
F	F	F	F	0,05 c	1,5 d	8,4 f	20,95 f	142,81 e	0,71 a	0,66a	0,55 a	14,62 a	2279,7 a
F	A	F	A	0,21 bc	8,15 b	13,17 e	29,25 e	252,40 c	0,68 ab	0,61 abc	0,41 bc	12,87 a	2158,5 ab
B	F	B	F	0,16 bc	3,15 c	12,3 e	27,5 e	205,49 d	0,71 a	0,64 ab	0,48 abc	13,52 a	2172,8 ab
F	B	F	B	0,25 bc	3,25 c	9,02 f	20,8 f	159,63 e	0,71 a	0,65 ab	0,56 a	12,62 ab	2052,3 abc
O	F	O	F	0,81 a	2,4 cd	18,62 bc	33,1 cd	265,84 c	0,69 ab	0,59 bc	0,39 bc	11,5 ab	1836,6 abc
F	O	F	O	0,28 b	8,1 b	13,85 de	35,87 c	280,20 c	0,66 b	0,56 cd	0,40 bc	11,83 ab	1832,5 bc
A	F	A	F	0,92 a	3,7 c	16,47 cd	34,67 c	265,82 c	0,68 ab	0,60 abc	0,39 bc	12,55 ab	1932,3 abc
A	A	A	A	0,91 a	11,15 a	25,975 a	57,27 a	463,50 a	0,65 b	0,52 d	0,37 bc	9,38 b	1644,1 c
CV(%)				18,92	11,43	8,47	4,36	4,54	2,61	3,9	13,53	4,46	9,22

4 ¹ Médias seguidas por letras iguais, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey (0,05 probabilidade).

5 ²B = *Bacillus subtilis* QST 713; O = Óleo de café torrado; F = Fungicida (Opera®); A = Água.

6 Considerações finais

Os isolados de *Bacillus subtilis*, *B. firmus* e *B. amyloliquefaciens* demonstraram, em condições controladas, serem promissores agentes de biocontrole e devem, portanto, serem submetidos a testes em condições reais de ocorrência das doenças para verificar o real potencial para serem utilizados como biopesticidas.

Diversos isolados de *Bacillus* inibiram *Sclerotinia sclerotiorum* e promoveram o crescimento em plantas de soja, principalmente os isolados AP 51, AP 106, QST 2808, AP 117, AP 03, AP 25, QST 713 e AP 40, tanto com ou sem aplicação do inoculante.

Os resultados obtidos no campo permitem recomendar a utilização do produto à base de *B. subtilis* QST-713 para compor um programa de manejo da ferrugem asiática da soja em ciclos agrícolas em que as condições ambientais não permitam que a doença ocorra com alta intensidade.

Desta forma, a utilização de *Bacillus*, principalmente na cultura da soja, pode ser ampliada pela possibilidade destas bactérias serem aplicadas por tratamento de sementes visando a promoção de crescimento, bem como a proteção das sementes contra *S. sclerotiorum* e outros patógenos do solo. O rápido desenvolvimento inicial da cultura, mediado por isolados de *Bacillus*, pode trazer benefícios como o fechamento antecipado do dossel e a diminuição do período em que as plantas estão expostas a doenças, como a ferrugem da soja, em que o inóculo aumenta significativamente com o decorrer da safra.

Referências

- ABAG – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DO AGRONEGÓCIO. **O futuro da soja nacional**. 28 p. Disponível em: <<http://www.abag.com.br/media/images/0-futuro-da-soja-nacional---ieag---abag.pdf>>. Acesso em: 13 de janeiro de 2017.
- ABCSEM. Associação Brasileira do Comercio de Sementes e Mudás. Sementes e mudás. Pesquisa e análise do mercado nacional de sementes de hortaliças Disponível em: <<http://www.abcsem.com.br/sementes.php>>. Acesso em: 14 de outubro de 2016.
- ABDELZAHER, H. M. A. Biological control of using selected antagonistic rhizospheric strains of *Bacillus subtilis*. **New Zealand Journal Crop Horticultural Science**, Wellington, v. 31, n. 3, p. 209-220, Mar. 2003.
- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5 ed. Burlington: Elsevier Academic Press, 2005. 952 p.
- ALMEIDA, A. M. R.; BINNECK, E.; PIUGA, F. F.; MARIN, S. R. R.; VALLE, P. R. Z. R.; SILVEIRA, C. A. Characterization of powdery mildews strains from soybean, bean, sunflower, and weeds in Brazil using rDNA-ITS sequences. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 33, n. 1, p. 20-26, Jan-Fev. 2008.
- ARAUJO, F. F. D.; GUERREIRO, R. T. Bioprospection of *Bacillus* isolates promoters of corn growth in natural and sterile soil. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 4, p. 837-844, Jul-Aug. 2010.
- ARAÚJO, F. F.; HENNING, A. 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 and Biotechnology**, Berlin, v. 21, n. 8, p. 1639-1645, Dec. 2005.
- ASH, C.; FARROW, J.; WALLBANKS, S.; COLLINS, M. Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences. **Letters in applied microbiology**, Oxford, v. 13, n. 1, p. 202-206, Oct. 1991.
- BALAŽ, J.; ILICIC, R.; MASIREVIC, S.; JOSIC, D.; KOJIC, S. First report of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* causing bacterial leaf spots of oil pumpkin (*Cucurbita pepo*) in Serbia. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 100, n. 12, p. 2377-2382, May. 2016.

BALCAZAR, J. L.; ROJAS-LUNA, T. Inhibitory activity of probiotic *Bacillus subtilis* UTM 126 against *Vibrio* species confers protection against vibriosis in juvenile shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Current microbiology**, New York, v. 55, n. 5, p. 409-412, Aug. 2007.

BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Applied microbiology and biotechnology**, Boston, v. 53, n. 5, p. 495-508, May. 2000.

BARBOSA, F. R.; GONZAGA, A. C. de O. Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na região central-brasileira. Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás. **Documentos 272**. 247 p. May. 2012

BARBOSA, F. R.; SILVA, C. C.; GONZAGA, A. C.; SILVEIRA, P. M.; QUINTELA, E. D.; JÚNIOR, M. L.; COBUCCI, T.; PELOSO, M. J. D.; JUNQUEIRA, R. B. M. Sistema de Produção Integrada do Feijoeiro Comum na Região Central Brasileira. **Circular técnica**: Embrapa arroz e feijão, Santo Antônio de Goiás, v. 86, p. 1-28, 2009

BEDENDO, I.P. Manchas foliares. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Eds.). Manual de fitopatologia: princípios e conceitos. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v.1, p.849- 858

BIANCHINI, C. **Sistemas de manejo de solo para a produção de abobrinha de tronco (*Cucurbita pepo*)**. 2013, 62 p. (Mestrado). Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Programa de pós-graduação em Zootecnia, Dois Vizinhos.

BLACK, R. J. Complexo soja: fundamentos, situação atual e perspectivas. In: CÂMARA, G. M. S. **Soja: tecnologia da produção II**. Piracicaba: ESALQ, LPV, 2000. 18 p

BLUM, L. E. B.; REIS, E. F.; AMARANTE, C. V. T. Carbendazin, prochloraz, propiconazole and tebuconazole to control soybean powdery mildew. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v. 1, n. 1, p. 10-14, 2016.

BOLTON, M. D.; THOMMA, B. P. H. J.; NELSON, B.D. *Sclerotinia sclerotiorum*: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 7, n.1, p 1-16, Jan. 2006.

BONDE, M. R.; NESTER, S. E.; AUTIN, C. N.; STONE, C. L.; FREDERICK, R. D. HARTMAN, G. L.; Miles, M. R. Evaluation of virulence of *Phakopsora pachyrhizi* and *P. meibomia* isolates. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 90, n. 6, p. 708-716, 2006

BONETTI, L. P. Distribuição da soja no mundo: origem, história e distribuição. In:

MIYASAKA, S.; MEDINA, J. C. **A soja no Brasil**, Campinas, v. 1, n. 1, p. 1-6, 1981.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Gerência Geral de Toxicologia. Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) – relatório complementar relativo à segunda etapa das análises das amostras coletadas em 2012. Brasília, 2014. 33 p. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117818/Relat%25C3%25B3rio%25BPARA%25B2012%25B2%25C2%25AA%25B2etapa%25B-%25B17_10_14-Final.pdf/3bc220f9-8475-44ad-9d96-cbbc988e28fa>. Acesso em: 14 de abril de 2017.

BRESSO, E.; TOGAWA, R.; HAMMOND-KOSACK, K.; URBAN, M.; MAIGRET, B.; MARTINS, N. F. GPCRs from *Fusarium graminearum* detection, modelling and virtual screening-the search for new routes to control head blight disease. **BMC Bioinformatics**, London, v. 17, n. 18, p. 39, Dec. 2016.

CABRAL, W. C.; DINIZ CAMPOS, H.; COSTA, L. S. A. S.; SIMON, A. *In vitro* susceptibility of *Corynespora cassiicola* isolate from Brazil fields to fungicide. **African Journal of Agricultural Research**, Kenia, v. 11, n. 19, p. 1699-1711, May. 2016

CACCAMO, D.; GUGLIANDOLO, C.; STACKEBRANDT, E.; MAUGERI, T. L. *Bacillus vulcani* a novel thermophilic species isolated from a shallow marine hydrothermal vent. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 50, n. 6, p. 2009-2012, Nov. 2000.

CALVO, H.; MARCO, P.; BLANCO, D.; ORIA, R.; VENTURINI, M. E. Potential of a new strain of *Bacillus amyloliquefaciens* BUZ-14 as a biocontrol agent of postharvest fruit diseases. **Food Microbiology**, Cambridge, v. 63, p. 101-110, May. 2017.

CÂMARA, G. M. S. **Introdução ao Agronegócio Soja**. Piracicaba: ESALQ, LPV, 2012. 30 p

CARVALHO, D.; MELLO, S. C. M.; LOBO JÚNIOR, M.; SILVA, M. C. Controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* *in vitro* e em sementes, e promoção do crescimento inicial do feijoeiro comum por *Trichoderma harzianum*. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 36, n. 1, p. 28-34, Jan-Fev. 2011.

CASE, R. J.; BOUCHER, Y.; DAHLLÖF, I.; HOLMSTRÖM, C.; DOOLITTLE, W. F.; KJELLEBERG, S. Use of 16S rRNA and rpoB genes as molecular markers for microbial ecology studies. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington n. 73, v. 1, n. 1, p. 278-88, Oct. 2007

CAVALLET, L. E.; PESSOA, A. D. S.; HELMICH, J. J.; HELMICH, P. R.; OST, C. F. Produtividade do milho em resposta à aplicação de nitrogênio e inoculação das

sementes com *Azospirillum* spp. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 4, n. 1, p. 129-132, Jan-Apr. 2000.

CIANCIO, A.; PIETERSE, C. M.; MERCADO-BLANCO, J. Harnessing useful rhizosphere microorganisms for pathogen and pest biocontrol. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 7, n.1, p. 1-9, Oct. 2016.

CLEMENTE, J. M.; CARDOSO, C. R.; VIEIRA, B. S. E.; DA MATA FLOR, I.; COSTA, R. L. Use of *Bacillus* spp. as growth promoter in carrot crop. **African Journal of Agricultural Research**, Nairóbi, v. 11, n. 35, p. 3355-3359, Sep. 2016.

COHN, F. Untersuchungen über Bakterien. **Beitrage zur Biologie der Pflanzen Heft**, Berlin, v. 2, n. 1. p. 127-224, Jan. 1872.

CONAB. Acompanhamento da safra brasileira de grãos, v. 4- Safra 2015/16 - Quarto levantamento, Brasília, p. 1-154, janeiro 2016. ISSN 2318-6852. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_01_12_14_17_16_boletim_graos_janeiro_2016.pdf. Acesso em: 15 de abril de 2017

CONAB. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira**: grãos: safra 2015/2016. Brasília: CONAB, 2016. 174p. Disponível em http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_06_09_16_49_15_boletim_graos_junho_2016_-_final.pdf. Acesso em: 13 jan. 2016.

COSTA, J. G. C.; WENDLAND, A.; MELO, D.; OLIVEIRA, J. P.; ABREU, B. S. Reação à Antracnose de Variedades Tradicionais de Feijão-Comum com Grãos do Tipo Comercial Vermelho. Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**. 19 p. Ago. 2016.

DALLA PRIA, M.; SILVA, O. C. **Podridões radiculares e murcha de Fusarium**. In: Cultura do feijão: doenças e controle. Ponta Grossa: Editora UEPG, 2010, p. 107-116.

DANGL, J.L.; HORVATH, D. M.; STASKAWICZ, B. J. Pivoting the plant immune system from dissection to deployment. **Science**, Washington, v. 341, n. 6147, p. 746-751. Aug. 2013.

DOVRAT, D.; AHARONI, A. Bioengineering: Evolved to overcome Bt-toxin resistance. **Nature**, London, v.1, n.1, p.1-2, Apr. 2016.

EUZÉBY, J.P. **List of bacterial names with standing in nomenclature**: a folder available on the internet. Disponível em: <http://www.bacterio.net/bacillus.html>

Acesso em: 24 de jan. de 2017.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS.
Production: Crops. Roma, Itália. Disponível em: <<http://http://faostat.fao.org/site/567>>
Acesso em: 27 jan. de 2017

FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E. **Stages of soybean development**. Ames: State University of Science and Technology - Special Report 80, 1977. 11 p.

FREITAS, M. C. M. A cultura da soja no Brasil: o crescimento da produção brasileira e o surgimento de uma nova fronteira agrícola. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 7, n. 12, p. 1-12, 2011

FUKUSHI, Y. K. M. **Consortiação de abobrinha italiana e repolho: Plantas espontâneas, artrópodes associados e viabilidade econômica do sistema**. 2016. 78 p. (Mestrado). Universidade de Brasília, Programa de pós graduação em Agronomia, Brasília

FULMER, J. T.; WALLS, B. D.; PARKUNAN, J. B. First report of target spot caused by *Corynespora cassiicola* on cotton in Georgia. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 96, n. 7, Jul. 2012.

GAFNI, A.; CALDERON, C. E.; HARRIS, R.; BUXDORF, K.; DAFA-BERGE, A.; ZELLINGER-REICHERT, E.; LEVY, M. Biological control of the cucurbit powdery mildew pathogen *Podosphaera xanthii* by means of the epiphytic fungus *Pseudozyma aphidis* and parasitism as a mode of action. **Frontiers in plant science**, Lausanne, v. 6, n. 11. p. 132-141, Mar. 2015.

GENG, C.; NIE, X.; TANG, Z.; ZHANG, Y.; LIN, J.; SUN, M.; PENG, D. A novel serine protease, Sep1, from *Bacillus firmus* DS-1 has nematocidal activity and degrades multiple intestinal-associated nematode proteins. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-8, Apr. 2016.

GHOLAMI, M.; KHAKVAR, R.; ALIASGARZAD, N. Application of endophytic bacteria for controlling anthracnose disease (*Colletotrichum lindemuthianum*) on bean plants. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, Berlin, v. 46, n. 15, p. 1831-1838, 2013.

GODOY, C. V.; BUENO, A. F.; GAZZIERO, D. L. P. Gestão de pragas da soja brasileira e ameaças à sua sustentabilidade. **Outlooks on Pest Management**, Saffron Walden, v. 26, n. 10, p. 113-117, 2015.

GODOY, C. V.; UTIAMADA, C. M.; MEYER, M. C.; CAMPOS, H. D.; FORCELINI, C.

A.; PIMENTA, C. B.; BORGES, E. P.; ANDRADE JUNIOR, E. R. de; SIQUERI, F. V.; JULIATTI, F. C.; FAVERO, F.; FEKSA, H. R.; GRIGOLLI, J. F. J.; NUNES JUNIOR, J.; CARNEIRO, L. C.; SILVA, L. H. C. P.; SATO, L. N.; CANTERI, M. G.; VOLF, M. R.; DEBORTOLI, M. P.; GOUSSAIN, M.; MARTINS, M. C.; BALARDIN, R. S.; FURLAN, S. H.; MADALOSSO, T.; CARLIN, V. J.; VENANCIO, W. S. **Eficiência de fungicidas para o controle da ferrugem-asiática da soja, *Phakopsora pachyrhizi*, na safra 2014/15: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos.** Circular técnica 111, Londrina, PR, 2015. 6p

GOELLNER, K.; LOEHRER, M.; LANGENBACH, C.; UWE CONRATH, U. KOCK, E.; SCHAFFRATH, U. *Phakopsora pachyrhizi*, the causal agent of Asian soybean rust. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 11, p. 169-177, 2010.

GRIGOLLI, J. F. J. Manejo de Doenças na Cultura da Soja. In: LOURENÇÃO, A. L. F.; GRIGOLLI, J. F. J.; MELOTTO, A. M.; PITOL, C.; GITTI, D. C.; ROSCOE, R. **Tecnologia e produção**, Maracaju, v. 1, n. 1, p. 205-223, 2014.

GUPTA, R.; VAKHLU, J. Native *Bacillus amyloliquefaciens* W2 as a potential biocontrol for *Fusarium oxysporum* R1 causing corm rot of *Crocus sativus*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 143, n. 1, p. 123-131, Sep. 2015.

HARTMAN, G. L.; PAWLOWSHI, M. L.; HERMAN, T. K.; EASTBURN, D. Organically grown soybean production in the USA: constraints and management of pathogens and insect pestes. **Agronomy**, Basel, v. 6, n. 1, p. 1-16, Feb. 2016

HENNING, A. A. **Manejo de doenças da soja (*Glycine max* L. Merrill).** Informativo Abrates, v. 19, n. 3, p. 9-12, 2009.

HENRIQUE, F. H.; et al. Classification of physiological races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* in common bean. **Bragantia**, Campinas, v. 74, n. 1, p. 84-92, Jan-Mar. 2015.

HIRAKURI, M. H.; LAZAROTTO, J. J. **O agronegócio da soja nos contextos mundial e brasileiro.** Documentos / Embrapa Soja, 2014. 70 p.

HIRANO Y.; ARIE, T. Variation and phylogeny of *Fusarium oxysporum* isolates based on nucleotide sequences of polygalacturonase genes. **Microbes Environ**, Tagajo, v. 24, n. 2 p. 113-120. 2009

HOLL, F. B.; CHANWAY, C. P.; TURKINGTON, R.; RADLEY, R. A. Response of crested wheatgrass (*Agropyron cristatum* L.), perennial ryegrass (*Lolium perenne*) and white clover (*Trifolium repens* L.) to inoculation with *Bacillus polymyxa*. **Soil biology and biochemistry**, San Diego, v. 20, n. 1, p. 19-24, Dec. 1988.

HU, X.; ROBERTS, D. P.; XIE, L.; MAUL, J. E.; YU, C.; LI, Y., Y.; JIANG, M.; LIAO, X.; CHE, Z.; LIAO, X. Formulation of *Bacillus subtilis* BY-2 supress *Sclerotinia sclerotiorum* on oilseed rape in the field. **Biological Control**, San Diego, v. 70, p. 54-64, 2014.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**, 2016. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/prevsaf/default.asp?t=1&z=t&o=26&u1=1&u2=1&u3=1&u4=1>>. Acesso em: 20 mar. 2016

IGARASHI, S.; OLIVEIRA, G. M.; CAMARGO, L. C. M; FALKOSKI FILHO, J.; GARDIANO, C. G.; BALAN, M. G. Danos causados pela infecção de oídio em diferentes estádios fenológicos da soja. **Arquivo do Instituto Biológico de São Paulo**, São Paulo, v. 77, n. 2, p. 245-250, 2010.

Index fungorum. 2017. Disponível em: <<http://www.indexfungorum.org/names/NamesRecord.asp?RecordID=121037>>. Acesso em: 20 de fev. de 2017.

ISARD, S. A.; GAGE, S. H.; COMTJOIS, P.; RUSSO, J. M. Principles of the atmospheric pathway for invasive species applied to soybean rust. **BioScience**, Washington, v. 55, n. 10, p. 851-861, 2005.

ITO, M. F.. Principais doenças da cultura da soja e manejo integrado. **Nucleus**, Ituveraba, v. 10, n. 3, p. 83-91, Jun. 2013.

KÄMPFER, P.; BUSSE, H. J.; KLOEPPER, J. W.; HU, C. H.; MCINROY, J. A.; GLAESER, S. P. *Paenibacillus cucumis* sp. nov., isolated from a cucumber plant. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 66, n. 7, p. 2599-2603, Apr. 2016.

KÄMPFER, P.; BUSSE, H. J.; MCINROY, J. A.; GLAESER, S. P. *Bacillus gossypii* sp. nov., isolated from the stem of *Gossypium hirsutum*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 65, n. 11, p. 4163-4168, Nov. 2015.

KARIMIAN, B.; et al. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* isolates from common bean and distribution of mating type alleles. **Iranian Journal of Biotechnology**, Tehran, v. 8, n. 2, p. 90-97, 2010.

KOBORI, R. F.; BRUNELLI, K. R.; GIORIA, R. Impacto potencial das mudanças climáticas sobre as doenças da alface no Brasil. In: GHINI, R.; HAMADA, E. e BETTIOL, W. (Eds.). **Impacto das mudanças climáticas sobre doenças de importantes culturas no Brasil**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p. 129-144,

2011

KUROSAWA, C.; PAVAN, M. A.; REZENDE, J. A. M. Doenças das Cucurbitáceas. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de fitopatologia - Doenças da Plantas Cultivadas**. 4. ed. São Paulo, SP, Editora Agronômica Ceres, v. 2, 2005. 302 p.

LANGENBACH, C.; CAMPE, R.; BEYER, S. F.; MULLER, A. N.; CONRATH, U. Fighting Asian Soybean Rust. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 7, n. 1, Jun. 2016.

LEÓN, M.; YARYURA, P. M.; MONTECCHIA, M. S.; HERNÁNDEZ, A. I.; CORREA, O. S.; PUCHEU, N. L.; GARCÍA, A. F. Antifungal activity of selected indigenous *Pseudomonas* and *Bacillus* from the soybean rhizosphere. **International journal of microbiology**, v. 20, n.1, p. 1-10, Nov. 2009.

LIU, B.; QIAO, H.; HUANG, L.; BUCHENAUER, H.; HAN, Q.; KANG, Z.; GONG, Y. Biological control of take-all in wheat by endophytic *Bacillus subtilis* E1R-j and potential mode of action. **Biological Control**, San Diego, v. 49, n.3, p. 277-285, Jun. 2009.

LOGAN, N. A.; LEBBE, L.; HOSTE, B.; GORIS, J.; FORSYTH, G.; HEYNDRICKX, M.; MURRAY, B. L.; SYME, N.; WYNN-WILLIAMS, D. D.; DE VOS, P. Aerobic endospore-forming bacteria from geothermal environments in northern Victoria Land, Antarctica, and Candlemas Island, South Sandwich archipelago, with the proposal of *Bacillus fumarioli* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 50, n. 5, p. 1741-1753, Sep. 2000.

LU, X.; ZHOU, D.; CHEN, X.; ZHANG, J.; HUANG, H.; WEI, L. Isolation and characterization of *Bacillus altitudinis* JSCX-1 as a new potential biocontrol agent against *Phytophthora sojae* in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. **Plant and Soil**, New York, v. 413, n. 1, p. 1-14, Feb. 2017.

LUO, J. Y.; ZHANG, S.; PENG, J.; ZHU, X. Z.; LV, L. M.; WANG, C. Y.; CUI, J. J. Effects of Soil Salinity on the Expression of Bt Toxin (Cry1Ac) and the Control Efficiency of *Helicoverpa armigera* in Field-Grown Transgenic Bt Cotton. **PloS one**, San Francisco, v. 12, n. 1, p. 1-13, Jan. 2017.

MADIGAN, M.; JOHN, M.; KELLY B.; DANIEL, B.; DAVID, S. **Microbiologia de Brock**, 14° ed.. Porto Alegre: Artmed, 2016. 960 p.

MANJUNATH, B.; FITSUM, S.; SELVARAJ, T.; MULUGETA, N. Integrated management of anthracnose of field bean caused by *Colletotrichum lindemuthianum*. **Environment and Ecology**, Bethesda, v. 34, n. 3, p. 1013-1017, Mar. 2016.

MCCREARY, C. M.; DEPUYDT, D.; VYN, R. J.; GILLARD, C.L. Fungicide efficacy of dry bean white mold [*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, causal organism] and economic analysis at moderate to high disease pressure. **Crop Protection**, Guildford, v. 82, p. 75-81, Apr. 2016.

MCGRATH, M. T.; SHISHKOFF, N. First report of the cucurbit powdery mildew fungus (*Podosphaera xanthii*) resistant to strobilurin fungicides in the United States. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 87, n. 8, p. 1007-1007, Aug. 2003.

MESQUINI, R. M. **Componentes monocíclicos e quantificação de danos no patossistema *Corynespora cassiicola***. 2012. 92 p. (Dissertação de Mestrado). Universidade de São Paulo (USP). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba

MEYER, M.C.; CAMPOS, H.D.; GODOY, C.V.; UTIAMADA, C.M. (Ed.). Ensaio cooperativos de controle biológico de mofo branco na cultura da soja - safras 2012 a 2015. Londrina: Embrapa Soja, 2016. 46 p. (Embrapa Soja, Documentos, 368).

MIGNUCCI, J. S.; CAHMBERLAIN, D. W. Interactions of *Microsphaera diffusa* with soybeans and other legumes. **Phytopathology**, Lancaster, v. 68, p. 169-173, 1978.

MIRANDA, C. A.; MARTINS, O. B.; CLEMENTINO, M. M. Species-level identification of *Bacillus* strains isolates from marine sediments by conventional biochemical, 16S rRNA gene sequencing and inter-tRNA gene sequence lengths analysis. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 93, n. 3, p. 297-304, Mar. 2008.

MISSÃO, M. R. Soja: origem, classificação, utilização e uma visão abrangente do mercado. **Maringá Management: Revista de Ciências Empresariais**, Maringá, v. 3, n.1, p. 7-15, 2006.

MOHAGHEGH, P.; MOHAMMADKHANI, A.; FADAEI, A. Effects of Silicon on the growth, ion distribution and physiological mechanisms that alleviate oxidative stress induced by powdery mildew infection in pumpkin (*Cucurbita pepo*, var. Styriac). **Journal of Crop Protection**, Tehran, v. 4, n. 3, p. 419-429, Sep. 2015.

MOHITE, B. Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. **Journal of soil science and plant nutrition**, Tokyo, v. 13, n. 3, p. 638-649, Set. 2013.

NARAYANAN, P.; VANITHA, S.; RAJALAKSHMI, J.; PARTHASARATHY, S.; ARUNKUMAR, K.; NAGENDRAN, K.; KARTHKEYAN, G. Efficacy of Bio-Control Agents and Fungicides in Management of Mulberry Wilt Caused by *Fusarium solani*. **Journal of Biological Control**, San Diego, v. 29, n. 2, p. 107-114, Jun. 2015.

NIELSEN, P.; RAINEY, F. A.; OUTTRUP, H.; PRIEST, F. G.; FRITZE, D. Comparative 16S rDNA sequence analysis of some alkaliphilic bacilli and the establishment of a sixth rRNA group within the genus *Bacillus*. **Federation of European Microbiological Societies**, Amsterdam, v.117, n. 1, p. 61-65, Mar. 1994.

PALAZZINI, J. M.; DUNLAP, C. A.; BOWMAN, M. J.; CHULZE, S. N. *Bacillus velezensis* RC 218 as a biocontrol agent to reduce *Fusarium* head blight and deoxynivalenol accumulation: Genome sequencing and secondary metabolite cluster profiles. **Microbiological Research**, London, v. 192, n. 1, p. 30-36, Nov. 2016.

PÉREZ-GARCÍA, A.; ROMERO, R.; FERNÁNDEZ-ORTUÑO, D.; LÓPEZ RUIZ, F.; VICENTE, A.; TORÉS, J.A. The powdery mildew fungus *Podosphaera fusca* (synonym *Podosphaera xanthii*), a constant threat to cucurbits. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 10, n.2, p. 153-160, Mar. 2009.

PERNEZNY, K.; SIMONE, G. W. **Target spot of several vegetable crops**. University of Florida, 1993. Disponível em: < <http://edis.ifas.ufl.edu/pdf/FILES/VH/VH05200.pdf> >. Acesso em: 26 de fev. 2015.

PIRONDI, A.; NANNI, I. M.; BRUNELLI, A.; COLLINA, M. First report of resistance to cyflufenamid in *Podosphaera xanthii*, causal agent of powdery mildew, from melon and zucchini fields in Italy. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 100, n. 1, p. 10-24, Nov. 2016.

PRIOR, R.; MITTELBAACH, M.; BEGEROW, D. Impact of three different fungicides on fungal epi-and endophytic communities of common bean (*Phaseolus vulgaris*) and broad bean (*Vicia faba*). **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, New York, v. 3, n. 10, p. 1-11, Mar. 2017.

QIAO, Y.; LIU, L.; XIONG, Q.; FLORES, C.; WONG, J.; SHI, J.; ZHANG, F. Oomycete pathogens encode RNA silencing suppressors. **Nature genetics**, London, v. 45, n. 3, p. 330-333, Feb. 2013.

QUINTANA-RODRIGUEZ, E.; MORALES-VARGAS, A.; MOLINA-TORRES, J.; ÁDAME-ALVAREZ, R. M.; ACOSTA-GALLEGOS, J. A.; HEIL, M. et al. Plant volatiles cause direct, induced and associational resistance in common bean to the fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. **Journal of Ecology**, Seoul, v. 103, n. 1, p. 250-260, Nov. 2015.

RAO, M. S.; KAMALNATH, M.; UMAMAHESWARI, R.; RAJINIKANTH, R.; PRABU, P.; PRITI, K.; GOPALAKRISHNAN, C. *Bacillus subtilis* IHR BS-2 enriched vermicompost controls root knot nematode and soft rot disease complex in carrot. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 218, n. 1, p. 56-62, Apr. 2017.

REIS, E. M.; BRESOLIN, A. C. R.; CARMONA, M. **Doenças da soja: Ferrugem-asiática**. Passo Fundo: Ed. Universidade de Passo Fundo, 2006. 48 p

RIJAVEC, T.; LAPANJE, A.; DERMASTIA, M.; RUPNIK, M. Isolation of bacterial endophytes from germinated maize kernels. **Canadian journal of microbiology**, Ottawa, v. 53, n. 6, p. 802-808, Jun. 2007.

ROCHA, D. A.; MOURA, A. B. Controle biológico da murcha do tomateiro causada por *Ralstonia solanacearum* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* por rizobactérias. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 38, n. 5, p. 423-430, Sep-Oct. 2013.

RODRÍGUEZ, M.A.; ROTHEN, C.; LO, T.E.; CABRERA, G.M.; GODEAS, A.M. Suppressive soil against *Sclerotinia sclerotiorum* as a source of potential biocontrol agents: selection and evaluation of *Clonostachys rosea* BAFC1646. **Biocontrol science and technology**, Abingdon, v. 25, n. 41, p. 1388-1409, May. 2015.

ROY, K.W. *Fusarium solani* on soybean roots: nomenclature of the causal agente of sudden death syndrome and identity and relevance of *F. solani* form B. **Plant Disease**, Saint Paul, v.81, p. 259-266, Jul. 1997.

SCHISLER, D. A.; SLININGER, P. J.; BEHLE, R. W.; JACKSON, M. A. Formulation of *Bacillus* spp. for biological control of plant diseases. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 94, n. 11, p. 1267-1271, Nov. 2004.

SCHNEIDER, R.W.; HOLLIER, C. A.; WHITMAN, H. K. First report of soybean rust caused by *Phakopsora pachyrhizi* in the continental United States. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 89, n. 7, p. 773-779, 2005.

SEDIYAMA, T.; PEREIRA, M. G.; SEDIYAMA, C. S. Cultura da Soja. Viçosa Universidade, 1985. In: **Tecnologias de produção de soja – região central do Brasil 2007**. Embrapa Soja, Londrina, PR, 2007. 50 p.

SENTHILKUMAR, M.; SWARNALAKSHMI, K.; GOVINDASAMY, V.; LEE, Y. K.; ANNAPURNA, K. Biocontrol potential of soybean bacterial endophytes against charcoal rot fungus, *Rhizoctonia bataticola*. **Current microbiology**, New York, v. 58, n. 4, p. 288-293, Apr. 2009.

SHAFI, J.; TIAN, H.; JI, M. *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, Abingdon, v. 1, n. 1, p. 446-459, Apr. 2017.

SHUIB, S. S.; DEON, M.; MAHYUDDIN, M. M.; IZHAR, A.; FUMANAL, B.;

SUNDERASAN, E.; PAJUDE-RENAUD, V. Cassicolin genes among *Corynespora cassicola* isolates from rubber plantations in Malaysia. **Journal Rubber Research**, Sri Lanka, v. 18, n. 2, p. 109-126. Jul. 2015

SIEFERT, J. L.; LARIOS-SANZ, M.; NAKAMURA, L. K.; SLEPECKY, R. A.; PAUL, J. H.; MOORE, E. R.; FOX, G. E.; JURTSCHUK, P. JR. Phylogeny of marine *Bacillus* isolates from the Gulf of Mexico. **Current Microbiology**, New York 41, n. 2, p. 84-88, Aug. 2000.

SIEROTZKI, H.; SCALLIET, G. A review of current knowledge of resistance aspects for the next-generation succinate dehydrogenase inhibitor fungicides. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 103, n. 9, p. 880-887, Sep. 2013.

SILVA A. C.; DE SOUZA P. E.; AMARAL D. C.; ZEVIANI W. M.; PINTO J. E. B. P. Essential oils from *Hyptis marrubioides*, *Aloysia gratissima* and *Cordia verbenacea* reduce the progress of Asian soybean rust. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 36, n. 2, p. 159-166, 2014.

SILVA, O. C.; SEGANFREDO R. Quantificação de danos ocasionados por doenças de final de ciclo e oídio, em duas variedades de soja. In: Congresso brasileiro de soja, Embrapa Soja, **Anais**, Londrina, PR, 1999. 460 p.

SILVA, O. F.; WANDER, A. E. O feijão-comum no Brasil passado, presente e futuro. Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás. **Documentos 287**. 63 p. Jun. 2013.

SIMMONS, H. E. et al. Transgenic virus resistance in crop-wild *Cucurbita pepo* does not prevent vertical transmission of *Zucchini yellow mosaic virus*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 99, n. 11, p. 1616-1621, Nov. 2015.

SINCLAIR, J. B.; HARTMAN, G. L. Soybean rust. In: HARTMAN, G. L.; SINCLAIR, J. B.; RUPE, J. C. **Compendium of soybean diseases**, Saint Paul, American Phytopathological Society, 1999. 26 p.

SOROKULOVA, I. B.; PINCHUK, I. V.; DENAYROLLES, M.; OSIPOVA, I. G.; HUANG J. M.; CUTTING, S. M.; URDACI, M. C. The safety of two *Bacillus* probiotic strains for human use. **Digestive Diseases and Sciences**, New York, v. 53, n.4, p. 954-963, Apr. 2008.

SOUSA, V. M.; SIQUEIRA, C. S.; MACHADO, J. C. Conventional PCR for detection of *Corynespora cassicola* in soybean seeds. **Journal Seed Science**, Londrina, v. 38, n. 2, p. 85-91, 2016.

SOUZA, J. L. de; RESENDE, P. **Manual de Horticultura Orgânica**, 2 ed. Viçosa: Editora Aprenda Fácil, 2011. 843 p.

STEADMAN, J. R.; NICKERSON, K. W. Differential inhibition of sclerotial germination in *Whetzelinia sclerotiorum*. **Micopathologia**, Dordrecht, v. 57, p. 165-170, Dec. 1975.

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

TERAMOTO, A.; MACHADO, T. A.; SANTOS, L. M.; VOLF, M. R.; MEYER, M. C.; CUNHA, M. G. Reação de cultivares de soja à *Corynespora cassicola*. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 38, n. 1, p. 68-71, 2013.

TONGON, R.; KASEN, S. Fungal metabolites from *Chaetomium brasiliense* to inhibit *Fusarium solani*. **Journal of Agricultural Technology**, Delhi, v. 12, n. 7, p. 1465-1474, 2016.

TORRES, M. J.; BRANDAN, C. P.; SABATÉ, D. C.; PETROSELLI, G.; ERRA-BALSELLS, R.; AUDISIO, M. C. Biological activity of the lipopeptide-producing *Bacillus amyloliquefaciens* PGPBacCA1 on common bean *Phaseolus vulgaris* L. pathogens. **Biological Control**, San Diego, v. 105, p. 93-99, Feb. 2017.

VENTURINI, M. T.; SANTOS, L. C.; SANTO, T. C.; LUZ, E. D. M. N. L. Infecção natural por *Corynespora cassicola* em acessos de mamoeiro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 40, n. 3, p. 284-287, 2014.

WANG, J.; ZHANG, H.; WANG, H.; ZHAO, S.; ZUO, Y.; YANG, Y.; WU, Y. Functional validation of cadherin as a receptor of Bt toxin Cry1Ac in *Helicoverpa armigera* utilizing the CRISPR/Cas9 system. **Insect biochemistry and molecular biology**, Amsterdam, v. 76, p. 11-17, Sep. 2016.

WRATHER, J. A.; ANDERSON, T. R.; ARSYAD, D. M.; TAN, Y.; PLOPER, L. D.; PORTA-PUGLIA, A.; YORINORI, J. T. Soybean disease loss estimates for the top ten soybean-producing countries in 1998. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v. 23, n. 2, p. 115-121, 2001.

XAVIER, S.A.; CANTERI, M.G.; BARROS, D.C.M.; GODOY, C.V. Sensitivity of *Corynespora cassicola* from soybean to carbendazim and prothioconazole. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 38, n. 5, p. 431-435, 2013.

XING, L. J.; WESTPHAL, A. Interaction of *fusarium solani* f. sp. *glycines* and *Heterodera glycines* in sudden death syndrome of soybean. **Phytopathology**, Saint

Paul, v. 96, n. 7, p. 763-770, Abr. 2006.

XUE, R. F.; WU, J.; WANG, L. F.; BLAIR, M. W.; WANG, X. M.; REN, F. Salicylic acid enhances resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 33, n. 2, p. 470-476, Nov. 2014.

YORINORI, J. T. **Comunicado Técnico, 59 - Oídio da Soja**. EMBRAPA-CNPQSO, Londrina, PR, 1997. 5 p.

YORINORI, J. T.; LAZZAROTTO, J. J. **Situação da ferrugem asiática da soja no Brasil e na América do Sul**. Londrina: Embrapa Soja. (Documentos, 236), 2004. 27 p.

YORINORI, J.T. Podridão vermelha da raiz da soja (SDS) (*Fusarium solani* f. p. *glycines*) no Brasil e sua importância econômica. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 23, p. 298-299, 1998.

YORINORI, K. M.; PAIVA, W. M.; YAMAOKA, Y.; ALMEIDA, A, M. R. Epidemiological studies of soybean rust in South America: host susceptibility and pathogenic races. In: SUENAGA, K.; KUDO, H.; OSHIO, S. *Comprehensive Studies on the Development of Sustainable Soybean Production Technology in South America*. **JIRCAS**, Tsukuba, v. 1, n. 1, p. 35-46, 2007.

YOSHIKAWA, M.; HIRAI, N.; WAKABAYASHI, K.; SUGIZAKI, H.; IWAMURA, H. Succinic and lactic acids as plant growth promoting compounds produced by rhizospheric *Pseudomonas putida*. **Canadian journal of microbiology**, Ottawa, v. 39, n. 12, p. 1150-1154, Feb. 1993.

YOU, Z. Q.; LI, J.; QIN, S.; TIAN, X. P.; WANG, F. Z.; ZHANG, S.; LI W.J. *Bacillus abyssalis* sp. nov., isolated from a sediment of the South China Sea. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 103, n. 5, May. 2013

ZATARIM, M.; CARDOSO, A.I.I.; FURTADO, E.L. Efeito de tipos de leite sobre oídio em abóbora plantadas a campo. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.23, n.2, p.198-201, Abr-Jun, 2005.

ZHANG, C.; REN, Y.; GUO, S.; HAIYING ZHANG, H.; GONG, G.; DU, Y.; XU, Y. Application of comparative genomics in developing markers tightly linked to the Pm-2F gene for powdery mildew resistance in melon (*Cucumis melo* L.). **Euphytica**, Dordrecht, v. 181, n. 2, p. 157-168, Apr. 2012.

ZHANG, F.; GE, H.; ZHANG, FAN.; GUO, N.; WANG, Y.; CHEN, L.; JI, X., LI; C.

Biocontrol potential of *Trichoderma harzianum* isolate T-alo against *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. **Journal of plant biochemistry e physiology**, Los Angeles, v. 100, n. 32, p. 64-74, Mar. 2016

ZHANG, J. X.; XUE, A. G.; ZHANG, J. X.; XUE, A. G. Biocontrol of sclerotinia stem rot (*Sclerotinia sclerotiorum*) of soybean using novel *Bacillus subtilis* strain SB24 under control conditions. **Plant pathology**, New York, v. 59, n. 2, p. 382-391, Dec. 2010.

ZHANG, J.; LI, Y.; YUAN, H.; SUN, B.; LI, H. Biological control of the cereal cyst nematode (*Heterodera filipjevi*) by *Achromobacter xylosoxidans* isolate 09X01 and *Bacillus cereus* isolate 09B18. **Biological Control**, San Diego, v. 92, p. 1-6, Jan. 2016

ZHOU, F.; ZHU, F. X.; ZHANG, X. L.; ZHANG, A. S. First report of dimethachlon resistance in field isolates of *Sclerotinia sclerotiorum* on oilseed rape in Shaanxi province of northwestern China. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 98, n. 4, p. 568, 2017.