

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS  
CAMPUS DE BOTUCATU

**CONTROLE DA FERRUGEM ASIÁTICA DA SOJA (*Phakopsora pachyrhizi*) COM  
ÓLEO DE CAFÉ E *Bacillus* spp.**

**DALTON VINICIO DORIGHELLO**

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Ciências Agronômicas da UNESP – Campus  
de Botucatu, para obtenção do título de  
Mestre em Agronomia (Proteção de Plantas).

BOTUCATU-SP

Agosto – 2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS  
CAMPUS DE BOTUCATU

**CONTROLE DA FERRUGEM ASIÁTICA DA SOJA (*Phakopsora pachyrhizi*) COM  
ÓLEO DE CAFÉ E *Bacillus* spp.**

**DALTON VINICIO DORIGHELLO**

Orientador: Dr. Wagner Bettiol

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Ciências Agronômicas da UNESP – Campus  
de Botucatu, para obtenção do título de  
Mestre em Agronomia (Proteção de Plantas).

BOTUCATU-SP

Agosto – 2013

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

D697c Dorighello, Dalton Vinicio, 1985-  
Controle da ferrugem asiática da soja (*Phakopsora pachyrhizi*) com óleo de café e *Bacillus* spp. / Dalton Vinicio Dorighello. - Botucatu : [s.n.], 2013  
vi, 45 f. : tabs., grafs., fots. color.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu, 2013  
Orientador: Wagner Bettiol  
Inclui bibliografia

1. Ferrugem asiática - Controle biológico. 2. Ferrugem da soja (Doença). 3. Soja - Doenças e pragas. 4. Óleo de café. 5. *Bacillus*. I. Bettiol, Wagner. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agronômicas. III. Título.

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

TÍTULO: "CONTROLE DA FERRUGEM ASIÁTICA DA SOJA (*Phakopsora  
pachyrhizi*) COM ÓLEO DE CAFÉ E *Bacillus* spp."

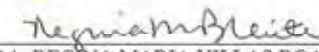
ALUNO: DALTON VINICIO DORIGHELLO

ORIENTADOR: PROF. DR. WAGNER BETTIOL

APROVADO PELA COMISSÃO EXAMINADORA:

  
\_\_\_\_\_  
PROF. DR. WAGNER BETTIOL

  
\_\_\_\_\_  
PROF. DR. ANTONIO CARLOS MARINGONI

  
\_\_\_\_\_  
PROFA. DRA. REGINA MARIA VILLAS BOAS DE C. LEITE

Data da Realização: 02 de agosto de 2013.

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais, Vinicio Dorighello e Ivani Luvizotto Dorighello, pela dedicação e incentivo.

Às minhas irmãs e cunhados: Cristiane e Campi; Tatiane e Júlio.

À Mariana Modanez, pela paciência, pelo incentivo, pela força e, principalmente, pelo carinho.

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

Ao Vicente Ferreira.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pois sem Ele nada é possível.

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

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

Ao Dr. Wagner Bettiol, pela orientação e confiança na realização deste trabalho.

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

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

Ao Vitório Ferraz, Maryara Prando e Moacir Montila da Ihara e Fabio Brandi da AgraQuest, pelos materiais cedidos.

Ao Nilson Molina Maia do IAC (Instituto Agronômico de Campinas) pela extração e fornecimento dos óleos de café.

Aos professores do Programa de 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.

Aos companheiros de república: Cassiano, Carlos Eduardo, Daniel, Lúcio e Renato, pelo companheirismo e ajuda nos trabalhos.

Aos amigos de curso e trabalho: Zayame, Abrahão, Regiane, Michelle, Evelynne, Miriam, Wilson Dourado, Leonardo Barbosa, Mikael, Luana, André 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, Diego, Sheila e Tia Alda, pelos bons momentos e ajuda na condução do trabalho à campo.

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

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>IV</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>V</b>
<b>1 RESUMO.....</b>	<b>1</b>
<b>2 SUMMARY.....</b>	<b>3</b>
<b>3 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>5</b>
<b>4 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>7</b>
4.1 A cultura da soja e o cultivo no Brasil.....	7
4.2 Ferrugem asiática da soja.....	9
4.3 Controle alternativo de ferrugens .....	12
<b>5 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>15</b>
5.1 Origem e manutenção do inóculo.....	15
5.2 Produtos alternativos avaliados.....	15
5.3 Germinação de uredósporos.....	17
5.4 Avaliação da eficiência em folhas destacadas .....	18
5.5 Avaliação de eficiência em condições de casa de vegetação.....	19
5.6 Avaliação da eficiência em condições de campo .....	20
5.7 Análise estatística .....	21
<b>6 RESULTADOS .....</b>	<b>22</b>
6.1 Germinação de uredósporos.....	22
6.2 Avaliação da eficiência em folhas destacadas .....	22
6.3 Avaliação da eficiência em condições de casa de vegetação.....	25
6.4 Avaliação da eficiência em condições de campo .....	28
<b>7 DISCUSSÃO.....</b>	<b>31</b>
<b>8 CONCLUSÃO.....</b>	<b>36</b>
<b>9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>37</b>

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Código atribuído, ingrediente ativo, nome comercial, empresa e concentração aplicada dos produtos avaliados.....	15
--	----



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Unifólios de plantas de soja dispostos na Placa de Petri com papel filtro saturado de água.....	17
Figura 2. Plantas infestadas com ferrugem asiática da soja (a); Sistema de aspersão controlado (b) e (c); e vista do ensaio, plantas infestadas e tratadas (d).....	19
Figura 3. Campo da cultivar BRS 316 RR com parcelas demarcadas.....	20
Figura 4. Efeito dos isolados de <i>Bacillus</i> na porcentagem de inibição da germinação dos uredósporos de <i>Phakopsora pachyrhizi</i> .....	23
Figura 5. Efeito dos óleos de café, torrado e cru, na porcentagem de inibição da germinação dos uredósporos de <i>Phakopsora pachyrhizi</i> .....	23
Figura 6. Efeito dos isolados de <i>Bacillus</i> na severidade de <i>Phakopsora pachyrhizi</i> em folhas destacadas.....	24
Figura 7. Efeito dos óleos de café, cru e torrado, isolados e em mistura com o fungicida na severidade de <i>Phakopsora pachyrhizi</i> em folhas destacadas.....	25
Figura 8. Efeito dos isolados de <i>Bacillus</i> na área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em condições de casa de vegetação.....	26
Figura 9. Efeito dos isolados de <i>Bacillus</i> na porcentagem de desfolha causada por <i>Phakopsora pachyrhizi</i> em condições de casa de vegetação.....	27
Figura 10. Efeito dos óleos de café, cru e torrado, isolados e em mistura com o fungicida, na área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em casa de vegetação.....	28
Figura 11. Efeito dos óleos de café, cru e torrado, isolados e em mistura com o fungicida na porcentagem de desfolha causada por <i>Phakopsora pachyrhizi</i> em casa de vegetação.....	29
Figura 12. Efeito dos isolados de <i>Bacillus</i> e do óleo de café torrado na área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em condições de campo.....	30

Figura 13. Efeito dos isolados de <i>Bacillus</i> e do óleo de café torrado na desfolha causada por <i>Phakopsora pachyrhizi</i> em condições de campo.....	31
---	----

## 1 RESUMO

A ferrugem asiática da soja, causada por *Phakopsora pachyrhizi*, se transformou na principal doença da cultura após a sua introdução no Brasil, em 2001. O controle é realizado, principalmente, com fungicidas químicos. Com relatos de populações do patógeno resistentes a estas moléculas, bem como de impactos negativos ao ambiente e a saúde pública, é necessário que novos métodos de controle sejam desenvolvidos. Entre esses, a utilização de agentes de biocontrole e produtos de origem vegetal surgem como potenciais ferramentas para o manejo da doença. O presente trabalho objetivou avaliar a eficiência de *Bacillus subtilis* – QST 713 (Serenade®), *Bacillus pumilus* – QST 2808 (Sonata®); *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* (Nemix®), bem como cada isolado desse produto individualmente; isolados AP-3 e AP-51 de *Bacillus subtilis*; óleo de café obtidos de grãos torrados (CT) e crus (CC), nas concentrações de 1% e 2% e nas concentrações de 0,5% e 1% em mistura com metade da concentração do fungicida à base de pyraclostrobin e epoxiconazol (Ópera®); além da testemunha (água) e do fungicida, na concentração recomendada e metade dessa concentração, sobre a germinação de uredósporos do patógeno e no controle da ferrugem asiática em folhas destacadas e plantas cultivadas em condições de casa-de-vegetação e campo. Todos os ensaios foram conduzidos duas vezes, exceto nas condições de campo, com a cultivar BRS316RR. Os isolados de *B. subtilis* QST 713 e AP-3 e *B. pumilus* reduziram significativamente a germinação dos uredósporos, assim como os óleos de café torrado e cru. Nos ensaios com folhas destacadas e em casa de vegetação a inoculação do patógeno foi feita de forma artificial. Os isolados de *B.*

*subtilis* (QST 713, AP-3 e AP-51) e o isolado de *B. pumilus* (QST 2808), assim como o óleo de café reduziram a severidade da doença no teste de folhas destacadas. Os resultados dos ensaios em casa de vegetação apresentaram a mesma tendência dos de folhas destacadas. No entanto, os tratamentos associados ao fungicida se destacaram na redução da severidade da doença e da desfolha. Em condições de campo, a doença ocorreu de forma natural e as avaliações foram a cada 20 dias após os primeiros sintomas. Todos os tratamentos reduziram a severidade da doença, exceto o isolado de *B. pumilus* e *B. subtilis* (AP-3). No entanto, apenas os tratamentos com óleo de café torrado a 1% e 0,5% em mistura com o fungicida se aproximaram dos resultados alcançados pelo fungicida na concentração recomendada.

**Palavras-chave:** Controle biológico, controle alternativo, produtos naturais, *Glycine max*.

## **CONTROL OF ASIAN SOYBEAN RUST (*Phakopsora packyrhizi*) WITH COFFEE OIL AND *Bacillus* spp.**

Dissertation (Master's Degree in Agronomy/Plants Protection) - Agronomic Science College, Universidade Estadual Paulista.

Author: DALTON VINICIO DORIGHELLO

Adviser: Prof. Dr. Wagner Bettiol

### **2 SUMMARY**

The Asian soybean rust, caused by *Phakopsora packyrhizi*, became the main disease of the crop after its introduction in Brazil, in 2001. The control is performed mainly with chemical fungicides. However, reports of the pathogen population resistant to these molecules, as well as the negative impacts on the environment and public health require the development of new control methods. The use of biocontrol agents and natural products emerge as potential tools for the management of this disease. This study aimed to evaluate the efficacy of *Bacillus subtilis* – QST 713 (Serenede®), *Bacillus pumilus* – QST 2808 (Sonata®), *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* (Nemix®), as well as each isolated individual; *Bacillus subtilis* isolates AP-3 and AP-51; coffee oils obtained from roasted (TC) and raw coffee beans (CC) at concentrations of 1% and 2%, and also at concentrations of 0.5% and 1% in mixture with half of the fungicide pyraclostrobin e epoxiconazol (Opera®) commercial dose; the control (water); and the fungicide, on commercial dose and half of the dose, on the pathogen uredospores germination and Asian soybean rust control in detached leaves, and plants grown under greenhouse and field conditions. All tests were carried out twice with cultivar BRS316RR, excepted at field conditions. The strains of *B. subtilis* QST 713 and AP-3, *B. pumilus*, and the coffee oil significantly reduced the uredospore germination. The pathogen inoculation was artificial in tests with detached leaves and greenhouse. The strains of *B. subtilis* (QST 713, AP-3 and AP-51) and of *B. pumilus* (QST 2808), and coffee oils reduced the disease severity in detached leaf tests. The results of greenhouse tests showed the same tendency of detached leaves. However, the treatments associated with fungicide

performed better reducing disease severity and defoliation. Under field conditions, the disease occurred naturally and evaluations were carried out 20 days after the first symptoms. All treatments reduced the disease severity, except the isolated of *B. pumilus* and *B. subtilis* AP-3. However, only roasted coffee oil at 1% and 0.5% in mixture with fungicide obtained results near to the fungicide commercial dose results.

**Keywords:** Biological control, alternative control, natural products, *Glycine max*.

### 3 INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é originária da região leste da China e sua expansão ocorreu devido a importância desta leguminosa na alimentação humana e animal (BORÉM, 1999). No Brasil, a soja foi introduzida por intermédio do Professor Gustavo Dutra que iniciou seus estudos no ano de 1882 com variedades importadas dos EUA (BONATO e BONATO, 1987). No entanto, foi apenas a partir da década de 70, devido à demanda no mercado internacional e do interesse pelas indústrias de óleo vegetal, que o seu cultivo aumentou significativamente ano após ano. Atualmente, o Brasil destaca-se como um dos principais produtores mundiais de soja graças às altas produtividades.

Dentre as limitações do cultivo da soja, os problemas fitossanitários são relevantes, pois comprometem parte da atual produção nacional. Dentre as doenças incidentes na cultura, a ferrugem asiática, causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* Sdy. & P. Syd., é considerada chave e merece destaque. Relatada em 2001, a doença trouxe prejuízos sem precedentes à produção nacional, chegando a US\$ 1,29 bilhões na safra 2002/2003 (YORINORI e LAZZAROTTO, 2004). A principal medida de controle utilizada é o uso de fungicidas (GODOY e CANTERI, 2004). No entanto, o uso contínuo destes produtos tem selecionado populações menos sensíveis aos mesmos, tornando ainda mais problemático o manejo da doença. Com isso, existe uma demanda por outros métodos de controle da doença. Dentre estes, métodos alternativos mediante o uso de microrganismos e substâncias naturais, que possuem potencial para serem empregados em conjunto ou em substituição aos fungicidas químicos, estão sendo desenvolvidos

Este estudo teve como objetivo avaliar o potencial de bactérias do gênero *Bacillus* na germinação de uredósporos e no controle da ferrugem asiática da soja, bem como avaliar a eficiência de produtos à base de óleo de café e a sua associação a um fungicida comercial na germinação de uredósporos e no controle da doença.



## **4 REVISÃO DE LITERATURA**

### **4.1 A cultura da soja e o cultivo no Brasil**

A soja é uma das culturas mais frequentemente cultivada em todo o mundo. De ciclo anual, porte ereto e autógama, a soja pertencente ao reino Plantae, divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, ordem Fabales, família Fabaceae (Leguminosae), subfamília Faboideae (Papilionoideae) e gênero *Glycine*, sendo *Glycine max* (L.) Merrill a espécie cultivada (SEDIYAMA, 2009).

O centro de origem da soja é o nordeste da Ásia (China e regiões adjacentes) e a sua disseminação do Oriente para o Ocidente ocorreu por meio de navegações (CHUNG e SINGH, 2008). No Brasil, o primeiro relato sobre a introdução da soja data de 1882, no Estado da Bahia, importada dos EUA pelo Prof. Gustavo Dutra (BLACK, 2000). A partir de então, dentro do território nacional, a soja foi levada para outras regiões. No Estado de São Paulo, o Instituto Agrônomo de Campinas promoveu, em 1900, a primeira distribuição de sementes a agricultores da região (BONATO e BONATO, 1987). Em 1914, a soja foi introduzida no Estado do Rio Grande do Sul, local onde melhor se adaptou, pois encontrou condições edafoclimáticas mais próximas às dos EUA (BONETTI, 1981). No entanto, a produção comercial no Rio Grande do Sul iniciou por volta de 1935, cuja finalidade inicial foi a alimentação suína (SEDIYAMA, 2009). A partir da década de 1960, a produção de soja tornou-se economicamente importante e foi responsável pela ampliação da fronteira agrícola em todo o país. Com baixo preço das terras e subsídios oferecidos pelo governo, a soja, juntamente a outras culturas, foi introduzida a região do cerrado (ALVES et al., 2003)

No Brasil, a soja é considerada uma fonte de proteína e óleo de boa qualidade e baixo custo e está entre as culturas mais importantes em função de seu alto valor sócio-econômico e pelas aplicações de seus produtos e subprodutos e consequente expressão no mercado interno e internacional (ALMEIDA et al., 2005). A produção brasileira é destaque no mercado internacional e alcançou, na safra 2011/2012, 66,38 milhões de toneladas (CONAB, 2012). Diversos fatores são responsáveis pelo aumento constante da produção nacional, dentre os mais importantes, o melhoramento genético, com desenvolvimento de cultivares adaptados às diferentes condições edafoclimáticas (BONETTI, 1981; YORINORI, 2002). Estima-se que até 2020, o Brasil passe a ser o maior produtor mundial, ultrapassando a marca de 100 milhões de toneladas (VENCATO et al., 2010). Este aumento pode ser atribuído ao aumento da demanda internacional e ao consumo interno dos produtos e subprodutos da soja, tecnologias empregadas no cultivo e aumento da área cultivada (LAZZAROTTO e HIRAKURI, 2010). O principal estado produtor é o Mato Grosso, seguido do Paraná e Rio Grande do Sul (CONAB, 2012).

O desenvolvimento fenológico da cultura pode ser dividido em duas fases: Vegetativa (V) e Reprodutiva (R). As subdivisões ou estádios da fase vegetativa são designados numericamente como V1, V2, até Vn, salvo os dois primeiros estádios, conhecidos como Ve (emergência) e Vc (estádio de cotilédone). O último estágio vegetativo é conhecido como Vn, onde “n” representa o número de nós vegetativos. Este valor (n) varia em função das diferenças entre as variedades e as condições ambientais. Todos os nós acima dos unifoliolados são alternados, ocupam diferentes posições no caule e possuem (ou possuíam) folhas trifolioladas. As folhas jovens possuem folíolos que, no início de seu desenvolvimento, se assemelham a cilindros. Ao se desenvolverem, os folíolos se desenrolam e os bordos se separam até a abertura completa dos mesmos. Uma folha é considerada completamente desenvolvida quando está totalmente aberta e os bordos dos folíolos da folha do nó imediatamente acima não mais se tocam. A fase reprodutiva conta de oito subdivisões e suas representações também são 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) (FEHR e CAVINESS, 1977).

## 4.2 Ferrugem asiática da soja

Constatada no Paraguai e no Estado do Paraná, no ano de 2001, a ferrugem asiática da soja encontra-se disseminada por todo o país, passando a ser, desde então, o principal problema fitossanitário que incide na cultura da soja (YORINONI e LAZZAROTTO, 2004).

A ferrugem asiática da soja é causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* que pertence ao filo Basidiomycota, classe Pucciniomycetes, ordem Pucciniales e família Phakopsoraceae (INDEX FUNGORUM, 2013). Os fungos da Ordem Pucciniales são conhecidos como ferrugens, devido aos esporos vermelhos/alaranjados que produzem durante a reprodução assexual. As ferrugens ocorrem em muitas espécies de plantas parasitando-as, também sendo comum parasitarem apenas um único hospedeiro (VOEGELE e MENDEGEN, 2003). Como todos os agentes causais das ferrugens, o fungo *P. pachyrhizi* é um parasita obrigatório e sua manutenção no ambiente depende de hospedeiros vivos. Na falta da soja no campo, sua sobrevivência é dependente de hospedeiros alternativos como feijão e plantas voluntárias (JACCOUD-FILHO et al., 2006).

A dispersão do patógeno ocorre, principalmente, pelo vento, podendo atingir grandes distâncias. Os uredósporos, produzidos na fase uredinial, constituem o inóculo responsável pelas epidemias, pois são facilmente removidos das urédias quando as folhas estão secas, geralmente, durante o dia e carregados pelo vento (REIS et al., 2006). Os uredósporos de *P. pachyrhizi* medem 15-24 x 18-34 µm, são ovóides a elipsóides com paredes de 1 µm de espessura, densamente equinulados e variando de incolor a castanho opaco (SINCLAIR e HARTMAN, 1999). *Phakopsora pachyrhizi* possui teliósporos organizados em duas a sete camadas, com coloração marrom amarelado, espessura em torno de 1 µm ou levemente mais grossa na região superior e com até 3 µm de espessuras nas células das camadas apicais, sendo esta a principal característica, além da técnica de PCR (SOUSA et al., 2007; FREDERICK et al., 2002), para diferenciar a ferrugem asiática (*P. pachyrhizi*) da ferrugem americana (*Phakopsora meibomiae*), sendo a última considerada menos agressiva, limitada a regiões de temperaturas mais amena e de menor importância (ONO et al., 1992; CARVALHO JUNIOR e FIGUEREDO, 2000).

Após a deposição do esporo nas folhas saudáveis, ocorre a sua germinação e penetração pelos estômatos, onde são formados os apressórios (DEISING et al., 2000). A formação do apressório ocorre de 4 a 6 horas após a inoculação (ZAMBENEDETTI et al., 2007). Além da penetração por estômatos, é observada também penetração direta pelas células da epiderme (GOELLNER et al., 2010). Esta penetração ocorre nas junções destas células e a formação do apressório nem sempre é observada (ZAMBENEDETTI et al., 2007).

A ferrugem asiática da soja é classificada como uma doença policíclica, pois este patógeno apresenta vários monociclos durante o cultivo no campo (AGRIOS, 2005). Estudos epidemiológicos demonstraram ser necessário, em condições controladas, no mínimo seis horas de molhamento foliar contínuo para que ocorra a infecção sob temperatura entre 18 °C a 22 °C (ALVES et al., 2006). Melching et al. (1979) mostraram que a doença é favorecida em temperatura variando de 15 °C a 28 °C e alta umidade relativa. Temperaturas acima da faixa favorável à infecção afetam negativamente a germinação dos esporos e, por consequência, a taxa de desenvolvimento da doença (KOCHMAN, 1979; MESQUINI et al., 2011b). De maneira geral, as condições adequadas para o desenvolvimento da cultura também são favoráveis para o desenvolvimento da doença (ALVES et al., 2006).

Além dos fatores inerentes ao ambiente, Godoy et al. (2003) mostraram, ao acompanhar o progresso da doença em 18 cultivares, que a época de semeadura influencia no progresso da doença. Concluíram que nas cultivares semeadas em novembro a doença iniciou no estágio R5 (formação de sementes) e nas mesmas cultivares semeadas em dezembro a doença iniciou em R3 (formação de vagens), observando assim maior severidade, atribuída a maior concentração de inóculo inicial no campo.

O progresso da doença está intimamente relacionado ao período de latência. O período de latência compreende o momento da deposição do esporo até ao aparecimento dos sinais, no caso da ferrugem asiática da soja, a esporulação. Estudos mostraram um período de latência de 30, 10 e 12 dias, respectivamente, para as temperaturas de 10, 20 e 28 °C (ALVES et al., 2006). Segundo os mesmos autores, o período de latência tende a aumentar conforme a temperatura se distancia do ponto ideal.

Fatores próprios do hospedeiro também influem na doença. Melching et al. (1988) verificaram variação na infecção em função da idade das folhas. As folhas mais novas foram mais suscetíveis quando comparadas às mais velhas. Folhas em plantas mais novas, na mesma posição em plantas mais velhas, mostraram-se mais suscetíveis. Estes dados diferem dos apresentados por Furtado et al. (2009), porém a diferença pode estar atribuída às diferentes cultivares utilizadas. A maior suscetibilidade das folhas mais velhas pode ser atribuída aos maiores períodos de molhamento proporcionados pelo microclima e menor irradiação incidente nas folhas baixas das plantas de soja, uma vez que a radiação pode comprometer a germinação dos uredósporos (ISARD et al., 2006). Estas condições podem explicar o desenvolvimento da doença no sentido base-ápice das plantas de soja, em condições de campo.

Apesar desta conhecida ascensão da doença, os sintomas da ferrugem asiática da soja podem aparecer em qualquer momento do ciclo fenológico da cultura e atingir diferentes partes da planta, como cotilédones e hastes, sendo as lesões foliares as mais conhecidas (ALMEIDA et al., 2005; AZEVEDO et al., 2007). Com a manifestação inicial da doença, é possível observar, no tecido das folhas, áreas cloróticas, geralmente encontradas em folhas do baixeiro quando as plantas estão próximas ou após o florescimento (REIS et al., 2006). Com a evolução da doença, as urédias adquirem uma coloração que varia de castanha a marrom-enebecida, as quais rompem a epiderme para liberação dos uredósporos (SINCLAIR e HARTMAN, 1999).

A coloração das lesões varia com a idade e a interação com o hospedeiro, por isso são classificadas como do tipo castanho clara com muitos soros uredinais e abundante esporulação (TAN) ou castanho avermelhada com poucos soros uredinais e com pouca ou nenhuma esporulação (RB - Reddish Brown), sendo a última comum em materiais com genes de resistência (BONDE et al., 2006).

A ferrugem asiática da soja reduz a atividade fotossintética pela destruição dos tecidos foliares, causando desfolha prematura e redução do ciclo da planta, impedindo a plena formação dos grãos. De acordo com Yang et al. (1991), quanto mais cedo a doença atingir a cultura e causar desfolha, menor serão os grãos e maiores as perdas na produção. Essas perdas variam de 10% a 90%, dependendo das condições climáticas e do manejo da cultura (YORINORI et al., 2005). No Brasil, desde o seu surgimento, a ferrugem asiática da soja tem causado danos sem precedentes à produção, com perdas estimadas de até 80% (YORINORI et al., 2004).

Para o manejo da doença recomenda-se: utilização de cultivares precoces; semeaduras no início da época recomendada para cada região; evitar o prolongamento do período de semeadura; eliminação de plantas voluntárias e respeito ao vazio sanitário para diminuir o inóculo na safra seguinte; uso de variedades de resistentes, além da aplicação preventiva de fungicidas, uma vez que a resistência pode ser quebrada devido à variabilidade natural do patógeno (HENNING et al., 2010).

### **4.3 Controle alternativo de ferrugens**

Dentre as doenças que afetam as plantas cultivadas, as doenças conhecidas como ferrugens assumem grande importância. As ferrugens são assim denominadas em razão das lesões amareladas e de aspecto ferruginoso que aparecem nos hospedeiros atacados. Estas lesões, também referidas como pústulas, são constituídas, na maior parte, por estruturas reprodutivas do fungo, que emergem do tecido vegetal doente através do rompimento da epiderme dos hospedeiros. Os patógenos responsáveis pelas ferrugens pertencem ao grupo dos Basidiomicetos, ordem Uredinales, que atuam como parasitas obrigatórios e não apresentam fase saprofítica em seu ciclo de vital (CUMMINS e HIRATSUKA, 2003; KIMATI et al., 2005).

As ferrugens são causadas por mais de 5.000 espécies de fungos, distribuídos em cerca de 130 gêneros. Alguns destes, são reconhecidos desde a antiguidade e podem ter efeitos devastadores na cultura incidente. Estas doenças causam danos a diversas gramíneas de importância como trigo, cevada, milho e cana-de-açúcar, além de danos em café, soja, feijão, plantas ornamentais, frutíferas e hortícolas. As plantas doentes tem seu processo fotossintético afetado tanto pela retirada de nutrientes promovida pelo fungo como pela destruição da área foliar, decorrente da formação de pústulas e da desfolha precoce (KIMATI et al., 2005).

Devido à dificuldade de obtenção de variedades resistentes a estes patógenos, os fungicidas se constituem na principal ferramenta no manejo das ferrugens incidentes em algumas culturas como café, feijão e soja (ZAMBOLIM et al., 1997; MODESTO et al., 2005; GODOY et al., 2007). No entanto, o uso indiscriminado dos fungicidas tem selecionado populações com resistência a estas moléculas, como demonstrado por Valencio (2012), que verificou aumento da  $DL_{50}$  para algumas populações de *P. pachyrhizi*. Por pressionar a seleção de patógenos resistentes, o uso frequente de fungicidas pode agravar os problemas com outras doenças e pragas, por

causar desequilíbrio na microbiota e prejudicar o controle biológico natural (GUZZO et al., 2001). Além disso, aos agrotóxicos são atribuídos problemas de ordem ambiental, como contaminação dos alimentos, do solo, da água e dos animais e a intoxicação dos agricultores (MORANDI e BETTIOL, 2009).

Para a cultura do café, Maffia et al. (2009) discutiram sobre o controle biológico da ferrugem (*Hemileia vastatrix*) ocorrendo através de diferentes mecanismos: hiperparasitismo por *Lecanicillium lecani*; antibiose por *Beauveria bassiana*, *Lecanicillium lecani*, espécies de *Bacillus*, principalmente *B. thuringiensis* e *B. subtilis*; e indução de resistência pela aplicação de suspensão de uredósporos inativados de *H. vastatrix*, suspensão de *Saccharomyces cerevisiae*, *B. thuringiensis*, *Pseudomonas* spp., além da indução de resistência por rizobactérias e fungos micorrízicos. Neste patossistema, os resultados alcançados no controle da doença, com agentes de controle biológico, foram semelhantes ao uso de fungicidas, também em condições de campo (HADDAD et al., 2009). No entanto, os resultados obtidos com o controle alternativo da ferrugem do cafeeiro, mediante utilização de produtos vegetais, como extrato aquoso de casca de café, nim e extrato alcoólico de tomilho, são inconsistentes e, apesar dos resultados positivos alcançados em condições controladas, há falta de dados sobre a eficiência a campo e a padronização de metodologias para formulação de produtos de origem vegetal (COSTA et al., 2007; CARVALHO et al., 2012).

A ferrugem do feijão causada por *Uromyces appendiculatus* pode causar danos na ordem de 45% (JESUS-JUNIOR et al., 2001). Como controle, além dos bons resultados obtidos pelos fungicidas (MODESTO et al., 2005), há resultados animadores que envolvem os principais mecanismos de ação dos agentes de controle biológico: antibiose por *B. subtilis*, *Bacillus* sp., *Streptomyces* sp. e *Trichoderma harzianum* (BETTIOL et al., 1992; WAGACHA et al., 2007; BURMEISTER e HAU, 2008) e indução de resistência por *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas putida* (ABEYSINGHE, 2009), além do efeito direto dos metabólitos e das células de *B. subtilis* sobre os uredósporos deste patógeno (MIZUBUTI et al., 1995). Estes resultados demonstram a viabilidade da utilização do controle alternativo neste patossistema.

Na cultura da soja, a falta de variedades resistentes a *P. pachyrhizi* faz com que o uso de fungicidas seja a principal ferramenta no manejo desta

doença (GODOY e CANTERI, 2004; GODOY et al., 2007). Apesar do controle alternativo não ter sido estudado em detalhes neste patossistema (GOELLNER et al., 2010), alguns estudos foram realizados e indicam o potencial de agentes de controle biológico e produtos de origem vegetal para o controle desta doença.

*Simplicillium lanosoniveum* é um hiperparasita e pode ser encontrado em lavouras de soja, onde não são utilizados fungicidas, colonizando urédias de *P. pachyrhizi* (WARD, 2011). Em estudo mais detalhado, Ward et al. (2012) observaram os efeitos de inoculações de *S. lanosoniveum* sobre a ferrugem asiática da soja. Os autores observaram que, em condições controladas, este agente de controle biológico reduziu em até quatro vezes o número de urédias nas folhas, com um aumento das lesões do tipo “RB”, ou seja, de menor esporulação, além de diminuir a germinação de esporos. Em condições de campo, apesar da flutuação populacional do agente de controle biológico, demonstrando dependência das condições climáticas, a severidade e a presença de *P. pachyrhizi* foram reduzidas com inoculações de *S. lanosoniveum*. Outros trabalhos envolvendo fungos hiperparasitas apontam *Verticillium psalliotae* (SAKSIRIRAT e HOPPE, 1991); *Verticillium lecani* (SAKSIRIRAT et al., 1996) e *Trichothecium roseum* (SANGIT e JHA, 2002) como potenciais agentes de controle biológico da ferrugem asiática da soja.

Jahagirdar et al. (2012) demonstraram que os extratos de *Adathoda vasica*, *Prosopis juliflora*, óleo de *Pongamia pinnata* e óleo de nim em mistura com a urina de vaca proporcionam um rendimento monetário líquido superior ao da testemunha. Apesar da maior eficiência do fungicida químico, os produtos alternativos podem compor um programa de manejo desta doença e auxiliar na redução da dependência dos fungicidas. Não se pode esperar que inicialmente o controle alternativo substitua o controle químico da ferrugem asiática da soja de forma significativa (GOELLNER et al., 2010). No entanto, novos métodos integrados ou não ao controle químico são necessários ao manejo desta doença.



## **5 MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.1 Origem e manutenção do inóculo**

Sementes da variedade de soja BRS 316, suscetível ao patógeno, foram semeadas em vasos plásticos de 2,5 litros contendo mistura de substrato (casca de pinus + carvão) e terra oriunda de uma área de cultivo (1:1). Os vasos foram mantidos em casa de vegetação, onde foi instalado um sistema de aspersão que garantia um molhamento foliar superior a 8 horas no período noturno. O inóculo inicial foi cedido pela Embrapa Soja. Folhas de soja infectadas por *P. pachyrhizi* foram friccionadas nas folhas de soja dos vasos da casa de vegetação e, em seguida, o sistema de aspersão foi ativado para aumentar as chances de infecção (ALVES et al., 2006). Após desenvolvimento da doença, novas plantas de soja em diferentes estádios fenológicos, foram expostas ao ambiente com o patógeno, garantindo assim uma grande quantidade de inóculo que podiam ser recolhidos de plantas com lesões recentes.

### **5.2 Produtos alternativos avaliados**

Os produtos alternativos avaliados foram os originários de agentes de biocontrole e óleos de café, além da testemunha e do fungicida comercial (Tabela 1).

Tabela 1. Código atribuído, ingrediente ativo, nome comercial, empresa e concentração utilizada dos produtos avaliados.

Código	Ingrediente ativo	Nome comercial	Empresa	Concentração Aplicada
SE	<i>Bacillus subtilis</i> (QST 713)	Serenade	Agraquest	10 <sup>8</sup>
SO	<i>Bacillus pumilus</i> (QST 2808)	Sonata	Agraquest	10 <sup>8</sup>
BS+BL	<i>Bacillus subtilis</i> + <i>Bacillus licheniformis</i>	Nemix	Chr. Hansen's	10 <sup>8</sup>
BS	<i>Bacillus subtilis</i>		Chr. Hansen's	10 <sup>8</sup>
BL	<i>Bacillus licheniformis</i>		Chr. Hansen's	10 <sup>8</sup>
AP-3	<i>Bacillus subtilis</i>		Embrapa Meio Ambiente	10 <sup>8</sup>
AP-51	<i>Bacillus subtilis</i>		Embrapa Meio Ambiente	10 <sup>8</sup>
CT 1%	Óleo de café torrado		Embrapa Meio Ambiente	1%
CT 2%	Óleo de café torrado		Embrapa Meio Ambiente	2%
CC 1%	Óleo de café cru		Embrapa Meio Ambiente	1%
CC 2%	Óleo de café cru		Embrapa Meio Ambiente	2%
1F	Piraclostrobina + epoxiconazol	Ópera	Basf	0,66 + 0,25 g/L 0,33 + 0,125 g/L
0.5 F	Piraclostrobina + epoxiconazol	Ópera	Basf	g/L
CT 1% +	Óleo de café torrado +			1% + 0,33 +
0.5 F	Piraclostrobina + epoxiconazol			0,125 g/L
CT 0.5% +	Óleo de café torrado +			0,5% + 0,33 +
0.5 F	Piraclostrobina + epoxiconazol			0,125 g/L
CC 1% +	Óleo de café cru + piraclostrobina			1% + 0,33 +
0.5 F	+ epoxiconazol			0,125 g/L
CC 0.5% +	Óleo de café cru + piraclostrobina			0,5% + 0,33 +
+ 0.5 F	+ epoxiconazol			0,125 g/L

O óleo de café foi obtido pela compressão dos grãos de café torrados ou crus em uma prensa extrusora a frio (cold press expeller). O óleo foi separado da massa de grãos e filtrado em filtro prensa e embalado. Estes procedimentos foram realizados pela empresa Linax de Araçatuba, SP. Estes óleos foram formulados e o processo encontra-se em fase de patente.

Os isolados AP-3 e AP-51 de *B. subtilis* foram repicados de tubos de ensaio para 10 placas de Petri contendo BDA (Batata, dextrose e ágar) pelo método das estrias. Após cinco dias, a cada placa foram adicionados 10 mL de água destilada esterilizada e com auxílio de uma alça de Drigalski as colônias de células de *Bacillus* foram raspadas. O conteúdo formado das 10 placas de Petri foi homogeneizado e 10 mL transferidos para Erlenmeyer de 500 mL contendo 250 mL do meio GPL (glucose – 10 g; peptona – 10 g; extrato de levedura – 5 g; NaCl – 3g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1 g; Mg SO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O – 0,5 g; água destilada – 1000 mL, pH – 6,0). Os frascos foram mantidos em mesa agitadora em temperatura ambiente por 10 dias. A concentração obtida de unidades formadoras de colônia (UFC) foi de  $1,1 \times 10^9$  UFC. A determinação da UFC foi realizada através de diluição seriada e plaqueamento, conforme Bettiol et al. (2012b).

### 5.3 Germinação de uredósporos

Os estudos para avaliar o efeito dos produtos alternativos sobre a germinação de uredósporos de *P. pachyrhizi* foram realizados em condições controladas. Folhas de soja com lesões recentes foram coletadas e, com auxílio de um pincel e uma cartolina, os uredósporos foram recolhidos. Uma alíquota de 10 µL de uma suspensão contendo  $1 \times 10^5$  uredósporos/mL foi depositada em uma lâmina de vidro, juntamente a uma alíquota de 10 µL contendo o dobro da concentração de cada produto apresentado anteriormente, para assim ser obtido uma gota de 20 µL com as doses exatas dos produtos estudados. As lâminas foram colocadas no escuro por 4 horas a uma temperatura de  $22 \pm 2$  °C e o processo de germinação foi interrompido com a adição de 10 µL de lactofenol. O número de uredósporos germinados foi avaliado em 100 uredósporos por repetição (SOARES et al., 2008). Os uredósporos foram considerados germinados quanto o tubo germinativo foi maior que o diâmetro do uredósporos. O

delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três repetições, sendo cada repetição constituída por uma lâmina de vidro com dois campos de análise.

#### **5.4 Avaliação da eficiência em folhas destacadas**

A metodologia utilizada foi adaptada da proposta pelo Comitê de Ação a Resistência a Fungicida (Fungicide Resistance Action Committee – FRAC) (SCHERB e MEHL, 2006). Dez sementes da cultivar BRS 316 RR foram semeadas em vasos plásticos de 2,5 L contendo substrato (casca de pinus + carvão) e terra oriunda de uma área de cultivo (1:1). Os vasos foram mantidos em casa de vegetação e, após a emergência, foram mantidas as três plântulas mais vigorosas. Após o desenvolvimento completo do primeiro trifólio, os unifólios foram destacados junto com os pecíolos, lavados e a base do pecíolo foi envolta em algodão umedecido. Em seguida, os unifólios foram colocados em placas de Petri, contendo dois papéis de filtro saturados com água destilada, com a face abaxial voltada para cima (Figura 1). Os unifólios foram pulverizados com os produtos alternativos com auxílio de um pulverizador manual, até o ponto de escorrimento. Após 24 horas, as placas foram abertas e os unifólios inoculados, até o ponto de escorrimento, com uma suspensão contendo  $10^5$  uredósporos + 0,1 % de Tween 20. Os uredósporos utilizados foram coletados de folhas com lesões jovens e com abundante esporulação, conforme descrito anteriormente. Após a inoculação os unifólios foram mantidos em câmara de crescimento com fotoperíodo de 12 horas e temperatura de  $22 \pm 2$  °C, por 14 dias, quando foi realizada a avaliação da severidade da doença em cada unifólio com auxílio da escala diagramática proposta por Godoy et al. (2006). Esta escala apresenta os níveis de severidade de 0,6; 2; 7; 18; 42 e 78,5%. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições, sendo cada repetição composta de três unifólios.



Figura 1. Unifólios de plantas de soja dispostos na placa de Petri com papel filtro saturado de água.

### **5.5 Avaliação de eficiência em condições de casa de vegetação**

Os ensaios foram instalados em casa de vegetação na Embrapa Meio Ambiente em Jaguariúna-SP. Dez sementes da cultivar BRS 316 RR foram semeadas em vasos plásticos de 2,5 L contendo substrato (casca de pinus + carvão) e terra oriunda de uma área de cultivo (1:1). Os vasos foram mantidos em casa de vegetação livre de doenças e, após a emergência foram mantidas as três plântulas mais vigorosas. As plantas foram pulverizadas com os produtos alternativos com auxílio de uma bomba costal manual, quando atingiram o estágio fenológico V6, ou seja, próximo ao florescimento. Após 24 horas da pulverização, as plantas foram transferidas para outra vegetação contendo vasos com plantas de soja infectadas pela ferrugem asiática (SOARES et al., 2008) e dispostos de maneira homogênea (Figura 2a). O ensaio foi mantido sob um sistema de aspersão programado (Figura 2b e Figura 2c) que garantia um molhamento foliar noturno superior a 8 horas. Os produtos alternativos foram reaplicados semanalmente, totalizando quatro aplicações. As avaliações da severidade iniciaram com o aparecimento dos primeiros sintomas e, a partir desta, realizada semanalmente, totalizando quatro avaliações, com auxílio da escala diagramática proposta por Godoy et al. (2006) em três pontos da planta: terço inferior, terço médio e terço superior. A média das três notas foi considerada como a severidade incidente na planta toda no momento da avaliação (REUNIÃO, 2010) e calculada a área abaixo da

curva do progresso da doença (AACPD). Para avaliação da desfolha, uma nota foi dada para o conjunto de três plantas contidas em cada vaso, com auxílio da escala proposta por Hirano et al. (2010), juntamente com a última avaliação da severidade. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições, sendo cada repetição composta de um vaso com três plantas.



Figura 2. Plantas infestadas com ferrugem asiática da soja (a); sistema de aspersão controlado (b) e (c); e vista do ensaio, plantas infestadas e tratadas (d).

### 5.6 Avaliação da eficiência em condições de campo

O ensaio foi instalado no campo experimental da Embrapa Soja em Londrina-PR (Figura 3), em um campo da cultivar BRS 316 RR conduzido de forma comercial. Neste ensaio, por limitações no espaço, os tratamentos foram reduzidos para: SO; SE; AP-3; CT 1%; CT 2%; CT 1% + 0,5 F; CT 0,5% + 0,5 F; 0,5F; 1F e Test. As parcelas dispunham de seis linhas de seis metros com espaçamento de 0,5 metro. Os produtos foram aplicados conforme recomendações do fabricante, de maneira preventiva, com intervalos de 20 dias a partir do estágio fenológico de Reprodução (R1). A aplicação dos produtos foi realizada utilizando um pulverizador costal pressurizado com CO<sub>2</sub> com volume de aplicação de 200 L ha<sup>-1</sup>, totalizando 3 aplicações. O delineamento experimental foi de blocos casualizados com quatro repetições.

Para a avaliação foram consideradas cinco plantas em cada uma das duas linhas centrais de cada parcela, estimando-se a severidade da doença, com auxílio da escala diagramática proposta por Godoy et al. (2006), no terço inferior, médio e superior das plantas, considerando a média das três notas como a nota de severidade da planta. Com esses dados foram calculadas as AACPD. A desfolha foi estimada com auxílio da escala proposta por Hirano et al. (2010), no momento em que a testemunha atingiu 85% de desfolha, atribuindo uma nota para cada uma das duas linhas centrais da parcela. (REUNIÃO, 2010).



Figura 3. Campo da cultivar BRS 316 RR com parcelas demarcadas

### 5.7 Análise estatística

Todos os ensaios, exceto em condições de campo, foram repetidos duas vezes. Para a análise dos resultados, foi utilizado o pacote estatístico SAS e o software SigmaPlot. As variáveis de germinação e da severidade foram analisadas por análise de variância (ANOVA) e os tratamentos comparados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Germinação de uredósporos

Os isolados de *B. subtilis* QST 713 e *B. pumilus* inibiram totalmente a germinação dos uredósporos de *P. pachyrhizi*, assim como a fungicida utilizado (1F). Por outro lado, o isolado AP-3 de *B. subtilis* inibiu a germinação em 11,5%. O isolado AP-51 de *B. subtilis*, assim como os isolados de *B. subtilis* (BS) e *B. licheniformis* e a mistura destes (Nemix®) não diferiram significativamente da testemunha (Figura 4).

Os óleos de café, torrado ou cru, isoladamente nas concentrações de 1% e 2% ou em associação com metade da concentração do fungicida, nas concentrações de 1% e 0,5%, bem como a meia dose e a dose comercial, inibiram totalmente a germinação dos uredósporos de *P. pachyrhizi* (Figura 5).

### 6.2 Avaliação da eficiência em folhas destacadas

Os isolados de *B. subtilis* (QST 713, AP-3 e AP-51) e *B. pumilus*, assim como o fungicida, reduziram a severidade da doença. No entanto, apenas os isolados de *B. subtilis* QST 713 e *B. pumilus* apresentaram resultados com menores variações, assim como o fungicida. Os isolados de *B. subtilis* (BS), *B. licheniformis* e a mistura destes (Nemix®) não reduziram a severidade da doença (Figura 6). Os óleos de café, cru ou torrado, isolados nas concentrações de 1% e 2% e em mistura com a meia



dose do fungicida, nas concentrações de 0,5% e 1%, reduziram a severidade da doença, assim como a utilização da dose comercial do fungicida (Figura 7).

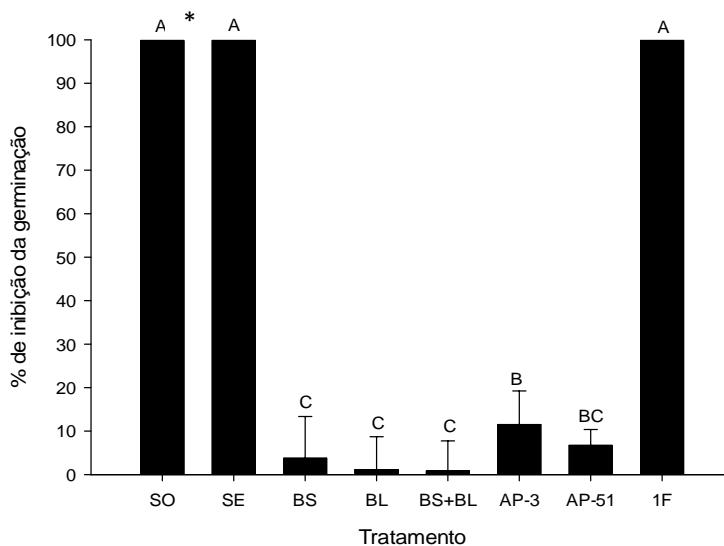


Figura 4. Efeito dos isolados de *Bacillus* na inibição da germinação dos uredósporos de *Phakopsora pachyrhizi* (\*Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade).

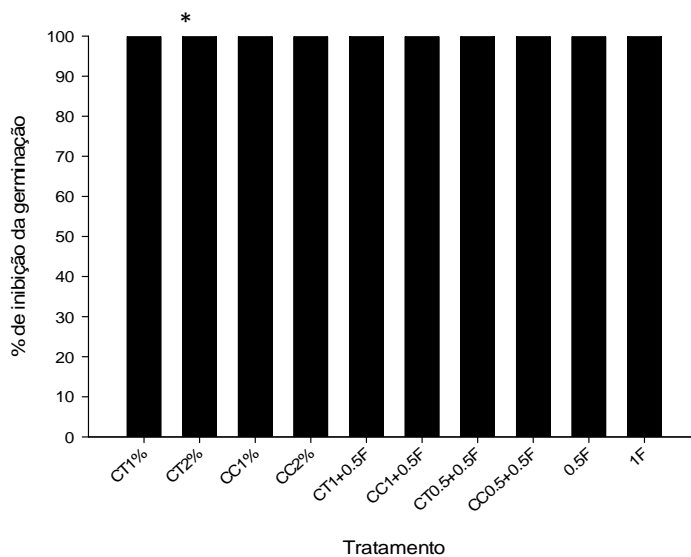


Figura 5. Efeito dos óleos de café, torrado e cru, na inibição da germinação dos uredósporos de *Phakopsora pachyrhizi*. (\*Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade).

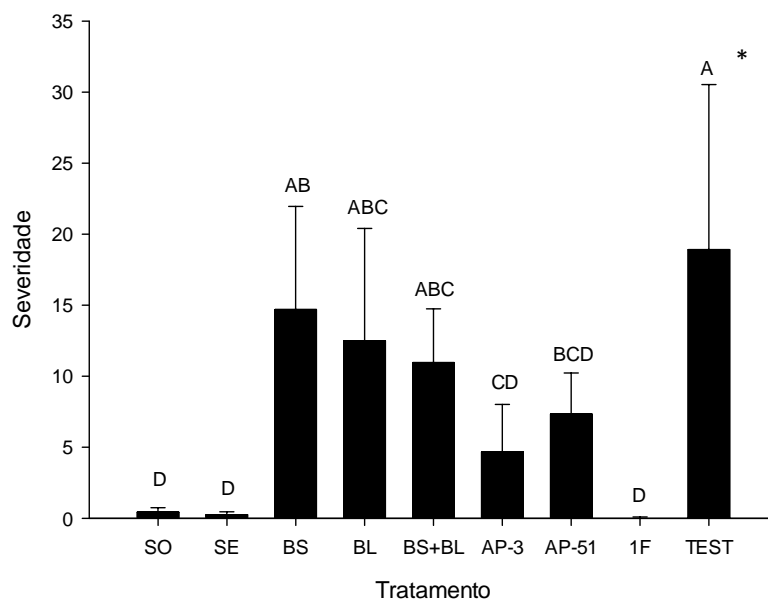


Figura 6. Efeito dos isolados de *Bacillus* na severidade de *Phakopsora pachyrhizi* em folhas destacadas de soja. (\*Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade).

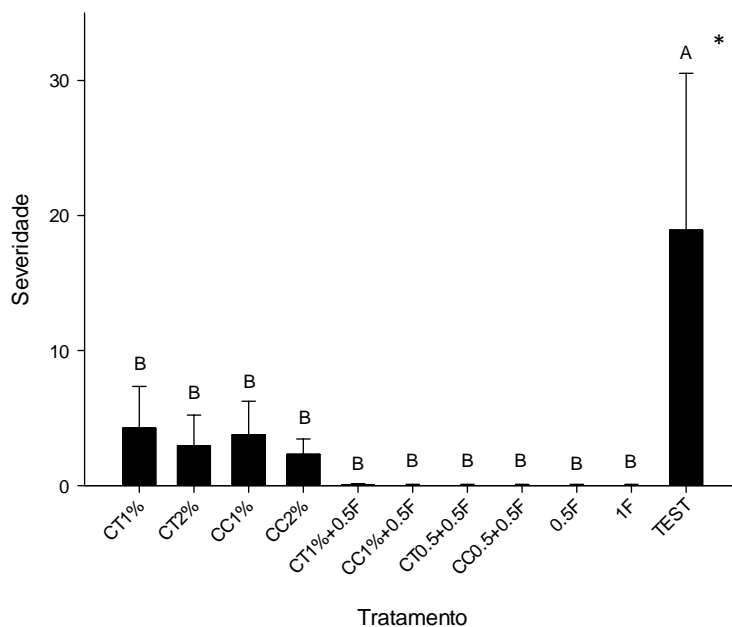


Figura 7. Efeito dos óleos de café, cru e torrado, isolados e em mistura com fungicida na severidade de *Phakopsora pachyrhizi* em folhas destacadas de soja. (\*Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si (Tukey a 5% de probabilidade).

### 6.3 Avaliação da eficiência em condições de casa de vegetação

Os primeiros sintomas da ferrugem asiática da soja foram observados, no primeiro ensaio, no 9º dia após exposição das plantas, e no 11º dia no segundo ensaio, nas testemunhas e em todas as plantas que não foram tratadas com fungicida. Todos os isolados de *Bacillus*, com exceção do isolado AP-51, reduziram a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD). No entanto, o fungicida foi mais eficiente (Figura 8).

Para a porcentagem de desfolha, apenas o isolado de QST 713 de *B. subtilis* e o fungicida diferiram da testemunha e reduziram a desfolha (Figura 9). Entretanto, a desfolha apresentada pelo tratamento com *B. subtilis* QST 713 foi na ordem de 53%, quando comparada com 3,5% das plantas tratadas com fungicida.

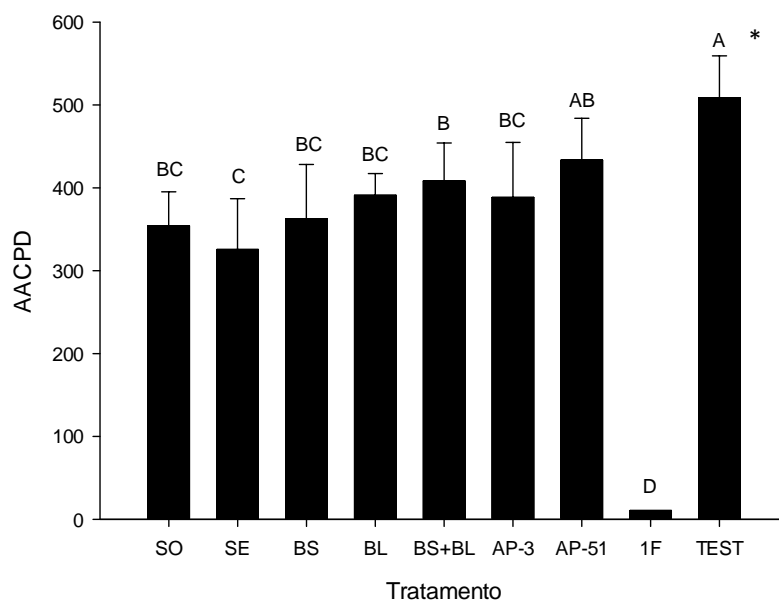


Figura 8. Efeito dos isolados de *Bacillus* sobre a área abaixo da curva de progresso da ferrugem asiática da soja (AACPD) em condições de casa de vegetação.

(\*Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade).

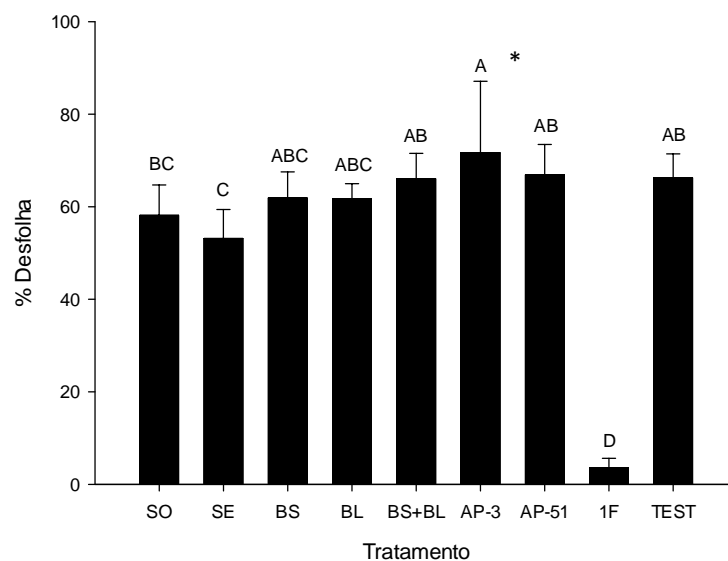


Figura 9. Efeito dos isolados de *Bacillus* na desfolha da soja causada por *Phakopsora pachyrhizi* em condições de casa de vegetação.

(\*Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade).

Os óleos de café nas concentrações de 1% e 2% reduziram a área abaixo da curva de progresso da doença. No entanto, os óleos de café, cru ou torrado, nas concentrações de 0,5% e 1% em mistura com a meia dose do fungicida foram mais eficientes, assim como a meia dose e a dose comercial do fungicida (Figura 10). Ambos os óleos, na concentração de 2%, causaram leves sintomas de fitotoxicidade.

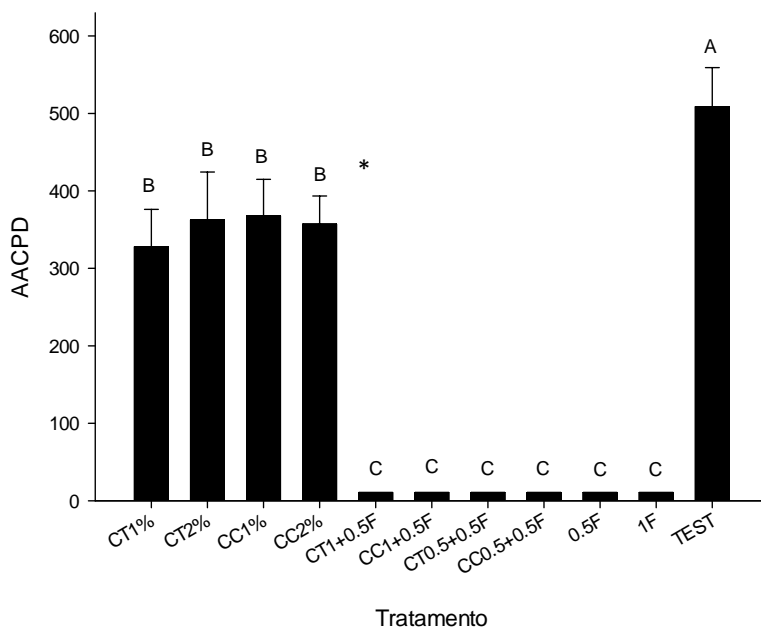


Figura 10. Efeito dos óleos de café, cru e torrado, isolados e em mistura com o fungicida, na área abaixo da curva de progresso da ferrugem asiática da soja (AACPD) em casa de vegetação. (\*Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade).

O óleo de café cru, isolado, nas concentrações de 1% e 2%, não reduziu a desfolha causada por *P. pachyrhizi* em casa de vegetação, ao contrario do óleo de café torrado, isolado e nas mesmas concentrações (Figura 11). No entanto, os tratamentos com óleos de café, nas concentrações de 0,5% e 1% em mistura com a meia dose do fungicida, apresentaram as menores porcentagens de desfolha, assim como aquela com meia dose ou dose comercial do fungicida.

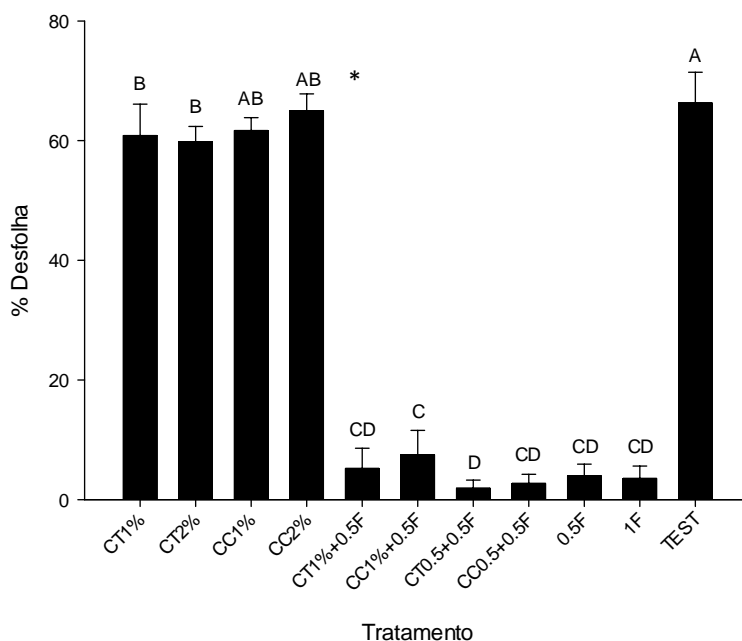


Figura 11. Efeito dos óleos de café, cru e torrado, isolados e em mistura com o fungicida na desfolha da soja causada por *Phakopsora pachyrhizi* em casa de vegetação. (\*Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade).

#### 6.4 Avaliação da eficiência em condições de campo

O isolado de *B. subtilis* QST 713 e óleo de café torrado nas concentrações de 1% e 2% diferiram da testemunha e diminuíram a área abaixo da curva de progresso da doença. No entanto, os tratamentos com óleo de café torrado nas concentrações de 0,5% e 1%, em mistura com a meia dose do fungicida, apresentaram as menores AACPD. A menor AACPD foi obtida com o fungicida na concentração recomendada, mas sem diferir estatisticamente da metade da concentração (Figura 12).

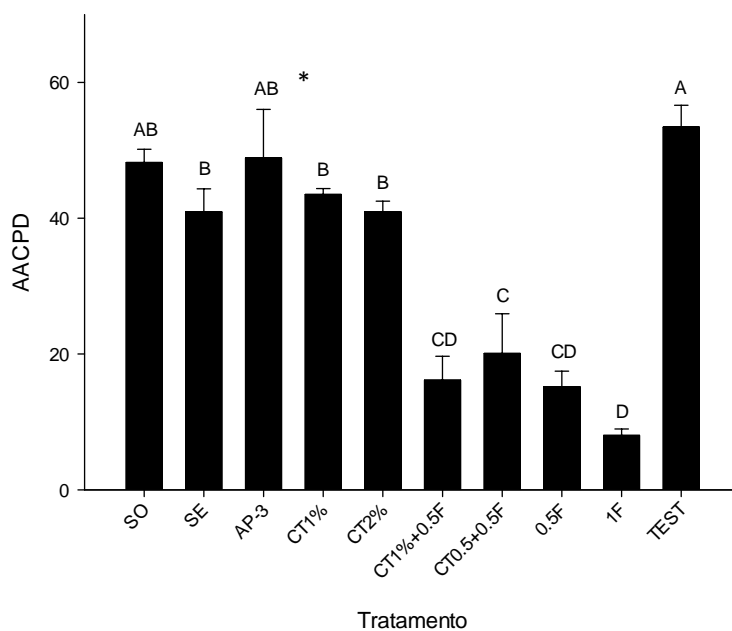


Figura 12. Efeito dos isolados de *Bacillus* e do óleo de café torrado na área abaixo da curva de progresso da ferrugem asiática da soja (AACPD) em condições de campo. (\*Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade).

A porcentagem de desfolha foi reduzida significativamente nos tratamentos com as duas concentrações de fungicidas e para as misturas de óleo de café torrado nas concentrações de 0,5% e 1%, em associação com a meia dose do fungicida. A utilização de 1% do óleo de café torrado com a meia dose do fungicida reduziu a desfolha da mesma forma que a utilização da dose comercial deste fungicida (Figura 13). O óleo de café torrado não causou fitotoxicidade em campo.

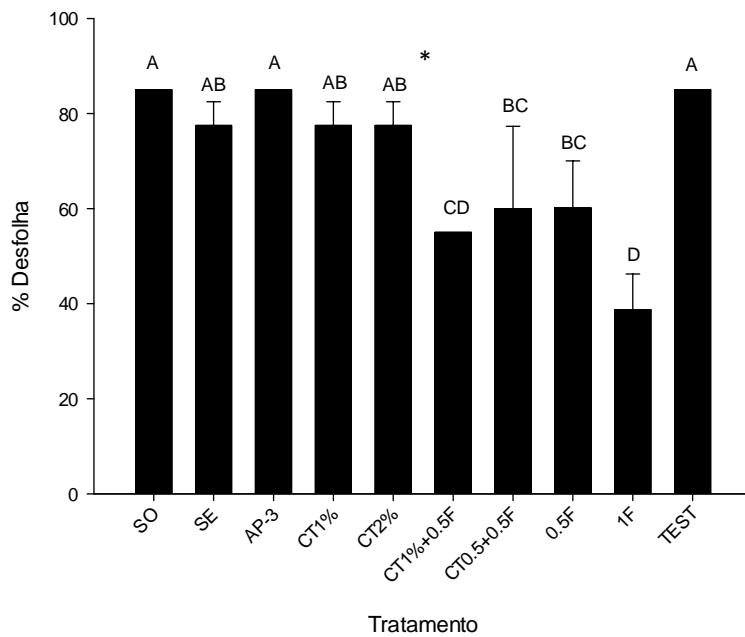


Figura 13. Efeito dos isolados de *Bacillus* e do óleo de café torrado na desfolha da soja causada por *Phakopsora pachyrhizi* em condições de campo.  
(\*Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade).



## 7 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos indicam que existe a possibilidade de produtos Serenade®, Sonata® e a base de óleos de café serem desenvolvidos para o controle da ferrugem asiática da soja. Entretanto, há necessidade de integração com outras alternativas, pois, aparentemente, o seu uso isolado teve uma eficiência limitada nas condições ecológicas estudadas. Os dados indicam que um adequado caminho seria a integração desses produtos com fungicidas sintéticos, ou em subdoses ou em aplicações alternadas e para determinar esse potencial existe a necessidade de realização de estudos em condições de campo.

A principal diferença entre os tratamentos biológicos utilizados nos ensaios, além dos isolados de *Bacillus*, é a formulação de cada produto. *Bacillus pumilus* e *Bacillus subtilis* QST 713 são comercializados na forma de caldo fermentado, ou seja, além das células do microrganismo, o produto contém seus metabólitos. O isolado QST-713 de *B. subtilis*, do produto Serenade®, produz iturina, agrastatina/plipastatina e surfactina, entre outros, que inibem a germinação dos esporos e crescimento do tubo germinativo de patógenos, como por exemplo, *Botrytis cinerea*, *Monilinia fructicola* e *Alternaria brassicicola*. Por outro lado, o isolado QST-2808 de *B. pumilus*, do produto Sonata®, produz açúcares aminados com ação antifúngica e é indicado para controle de diversos patógenos, como *Alternaria solani* e *Phytophthora infestans*, além de míldios e oídios incidentes em diversas culturas (BETTIOL et al., 2012a). Assim, os resultados obtidos estão de acordo com Wszelaki e Miller (2005), utilizando estes produtos para o controle da pinta preta (*A. solani*) e da mancha de

septoria (*Septoria lycopersi*) no tomate; e com Serrano et al. (2013) para o controle da sigatoka-negra (*Mycosphaerella fijiensis*) em banana.

Dentre os metabólitos produzidos por *Bacillus*, os lipopeptídeos, como surfactina, fengicina e iturina A, apresentam propriedades de inibir a germinação e o crescimento de diversos fitopatógenos como *H. vastratix* (HADDAD, 2008), *Colletotrichum acutatum* (KUPPER et al., 2009), além de controlar *Pseudomonas syringae* em plantas de *Arabidopsis*, *Rhizoctonia solani* em tomate e *Podosphaera fusca* em melão (ONGENA e JACQUES, 2008).

A inibição da germinação de esporos de fitopatógenos pelos isolados de *B. subtilis* QST 713 e *B. pumilus* são reconhecidos na literatura (MARRONE, 2002; WSZELAKI e MILLER, 2005; LAHLALI et al., 2011). Assim, os resultados observados no presente trabalho, quanto à germinação dos uredósporos de *P. pachyrhizi*, por esses organismos (Figura 5) estão relacionados à ação imediata dos metabólitos presentes na formulação. Também o efeito desses produtos no teste de folhas destacadas (Figura 6) possivelmente esteja relacionado à ação prolongada destes metabólitos, que podem ter ação sistêmica e persistirem na planta por mais de uma semana (BOTTONI e PELUSO, 2003; WAGACHA et al., 2007).

Os tratamentos aplicados à base dos isolados AP-3 e AP-51, de *B. subtilis* foram obtidos a partir de multiplicação em meio líquido e apesar da concentração de células ser a mesma dos produtos à base de *B. subtilis* QST 713 e *B. pumilus*, as características de cada meio podem influenciar nos metabólitos produzidos e, principalmente, nas concentrações obtidas desses metabólitos (PHAE e SODHA, 1991). Esse fato, aliado à capacidade de produzir determinados metabólitos, pode ser responsável pela menor atividade desses isolados sobre a germinação dos uredósporos, assim como sobre o controle da doença em folhas destacadas e nas plantas em casa de vegetação. Já os produtos a base de *B. subtilis* (BS), *B. licheniformis* (BL) e a mistura de ambos são constituídos de endósporos desses isolados, sem a presença de metabólitos, dificultando, desta forma, a ação imediata desses sobre o patógeno. Touré et al. (2004) observaram que importantes metabólitos são produzidos em diferentes fases de desenvolvimento de isolados de *B. subtilis*; a surfactina para alguns isolados é produzida apenas durante a fase de log e a produção de iturinas e fengicinas ocorre na fase estacionária. Portanto, antes desse agente de biocontrole agir por antibiose, é necessário que se estabeleça e encontre condições de desenvolvimento.

Os resultados obtidos no teste de folhas destacadas reforçam o potencial de algumas bactérias do gênero *Bacillus* reduzirem o inóculo primário, exercendo um efeito protetor na cultura. A capacidade de bactérias do gênero *Bacillus* em causar a lise de esporos, além de produzirem compostos voláteis tóxicos à fitopatógenos, pode contribuir para a redução da severidade da doença (LEELASUPHAKUL et al., 2008).

Os óleos de café torrado e cru foram eficientes em inibir a germinação dos uredósporos de *P. pachyrhizi* nas concentrações testadas, bem como em reduzir a severidade da doença em folhas destacadas e em plantas em casa de vegetação e campo (Figuras 5, 7, 10 e 12), demonstrando o seu potencial para controlar a doença. O óleo de café, quando aplicado em mistura com o fungicida padrão, também controlou a doença, mas nessas misturas o efeito da sub dose do fungicida foi mais destacado do que o efeito isolado desses óleos. Assim, há necessidade de se realizar novos estudos para comprovar a eficiência do óleo de café aplicado isoladamente. Possivelmente, nesses estudos devam ser consideradas as concentrações e a frequência de aplicação. De forma semelhante ao óleo de café, diversos produtos de origem vegetal, como o extrato bruto de *Eucalyptus citriodora*, biomassa cítrica (Ecolife®) e o extrato de grãos de kefir reduziram a germinação de uredósporos de *P. pachyrhizi* (Mesquini et al., 2007). Os produtos de origem vegetal são conhecidos por possuírem substâncias antimicrobianas com potencial de uso na agricultura, demonstrando eficiência no controle de doenças, tanto por inibir o crescimento micelial, como a germinação de esporos (ALMADA et al., 1998). Medice (2011), trabalhando com os óleos de café na forma bruta, ou seja, sem terem passado pelo processo de formulação, demonstrou que estes produtos foram eficientes no controle do oídio da soja nas concentrações de 0,5%; 1% e 2%. No entanto, este é o primeiro relato envolvendo o óleo de café no controle de *P. pachyrhizi*. Como os óleos foram formulados para o desenvolvimento desse estudo, novos testes precisam ser realizados para verificar o efeito dos ativos (óleos de café) separado dos demais componentes da formulação sobre a germinação do patógeno.

Os unifólios destacados e pulverizados com os óleos isoladamente, independente da concentração, apresentaram leve fitotoxicidade. Todas as concentrações de óleos de café foram eficientes na redução da severidade no teste de folhas destacadas (Figura 7). Apesar de não constar na literatura a utilização dos óleos de café no controle de fitopatógenos, alguns trabalhos utilizando diferentes produtos

vegetais para este fim são citados devido ao seu potencial de uso na agricultura, principalmente em áreas de cultivo orgânico. Medice et al. (2007) observaram que os óleos essenciais de eucalipto (*Corymbia citriodora*), tomilho (*Thymus vulgaris*), nim (*Azadirachta indica*) e citronela (*Cymbopogon nardus*) inibiram completamente a germinação de uredósporos de *P. pachyrhizi* e reduziram a severidade da ferrugem asiática da soja em casa de vegetação. Pereira et al. (2012) demonstraram que os óleos essenciais de canela, citronela, capim-limão, cravo-da-índia, árvore-de-chá, tomilho, nim e eucalipto inibiram a germinação de uredósporos de *H. vastatrix*, com destaque aos óleos de cravo-da-índia, citronela e tomilho que causaram desorganização citoplasmática e vacuolização celular dos esporos, controlando a doença em condições de casa de vegetação.

Em casa de vegetação, os óleos isoladamente reduziram a AACPD (Figura 10) e o óleo de café torrado, nas concentrações de 1% e 2% reduziram a desfolha (Figura 11), os melhores resultados foram proporcionados pelas misturas de óleos e fungicidas. Entretanto, o efeito principal deve ter sido do fungicida, pois na metade da dose o efeito foi semelhante à concentração recomendada.

Os efeitos dos produtos à base de *Bacillus*, que foram mais evidentes em inibir a germinação dos uredósporos e controlar a doença em folhas destacadas, não ficaram evidentes nos ensaios de casa de vegetação e campo. Apesar da sequência lógica para testar agentes de controle biológico ser de *in vitro* para *in vivo* controlado e deste para *in vivo* não controlado (BETTIOL, 1991), a correlação entre os resultados nem sempre é observada (GHINI e NAKAMURA, 2001). Mesmo buscando estabelecer nos testes *in vitro* que as variáveis como temperatura e umidade se aproximassem das condições de campo, o ambiente abiótico da parte aérea das plantas, que estão em casa de vegetação e no campo, está sujeito a maiores variações ambientais; a temperatura e umidade variam mais amplamente e rapidamente e os microrganismos estão expostos à radiação ultravioleta e sujeitos a serem carregados pela água das chuvas (BAKER e COOK, 1974). Além disso, os produtos aplicados em condições de campo não atingem de maneira homogênea toda a planta. De maneira geral, a deposição no terço médio e inferior do dossel ficam comprometidas (CUNHA et al., 2006). Desta forma, podem ser também atribuídos a esses fatores os resultados menos consistentes deste estudo, principalmente, dos produtos biológicos, em casa de vegetação e campo. No entanto, Mantecón (2008), ao utilizar os isolados de *B. subtilis*

QST 713 e *B. pumilus* QST 2808 para controlar a mancha-parda (*Septoria glycines*) na cultura da soja, em condições de campo, constatou que o controle da doença só foi possível aumentando a concentração de células da calda de aplicação de  $6,7 \times 10^6$  para  $2,7 \times 10^7$  UFC/mL. Baker et al. (1985), em trabalho utilizando em condições de campo os isolados de *B. subtilis* promissores em testes controlados para o controle da ferrugem do feijão (*Uromyces phaseoli*), demonstraram que o controle da doença foi igual ao proporcionado pelo fungicida Mancozeb quando as aplicações do isolado PPL-3 de *B. subtilis* passaram de uma para três vezes por semana. Assim, novos estudos devem ser conduzidos no patossistema *P. pachyrhizi* x soja, para elucidar se um ajuste na concentração de células ou no número de aplicações seria suficiente para obter um controle satisfatório da doença.

Apesar da desfolha antecipada ser o principal dano causado por *P. pachyrhizi* nas plantas e causar perdas de produtividade e desordens fisiológicas que origina menor número de vagens, sementes por vagem e peso do grão (RIBEIRO e COSTA, 2000), não foi possível avaliar os componentes de produção e, conseqüentemente, relacionar os tratamentos com perdas ou ganhos de produtividade. Sabe-se, no entanto, que valores de produtividade podem ser iguais apesar dos diferentes níveis da doença observados em cada tratamento no campo (MESQUINI et al., 2011a). Essa informação necessita ser obtida nos próximos estudos.

A alta pressão de inóculo na casa de vegetação e o severo ataque de *P. pachyrhizi* em condições de campo colocaram à prova os produtos alternativos empregados da mesma forma que o fungicida em manejo comercial. No entanto, o controle alternativo, diferente do químico, não apresenta efeito imediato e espetacular (BETTIOL, 1991). Os resultados positivos envolvendo os produtos testados devem ser observados com atenção, melhorados e, possivelmente, empregados no manejo da ferrugem asiática da soja.

## 8 CONCLUSÃO

Os óleos de café, cru ou torrado, inibiram a germinação dos uredósporos de *P. pachyrhizi* e reduziram a ferrugem asiática da soja.

*Bacillus subtilis* QST 713 inibiu a germinação de uredósporos e reduziu a ferrugem asiática da soja.

*Bacillus pumilus* e o isolado AP-3 de *B. subtilis* foram eficientes na redução da doença em condições controladas.

O fungicida piraclostrobina + epoxiconazol foi eficiente em controlar a ferrugem em todas as condições estudadas.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEYSINGHE, S. Induced systemic resistance (ISR) in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) mediated by rhizobacteria against bean rust caused by *Uromyces appendiculatus* under greenhouse and field conditions. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, Abingdon, v. 41, n. 11, p. 1079-1087, 2009.
- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5th. ed. Amsterdam: Elsevier Academic, 2005. 822 p.
- ALMADA, C.B.J.; LIMA, C.Z.R.L,Z; POSSAMAI, C.J. Controle alternativo do míldio (*Pseudoperonospora cubensis*) em pepino (*Cucumis sativus* L). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.23, p.294, 1998.
- ALMEIDA, A. M. R. et al. Doenças da soja. In: KIMATI, H. et al. (Eds.). **Manual de fitopatologia; Doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. p. 569-588.
- ALVES, S. A. M.; FURTADO, G. Q.; BERGAMIN FILHO, A. Influência das condições climáticas sobre a ferrugem da soja. In: Zambolim L (Ed.). **Ferrugem-asiática da soja**. Viçosa: Suprema Gráfica e Editora Ltda. , 2006. p. 37-59.
- ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S. The success of BNF in soybean in Brazil. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 252, n.1, p. 1-9, 2003.
- AZEVEDO, L.A.S.; JULIATTI, F.C.; BARRETO, M. Resistência de genótipos de soja à *Phakopsora pachyrhizi*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.33, n.3, p.252-257, 2007.
- BAKER, K. F.; COOK, R. J. **Biological control of plant Pathogens**. San Francisco: WH Freeman and Co. 1974. 110 p.
- BAKER, C. J.; STAVELY, J. R.; MOCK, N. Biocontrol of bean rust by *Bacillus subtilis* under field conditions. **Plant Disease**. Saint Paul, v. 69, n.9, p. 770-772,1985.

BETTIOL, W. Seleção de microrganismos antagônicos a fitopatógenos. In: BETTIOL, W. **Controle Biológico de Doenças de Plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, 1991. p. 223-236.

BETTIOL, W.; BRANDÃO, M.S.B.; SAITO, M.L. Controle da ferrugem do feijoeiro com extratos e células formuladas de *Bacillus subtilis*. **Summa Phytopathologica**. Jaguariúna. v.18, p. 153-159, 1992.

BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B.; PINTO, V. Z.; PAULA JUNIOR, T. J.; CORRÊA, E. D.; MOURA, A. B.; LUCON, C. M. M.; COSTA, J. C. B.; BEZERRA, J. L. **Produtos comerciais a base de agentes de biocontrole de doenças de plantas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2012a. 155 p. (Documentos, 88).

BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B.; PINTO, V. Z.; GODOI, L.; LUCON, C. M. M.; LOBO-JUNIOR, M.; COSTA, J. C. B.; PAULA JUNIOR, T. J.; TEIXEIRA, H.; MOURA, A. B.; Quantificação e identificação de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2012b. 9p. Disponível em: <[http://www.cnpma.embrapa.br/down\\_site/forum/2012/bacillus/ApostilaCursoBacillus2012.pdf](http://www.cnpma.embrapa.br/down_site/forum/2012/bacillus/ApostilaCursoBacillus2012.pdf)>. Acesso em: 08 maio 2013.

BLACK, R. J. Complexo soja: fundamentos, situação atual e perspectiva. In: CÂMARA, G. M. S. (Ed.). **Soja: tecnologia de produção II**. Piracicaba: ESALQ, 2000. p.1-18.

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. (Ed.). **A soja no Brasil**. Campinas: ITAL, 1981. p. 1-6.

BONATO, E. R.; BONATO, A. L. V. **A soja no Brasil: historia e estatística**. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1987. p. 8 -10. (Documentos, 21).

BORÉM, A. Escape gênico: os riscos do escape gênico da soja no Brasil. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Viçosa, v. 10, p. 101-107, 1999.

BOTTONE, E. J.; PELUSO, R. W. Production by *Bacillus pumilus* (MSH) of an antifungal compound that is active against *Mucoraceae* and *Aspergillus* species: preliminary report. **Journal of Medical Microbiology**, London, v. 52, n. 1, p. 69-74, 2003.

BURMEISTER, L.; BERNHARD HAU, B. Control of the bean rust fungus *Uromyces appendiculatus* by means of *Trichoderma harzianum*: leaf disc assays on the antibiotic



effect of spore suspensions and culture filtrates. **Biological Control**, Dordrecht, v. 54, p. 575–585, 2008.

CARVALHO JUNIOR, A. A.; FIGUEREDO, M. B. A verdadeira identidade da ferrugem da soja no Brasil. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 26 p. 197-200, 2000.

CARVALHO, L. V.; CUNHA, R. L.; SILVA, N. R. N. Alternativas de controle de doenças do cafeeiro. **Coffee Science**. Lavras, v. 7, n. 1, p. 42-49, 2012.

CHUNG, G.; SINGH, R.J. Broadening the Genetic Base of Soybean: A Multidisciplinary Approach. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 27, n.5, p. 295-341, 2008.

CONAB. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira**: grãos: safra 2012/2013. Brasília: CONAB, 2012. 36p. Disponível em:  
<[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12\\_10\\_09\\_15\\_59\\_18\\_boletim\\_portugues\\_outubro\\_2012.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_10_09_15_59_18_boletim_portugues_outubro_2012.pdf)> Acesso em: 06 mai. 2013.

COSTA, M.J.N., ZAMBOLIM, L. & RODRIGUES, F.A. Avaliação de produtos alternativos no controle da ferrugem do cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.32, p. 150-155. 2007.

CUMMINS, G.B.; HIRATSUKA, Y. **Illustrated genera of rust fungi**. 3 ed. Saint Paul: The American Phytopathological Society, 2003. 240 p.

CUNHA, J. P. A. R.; REIS, E. F.; SANTOS, R. O. Controle químico da ferrugem asiática da soja em função de ponta de pulverização e de volume de calda. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, .n5, p. 1360-1366, 2006.

DEISING, H. B.; WERNER, S.; WERNITZ, M. The role of fungal appressoria in plant infection. **Microbes and Infection**, Paris, v. 2, n. 13, p. 1631-1641, 2000.

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

FREDERICK, R. D.; SYNER, C.; PRETERSON, G. L.; BLONDE, M. R. Polymerase chain reaction assays for the detection and discrimination of the soyben rust pathogens *Phakopsora pachyrhizi* and *P. meibomia*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 92, n. 2, p. 217-227. 2002.

FURTADO, G. Q.; ALVES, S. A. M.; CARNEIRO, L. C.; GODOY, C. V.; MASSOLA JUNIOR, N. S. Influência do estágio fenológico e da idade dos trifólios de soja na infecção de *Phakopsora pachyrhizi*. **Tropical Plant Phatology**, Brasília, v. 34, n. 2, p. 118-122. 2009.

- GHINI, R.; NAKAMURA, D. Seleção de antagonistas e nutrientes que induzem supressividade de solos a *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em microcosmos e in vivo. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v.27, n.3, p.318-322, 2001.
- GODOY, C. V. ; COSTAMILAN, L M ; CANTERI, M. G.; ALMEIDA, A. L. ; PIUGA, F.F. Análise temporal do progresso da ferrugem da soja em Londrina (PR). In: Congresso Brasileiro de Fitopatologia. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28. p. 386. 2003
- GODOY, C.V.; CANTERI, M.G. Efeito protetor, curativo e erradicante de fungicidas no controle da ferrugem da soja causada por *Phakopsora pachyrhizi*, em casa de vegetação. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.29, p. 97-101, 2004.
- GODOY, C. V.; KOGA, L. J.; CANTERI, M. G. Escala diagramática para avaliação da ferrugem da soja. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, p. 63-68, 2006.
- GODOY, C.V.; PIMENTA, C.B.; WRUCK, D.S.M. Eficiência de fungicidas para controle da ferrugem asiática da soja, *Phakopsora pachyrhizi*, na safra 2006/07. resultados sumarizados dos ensaios em rede. (**Embrapa Soja, Circular Técnica, 42**). Londrina: Embrapa Soja, 8 p. 2007.
- 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.
- GUZZO, S.D.; CASTRO, R.M.; KIDA, K.; MARTINS, E.M.F. AÇÃO PROTETORA DO ACIBENZOLAR-S-METHYL EM PLANTAS DE CAFEEIRO CONTRA FERRUGEM. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.68, p.89-94, 2001.
- HADDAD, F. **Controle biológico da ferrugem do cafeeiro**. Programa de Pós-graduação em Fitopatologia- Universidade Federal de Viçosa. Viçosa. 2008. Tese (Doutorado).
- HADDAD, F.; MAFFIA, L.A.; MIZUBUTI, E. S. G.; TEIXEIRA, H. Biological control of coffee rust by antagonistic bacteria under field conditions in Brazil. **Biological Control**, Dordrecht, v.49, p. 114-119, 2009.
- HIRANO, M.; HIKISHIMA, M.; SILVA, A.J.; XAVIER, S.A.; CANTERI, M.G. Validação de escala diagramática para estimativa de desfolha provocada pela ferrugem asiática em soja. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.36, n.3, p.248-250, 2010.
- ISARD, S. A., N. S. DUFAULT, M. R. MILES, G. L. HARTMAN, J. M. RUSSO, E. D. DE WOLF, AND W. MOREL. The effect of solar irradiance on the mortality of *Phakopsora pachyrhizi* urediniospores. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 90, p. 941-945, 2006.
- INDEX FUNGORUM. Disponível em:  
<<http://www.indexfungorum.org/Names/NamesRecord.asp?RecordID=121037>>.  
Acesso em: 07 mai. 2013.

- JACCOUD FILHO, D. S.; SILVA, O. C.; GODOY, C.; MENDES, C.; PASSINI, F. B. Soybean asian rust report in the State of Paraná. In: Fernando César Juliatti. (Org.). **Soybean Asian Rust: Etiology, Epidemiology and Management**. Uberlândia: Editora da Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, p. 107-119, 2006
- JAHAGIRDAR, S.; PATIL, P. V.; BENAGI, V. I. Bio-formulations and indigenous technology methods in the management of Asian soybean rust. **International Journal of Plant Protection**, Ghaziabad, v. 5, p. 63-67, 2012.
- JESUS JUNIOR, W.C.; VALE, F. X. R.; COELHO, R. R.; HAU, B.; ZAMBOLIM, L.; COSTA, L. C.; BERGAMIN FILHO, A. Effects of angular leaf spot and rust on yield loss of *Phaseolus vulgaris*. **Phytopathology**, Saint Paul, v.11, p.1045-1053, 2001.
- KIMATI, H., AMORIM, L., REZENDE, J.A.M., BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**. v.2. 4 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005.
- KOCHMAN, J. K. Effect of Temperature on Development of Soybean Rust (*Phakopsora pachyrhizi*). **Australian Journal of Agricultural Research**, Melbourne, v. 30, p. 273-277, 1979.
- KUPPER, K. C.; BELLOTTE, J. A. M.; GOES, A. Controle alternativo de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 31, n. 4, p. 1004-1015, 2009.
- LAHLAI, R.; PENG, G.; MCGREGOR, L.; GOSSEN, B. D. Mechanisms of the biofungicide Serenade (*Bacillus subtilis* QST 713) in Puppessing clubroot. **Biocontrol Science and Technology**, Abingdon, v. 21, p. 1351-1362, 2011.
- LAZZAROTTO, J. J.; HIRAKURI, M. H. Evolução e perspectivas de desempenho econômico associadas com a produção de soja nos contextos mundial brasileiro. (**EmbrapaSoja. Documentos, 319**). Londrina: Embrapa Soja, p. 46, 2010.
- LEELASUPHAKUL, W. et al. Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum*) of citrus fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.48, p.113-121, 2008.
- MAFFIA, L. A.; HADDAD, F.; MIZUBUTI, E. S. G. Controle biológico da ferrugem do cafeeiro. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (eds). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. p. 267-276, 2009.
- MANTECÓN, J. D. Efficacy of chemical and biological strategies for controlling the soybean brown spot (*Septoria glycines*). **Ciencia e Investigación Agraria**, Santiago, v. 38, n. 2, p.211-214, 2008.

- MARRONE P. G. An effective biofungicide with novel modes of action. **Pesticide Outlook**, Cambridge, v. 13, n. 5, p. 193–194, 2002.
- MEDICE, R.; ALVES, E.; TADEU DE ASSIS, R.; MAGNO JÚNIOR, R. G.; LOPES, E. A. G. L. Óleos essenciais no controle da ferrugem asiática da soja. **Ciência Agrotecnológica**. Lavras, v. 31. n. 1, p. 93-90, 2007
- MELCHING, J. S.; DOWLER, W. M.; KOOGLE, D. L.; ROYER, M. H. Effect of plant age on susceptibility of soybean to soybean rust. **Canadian Journal of Plant Pathology**. Ontário, v. 10, n. 10, p. 30-35, 1988.
- MESQUINI, R. M.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; NASCIMENTO, J. F.; BALBI-PEÑA, M. I. Efeito de produtos naturais na indução de fitoalexinas em cotiledões de soja na germinação de urediniósporos de *Phakopsora pachyrhizi*. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 2, n. 2. p. 1091-1094, 2007.
- MESQUINI, R. M.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; VIEIRA, R. A.; NASCIMENTO, J. F. Controle e progresso temporal da ferrugem asiática da soja sob controle alternativo em campo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.37, n.1, p.24-29, 2011a.
- MESQUINI, R. M.; VIEIRA, R. A.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; GODOY, C. V. Relações de causa e efeito entre condições ambientais, urediniósporos e severidade de ferrugem asiática da soja. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 27, n. 4, p. 552-557, 2011b.
- MITZUBUTI E. S. G.; L. MAFFIA; J. MUCHOVEJ; R. ROMEIRO; U. BATISTA: Selection of Isolates of *Bacillus subtilis* with Potential for the Control of Dry Bean Rust, **Fitopatologia Brasileira**, Brasília. v. 20, p. 540-544, 1995.
- MODESTO, J. C.; FENILLE, R.C.; HABERMANN, G. Efeito de fungicidas no controle da ferrugem do feijoeiro causada por *Uromyces appendiculatus* em condições de campo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, p. 245-248, 2005.
- MORANDI, M. A. B; BETTIOL W. Controle biológico de doenças de plantas no Brasil. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. (Ed.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa- CNPMA. p. 7-14, 2009.
- ONGENA, M.; JACQUES, P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. **Trends in Microbiology**, Oxford, v. 16, n. 3, p. 115-125, 2008.
- ONO, Y.; BURITICA, P.; HENNEN, J. F. Delimitation of *Phakopsora*, *Physopella* and *Cerotelium* and their species on leguminosae. **Mycological Research**, Cambridge, v. 96, n. 10, p. 825-850, 1992.
- PEREIRA, R. B.; LUCAS, G. C.; PERINA, F. J.; ALVES, E. Óleos essenciais no controle da ferrugem do cafeeiro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 36, n. 1, 2012.

PHAE, C.; SODHA, M. Investigation of optimal conditions for separation of iturin an antifungal peptide produced by *Bacillus subtilis*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v.71, n.2, p.118-121, 1991.

REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL, 31., 2010, Brasília, DF. **Ata...** Londrina: Embrapa Soja, 2010. Disponível em: <[http://www.cnpso.embrapa.br/rpsrcb/downloads/normas\\_fitopatologia.pdf](http://www.cnpso.embrapa.br/rpsrcb/downloads/normas_fitopatologia.pdf)>. Acesso: 08 mai. 2013.

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

RIBEIRO, A.L.P.; COSTA, E.C. Desfolhamento em estádios de desenvolvimento da soja, cultivar BR 16, no rendimento de grãos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.30, n.5, p.767-771, 2000.

SAKSIRIRAT, W.; HOPPE, H. Degradation of Uredospores of the Soybean Rust Fungus (*Phakopsora pachyrhizi* Syd.) by Cell-Free Culture Filtrates of the Mycoparasite *Verticillium Psalliotae*. **Journal of Phytopathology**, Berlim, v. 132, p. 33–45, 1991.

SAKSIRIRAT, W.; KITTITHAM, R.; PACHINBURAVAN, A. Biological control approach of soybean rust. **Kaen Kaset**: Khon Kaen Agriculture Journal, v. 24, n. 3, p. 108-115, 1996.

SANGIT, K.; JHA, D. K. *Trichothecium roseum*: a pontencial agent for the biological control of soybean rust. **Indian Phytopathology**, New Delhi, v. 55, n. 2, p. 232-234, 2002

SEDIYAMA, T. (Org.). **Tecnologias de produção e usos da soja**. 1. ed. Londrina: Mecenas, 2009. 314 p.

SINCLAIR, J. B.; HARTMAN, G. L. Soybean rust. In: HARTMAN, G. L.; SINCLAIR, J. B.; RUPE, J. C. (Eds.). **Compendium of soybean diseases**, Saint Paul, 4 ed., p. 25-26, 1999.

SCHERB, C. T; MEHL, A. **FRAC (Fungicide Resistance Action Committee) – Phakopsora pachyrhizi**: detached leaf test. 2006. Disponível em: <[http://www.frac.info/frac/Monitoring\\_Methods/anhang/PHAKPA\\_deached\\_leaf\\_monitoring\\_method\\_BCS\\_2006\\_V1.pdf](http://www.frac.info/frac/Monitoring_Methods/anhang/PHAKPA_deached_leaf_monitoring_method_BCS_2006_V1.pdf)>. Acesso em: 08 ago. 2012.

SCHERM, H.; CHRISTIANO, R. S. C.; ESKER, P. D.; DEL PONTE, E. M.; GODOY, C. V. Quantitative review of fungicide efficacy trials for managing soybean rust in Brazil. **Crop Protection**, Amsterdam, v. 28, n.9, p. 774-782, 2009.

- SERRANO, L.; MANKER, D.; BRANDI, F.; CALI, T. The use of *Bacillus subtilis* QST 713 and *Bacillus pumilus* QST 2808 as protectant fungicides in conventional application programs for black leaf streak control. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 986. p. 149-155, 2013
- SOARES, R. M.; GAZZIERO, D. L. P.; MORITA, D. A. S.; CILIATO, M. L.; FLAUSINO, A. M.; SANTOS, L. C. M.; JANEGITZ, T. Utilização de glifosato para o controle da ferrugem da soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 4, p. 473-477, 2008.
- SOUSA, P. F. C., ALVES, A.; CASTRO, H. A.; SOUZA, P. E.; ALMEIDA, A. M. R.; HOCHENBACH, S. R. Distribuição e identificação de *Phakopsora pachyrhizi*, agente causal da ferrugem asiática da soja no estado de Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 41, p. 672-677, 2007.
- TOURÉ, Y.; ONGENA, M.; JACQUES, P.; GUIRO, A.; THONART, P. Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 96, n. 5, p. 1151-1160, 2004.
- VALENCIO, S. A. X., **Monitoramento da sensibilidade do fungo *Phakopsora pachyrhizi* e *Corynespora cassiicola* a fungicidas**. Programa de Pós-graduação em Fitopatologia. Universidade Estadual de Londrina. Londrina. 2012. Dissertação (Mestrado)
- VENCATO, A. Z. **Anuário Brasileiro da Soja 2010**. Santa Cruz do Sul: Gazeta Santa Cruz, 2010. 144 p.
- VOEGELE, R. T.; MENDGEN, K. Rust haustoria: nutrient uptake and beyond. **New Phytologist**, London, v. 159 p. 93-100, 2003.
- YANG, X. B.; TSCHANZ, A. T.; DOWLER, W. M.; WANG, T. C. Development of yield loss models in relation to reductions of components of soybean infected with *Phakopsora pachyrhizi*. **Journal of Phytopathology**, Hamburg, v. 81, n. 11, p. 420-426, 1991.
- YORINORI, J.T. Ferrugem Asiática da soja (*Phakopsora pachyrhizi*): ocorrência no Brasil e estratégias de manejo. In: ENCONTRO BRASILEIRO SOBRE DOENÇAS DA CULTURA DA SOJA, 2, 2002, Passo Fundo. **Anais**. Passo Fundo : Aldeia Norte, 2002. p.47-54.
- YORINORI, J. T.; LAZZAROTTO, J. J. **Situação da ferrugem asiática da soja no Brasil e na América do Sul**. Londrina: Embrapa Soja, 2004. 27 p. (Documentos, 236)
- YORINORI, J. T.; PAIVA, W. M.; FREDERICK, R. D.; COSTAMILAN, L. M.; BERTAGNOLLI, P. F.; HARTMAN, G. E.; GODOY, C. V.; NUNES JUNIOR, J.

Epidemics of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Brazil and Paraguay. **Plant Disease**, Saint Paul, v.89, p. 675-677, 2005.

WAGACHA, J. M.; MUTHOMI, J. W.; MUTITU, E. W.; MWAURA, F. B. Control of Bean Rust using Antibiotics Produced by *Bacillus* and *Streptomyces* species- Translocation and Persistence in Snap Beans. **Journal of Applied Sciences and Environmental Management**, Port Harcourt, v.11, n. 2, p. 165 - 168, 2007.

WARD, N. Effects of field inoculations of soybeans with the mycophilic fungus *Simplicillium lanosoniveum* on *Phakopsora pachyrhizi* and soybean rust. **Final Report**. 2011

Disponível em: <

<http://mysare.sare.org/mySARE/ProjectReport.aspx?do=viewRept&pn=GS09-085&y=2011&t=1>> . Acesso em: 08/08/2013

WARD, N. A.; C. L. ROBERTSON, C. L.; CHANDA, A. K.; SCHNEIDE, R. W. Effects of *Simplicillium lanosoniveum* on *Phakopsora pachyrhizi*, the Soybean Rust Pathogen, and Its Use as a Biological Control Agent. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 102, n. 8 p. 749-760, 2012.

WSZELAKI, A. L.; MILLER, S. A. Determining the efficacy of disease management products in organically-produced tomatoes. **Plant Health Progress**, Saint Paul, 2005.

Disponível em:<

<http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/research/2005/tomato/>>. Acesso em: 10 mai. 2013

ZAMBENEDETTI, E. B.; ALVES, E.; ARAÚJO, D. V. Eventos dos processos de pré-penetração, penetração e colonização de *Phakopsora pachyrhizi* em folíolos de soja. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 2, p.156-160, 2007.

ZAMBOLIM, L., VALE, F.X.R., PEREIRA, A.A. & CHAVES, G.M. Café (*Coffea arabica* L.), controle de doenças causadas por fungos, bactérias e vírus. In: VALE, F. X. R. e ZAMBOLIM, L. (Eds.) **Controle de doenças de plantas**. Viçosa: Suprema Gráfica e Editora, 1997.p. 83-180.