

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

JOELITON CAMPANI DOS SANTOS

**AÇÃO DE *Pseudomonas fluorescens* SOBRE FUNGOS DE SOLO E COMO
PROMOTORA DE CRESCIMENTO COM A ASSOCIAÇÃO DE *Azospirillum
brasilense* EM PLANTAS DE SOJA**

**DOIS VIZINHOS
2022**

JOELITON CAMPANI DOS SANTOS

AÇÃO DE *Pseudomonas fluorescens* SOBRE FUNGOS DE SOLO E COMO PROMOTORA DE CRESCIMENTO COM A ASSOCIAÇÃO DE *Azospirillum brasilense* EM PLANTAS DE SOJA

ACTION OF *Pseudomonas fluorescens* ON SOIL FUNGI AND AS GROWTH PROMOTER WITH THE ASSOCIATION OF *Azospirillum brasilense* IN SOYBEAN PLANTS

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentada como requisito para obtenção do título de Bacharel em Agronomia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientador(a): Prof. Dr. Sérgio Miguel Mazaro.

DOIS VIZINHOS

2022



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)

Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, para fins não comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es). Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

JOELITON CAMPANI DOS SANTOS

**AÇÃO DE *Pseudomonas fluorescens* SOBRE FUNGOS DE SOLO E COMO
PROMOTORA DE CRESCIMENTO COM A ASSOCIAÇÃO DE *Azospirillum
brasiliense* EM PLANTAS DE SOJA**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação
apresentado como requisito para obtenção do título de
Bacharel em Agronomia da Universidade Tecnológica
Federal do Paraná (UTFPR).

Data de aprovação: 31/agosto /2022

Sérgio Miguel Mazaró
Doutor em Produção Vegetal
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Lucas da Silva Domingues
Doutor em Agronomia
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Maira Cristina Schuster Russiano
Doutoranda em Produção Vegetal
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

DOIS VIZINHOS

2022

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida, bênçãos concedidas e por me proporcionar chegar até aqui.

Nesta vida nada se conquista sozinho, gostaria de aqui agradecer a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para que esse trabalho fosse concluído.

Agradeço aos meus pais José e Sônia, que sempre me apoiaram, por toda força ao longo desta jornada. Também a minha irmã Kauany por todo apoio, vocês são minha maior inspiração. A vocês toda minha gratidão.

Ao meu orientador Prof. Dr. Sérgio Miguel Mazaro, os meus agradecimentos pela confiança, compreensão e orientação durante esse período. Aos colegas do grupo de pesquisa e laboratório, por todos os momentos de aprendizagem, bem como por toda a parceria, em especial a Cristina e Maira por auxiliar na montagem do experimento.

Os meus agradecimentos à UTFPR-DV, professores e demais servidores, aos meus amigos e colegas de graduação por todas as experiências, aprendizados e momentos de troca.

Por fim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram nesta etapa da minha vida.

Muito obrigado.

“É necessário fazer outras perguntas, ir atrás das indagações que produzem o novo saber, observar com outros olhares através da história pessoal e coletiva, evitando a empáfia daqueles e daquelas que supõem já estar de posse do conhecimento e da certeza”.

(Mario Sergio Cortella)

RESUMO

A soja (*Glycine max*) é a principal cultura produtora de grãos entre as leguminosas, sendo uma *commodity* de grande importância na economia mundial, pois fornece matéria prima a diversas indústrias, principalmente, para alimentação animal e humana. Dentre os principais fatores que afetam os rendimentos da cultura destacam-se as doenças causadas por diferentes fitopatógenos, sendo que o uso de produtos químicos, além de estarem perdendo sua eficiência, possuem um apelo ambiental para a redução do uso. Em face dessa realidade, torna-se necessária a adesão por alternativas de manejo mais sustentáveis, como o uso de agentes de biocontrole. Para tal, é importante o estudo de microrganismos promissores como as rizobactérias *Pseudomonas fluorescens* e *Azospirillum brasilense* que atuam benéficamente em associação com as plantas, promovendo seu crescimento e solubilizando nutrientes presentes nos solos, além de apresentar potencial antagonista sobre fungos de solo. Nesse sentido, foram desenvolvidos dois experimentos, sendo o primeiro com o objetivo de avaliar o potencial da rizobactéria *Pseudomonas fluorescens* no controle *in vitro* dos fitopatógenos de solo *Fusarium tucumaniae*, *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Phomopsis longicolla* e *Rhizoctonia solani* que acometem a cultura da soja. No segundo experimento, buscou-se avaliar a eficiência de *Pseudomonas fluorescens* em associação com *Azospirillum brasilense* na promoção de crescimento de plantas de soja. O experimento *in vitro*, foi realizado no laboratório de bioquímica da Universidade Tecnológica Federal do Paraná-Campus Dois Vizinhos, seguindo o método de confronto direto por pareamento. Composto por dez tratamentos, sendo eles T1; T2; T3; T4 e T5 (Testemunhas com os patógenos) e T6= *Pseudomonas fluorescens* + *Fusarium tucumaniae*; T7= *Pseudomonas fluorescens* + *Macrophomina phaseolina*; T8= *Pseudomonas fluorescens* + *Sclerotinia sclerotiorum*; T9= *Pseudomonas fluorescens* + *Phomopsis longicolla* e T10= *Pseudomonas fluorescens* + *Rhizoctonia solani*. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado (DIC), com quatro repetições. Avaliou-se o crescimento micelial dos fungos e a formação de halos de inibição a cada 24h, com duração de 192 horas. No segundo experimento, para avaliar a atuação das rizobactérias como promotoras de crescimento, realizou-se a inoculação das sementes, e essas semeadas em tubos de PCV de 200mm x 70cm, contendo substrato. O experimento foi composto por quatro tratamentos sendo eles T1= Testemunha; T2= *Azospirillum brasilense*; T3= *Pseudomonas fluorescens* e T4= *Azospirillum brasilense* + *Pseudomonas fluorescens*. Seguindo DIC como delineamento experimental, com quatro repetições. Onde avaliou-se o comprimento parte aérea, comprimento sistema radicular e massa verde da parte aérea e do sistema radicular. Os resultados foram submetidos ao teste de normalidade de Lilliefors, posteriormente à análise de variância (ANOVA) e as médias agrupadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. De maneira geral, nas condições do presente trabalho, a bactéria *Pseudomonas fluorescens* apresentou redução no crescimento micelial apenas de *Fusarium tucumaniae*. E apresentou resultados promissores na promoção de crescimento da soja quando associada com *Azospirillum brasilense*.

Palavras chave: Antagonismo. Fitopatógenos. Rizobactérias. *Glycine max*

ABSTRACT

Soybean (*Glycine max*) is the main grain-producing crop among legumes, being a *commodity* of great importance in the world economy, as it provides raw material to various industries, mainly for animal and human feeding. Among the main factors that affect crop yields are diseases caused by different phytopathogens, and the use of chemicals, in addition to losing their efficiency, have an environmental appeal to reduce use. In view of this reality, it is necessary to be adhering to more sustainable management alternatives, such as the use of biocontrol agents. For this, it is important to study promising microorganisms such as the rhizobacteria *Pseudomonas fluorescens* and *Azospirillum brasilense* that act beneficially in association with plants, promoting their growth and solubilizing nutrients present in soils, besides presenting antagonistic potential on soil fungi. In this sense, two experiments were developed, the first with the objective of evaluating the potential of the rhizobacterium *Pseudomonas fluorescens* in the *in vitro* control of soil phytopathogens *Fusarium tucumaniae*, *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Phomopsis longicolla* and *Rhizoctonia solani* that affect soybean culture. In the second experiment, we sought to evaluate the efficiency of *Pseudomonas fluorescens* in association with *Azospirillum brasilense* in promoting soybean plant growth. The *in vitro* experiment was carried out in the biochemistry laboratory of the Federal Technological University of Paraná-Campus Dois Vizinhos, following the method of direct confrontation by pairing. Composed of ten treatments, being T1; T2; T3; T4 and T5 (Witnesses with pathogens) and T6= *Pseudomonas fluorescens* + *Fusarium tucumaniae*; T7= *Pseudomonas fluorescens* + *Macrophomina phaseolina*; T8= *Pseudomonas fluorescens* + *Sclerotinia sclerotiorum*; T9= *Pseudomonas fluorescens* + *Phomopsis longicolla* and T10= *Pseudomonas fluorescens* + *Rhizoctonia solani*. The experimental design adopted was completely randomized (IHD), with four replications. The mycelial growth of fungi and the formation of inhibition halos every 24 h, lasting 192 hours, were evaluated. In the second experiment, to evaluate the performance of rhizobacteria as growth promoters, seeds were inoculated, and they were sowed in PCV tubes of 200mm x 70cm, containing substrate. The experiment consisted of four treatments, t1= control; T2= *Azospirillum brasilense*; T3= *Pseudomonas fluorescens* and T4= *Azospirillum brasilense* + *Pseudomonas fluorescens*. Following IHD as an experimental design, with four replications. The aerial length, root system length and green mass of the shoot and root system were evaluated. The results were submitted to Lilliefors normality test, after variance analysis (ANOVA) and the means grouped by Tukey test at 5% probability. In general, under the conditions of the present study, the bacterium *Pseudomonas fluorescens* showed a reduction in mycelial growth only of *Fusarium tucumaniae*. And it showed promising results in promoting soybean growth when associated with *Azospirillum brasilense*.

Keywords: Antagonism. Phytopathogens. Rhizobacteria. *Glycine max*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Mecanismo de promoção do crescimento das plantas por rizobactérias.....25
- Fotografia 1 - A) Repicagem dos discos de micélio dos microrganismos em câmara de fluxo. B) Discos dos microrganismos postos nas placas de Petri® em meio de cultura BDA. C) Placas vedadas e acondicionadas em BOD sob fotoperíodo de 12 horas a 25°28
- Fotografia 2 - Unidade experimental composta do disco de micélio de testemunha de *M. phaseolina*, apresentando os eixos x e y, utilizados para avaliar o crescimento micelial.....30
- Fotografia 3 - A) Semeadura das sementes de soja em vasos realizada de forma manual, correspondentes a cada tratamento. B) Plantas germinadas no estágio vegetativo V1. C) 20 dias após a germinação, plantas em V3-V4, momento de desbaste.....31
- Fotografia 4 - A) Plantas acondicionadas em bandejas posterior remoção de excesso de solo aderido no sistema radicular, identificadas e separadas conforme os respectivos tratamentos. B) Avaliação do comprimento do sistema radicular e da parte aérea.....32
- Gráfico 1- Resultado do potencial antagonista de *Pseudomonas fluorescens*. Através do confronto direto no controle biológico *in vitro* de *Fusarium tucumaniae* em 192 horas de avaliação.....33
- Fotografia 5 - Efeito de *P. fluorescens* na redução do crescimento micelial *in vitro* dos patógenos A) *Fusarium tucumaniae* B) *Macrophomina phaseolina* C) *Sclerotinia sclerotiorum*. D) *Phomopsis longicolla* e E) *Rhizoctonia solani*, em 120 horas após o início das avaliações.....34
- Gráfico 2- Resultado do potencial antagonista de *Pseudomonas fluorescens*. Através do confronto direto no controle biológico *in vitro* de *Macrophomina phaseolina* em 192 horas de avaliação.....34
- Fotografia 6 - A) Potencial antagonista de *P. fluorescens* através do confronto direto, no controle biológico *in vitro* de *Macrophomina phaseolina* B) Potencial antagonista de *P. fluorescens* através do confronto direto, no controle biológico *in vitro* de *Sclerotinia sclerotiorum*.....35
- Gráfico 3- Resultado do potencial antagonista de *Pseudomonas fluorescens*. Através do confronto direto no controle biológico *in vitro* de *Sclerotinia sclerotiorum* em 192 horas de avaliação.....36
- Gráfico 4- Resultado do potencial antagonista de *Pseudomonas fluorescens*. Através do confronto direto no controle biológico *in vitro* de *Phomopsis longicolla* em 192 horas de avaliação.....36

**Gráfico 5- Resultado do potencial antagonista de *Pseudomonas fluorescens*.
Através do confronto direto no controle biológico *in vitro* de *Rhizoctonia solani*
em 192 horas de avaliação..... 37**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Promoção de crescimento em plantas de soja da cultivar BS1511 IPRO, avaliando as variáveis: comprimento parte aérea (CPA), comprimento sistema radicular (CSR), massa verde parte aérea (MVPA), massa verde sistema radicular (MVSR), oriundos de sementes inoculadas com a bactéria <i>Pseudomonas fluorescens</i> e ou associadas com <i>Azospirillum brasilense</i> . UTFPR, Dois Vizinhos – PR, 2022.....	38
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
BDA	Meio de cultivo, batata dextrose e ágar
BOD	Estufa incubadora Demanda Química do Oxigênio
CC	Capacidade de campo
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
CPA	Comprimento Parte Aérea
CSR	Comprimento Sistema Radicular
CV	Coeficiente de Variação
DIC	Delineamento Inteiramente Casualizado
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FBN	Fixação Biológica de Nitrogênio
MVPS	Massa Verde Parte Aérea
MVSR	Massa Verde Sistema Radicular
PGPR	Plant Growth Promoting Rhizobacteria
PIC	Percentual de Inibição do Crescimento Micelial
PR	Paraná
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná
V1	Estágio fenológico da soja, um par de folha unifolioladas
V3	Estágio fenológico da soja, dois trifólios completamente desenvolvidos
V4	Estágio fenológico da soja, três trifólios completamente desenvolvidos
V8	Estágio fenológico da soja, sete trifólios completamente desenvolvidos
V9	Estágio fenológico da soja, oito trifólios completamente desenvolvidos

LISTA DE SÍMBOLOS

cm	Unidade de medida, centímetros
°C	Unidade de medição de temperatura, graus célsius
g	Unidade de massa, gramas
L	Unidade de volume, litro
Kg	Unidade de grandeza em massa, quilogramas
mL	Unidade de volume
mm	Unidade de medida, milímetros
m ²	Unidade de medida, metros quadrados
N	Nitrogênio
N ²	Nitrogênio atmosférico
™	Marca comercial
®	Marca registrada
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 JUSTIFICATIVA	15
3 OBJETIVOS	17
3.1 Objetivo geral	17
3.2 Objetivos específicos	17
4 REVISÃO DA LITERATURA	18
4.1 Cultura da Soja	18
4.2 Doenças de solo que acometem a soja	19
4.2.1 <i>Fusarium tucumaniae</i>	20
4.2.2 <i>Macrophomina phaseolina</i>	21
4.2.3 <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	21
4.2.4 <i>Phomopsis longicolla</i>	22
4.2.5 <i>Rhizoctonia solani</i>	23
4.3 <i>Pseudomonas fluorescens</i>	23
4.4 <i>Azospirillum brasilense</i>	25
5 MATERIAL E MÉTODOS	27
5.1 Caracterização da área experimental	27
5.2 Material experimental	27
5.2.1 Obtenção e cultivo dos fitopatógenos.....	27
5.2.2 Obtenção dos agentes biológicos.....	28
5.3 Delineamento experimental e tratamentos	28
5.3.1 Controle de patógenos.....	28
5.3.2 Promoção de crescimento	29
5.4 Condução do experimento	29
5.4.1 Experimento - Confronto direto por pareamento	29
5.4.2 Promoção de crescimento em soja	31
5.6 Análises estatísticas	32
6 RESULTADOS E DISCUSSÕES	33
6.1 Controle de patógenos - confronto direto	33
6.2 Potencial na promoção de crescimento	38
7 CONCLUSÕES	40
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	41
REFERÊNCIAS	42

1 INTRODUÇÃO

A evolução do agronegócio proporcionou ao Brasil o posto de primeiro gigante alimentar tropical do mundo (ARTUZO *et al.*, 2018). Atendendo a demanda nacional e com destaque no mercado internacional, o Brasil é um dos principais produtores de alimentos e produtos agroenergéticos (RODRIGUES *et al.*, 2013; BORLACHENCO; GONÇALVES, 2017).

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] tem destaque como provedora de insumos para as indústrias de alimentação (humana e animal), química e de bioenergia, sendo o óleo e farelo os principais derivados do processamento do grão, o que acarreta na influência que a *commodity* detém sobre a taxa de crescimento do PIB (GAZZONI; DALL'AGNOL, 2018).

De acordo com Rezende *et al.* (2021), o mercado consumidor tende a procurar alimentos produzidos de forma sustentável. Nesta perspectiva, os bioinsumos destacam-se, pois atuam de forma direta e indireta sobre os cultivos, favorecendo no incremento da produtividade e no equilíbrio do ecossistema.

Para a cultura da soja, as doenças estão entre os principais fatores que provocam redução nos rendimentos. Variados são os agentes etiológicos que podem acometer a cultura. Estes são determinados conforme as condições de cada safra, e tendem a provocar diferentes danos às plantas, bem como quedas de produtividade (EMBRAPA SOJA, 2011). E assim, estabelecem mudanças ano a ano quanto ao panorama das doenças da soja, no que diz respeito ao aumento de severidade das doenças tanto as de parte aérea, quanto as doenças causadas por fungos de solo (ITO, 2013).

Embora a agricultura tenha evoluído em tecnologias e uso de insumos variados, é importante salientar que os rendimentos e aumento da produtividade dos cultivos dependem diretamente da qualidade do solo. O uso de bioprodutos promove o equilíbrio da comunidade biótica do solo além de assegurar a qualidade do mesmo, propiciando maior sustentabilidade agrícola (FERREIRA *et al.*, 2009).

As *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR) em tradução livre Rizobactérias Promotoras de Crescimento em Plantas, representam subgrupo de bactérias capazes de colonizar as raízes de vegetais e, assim, apresentam grande aptidão para sua utilização na agricultura (ZAGO *et al.*, 2000). A relação antagônica

de espécies bacterianas sobre patógenos, é uma importante estratégia do controle biológico, como algumas estirpes de *P. fluorescens* estando associadas ao estímulo de crescimento de plantas, bem como no biocontrole de fitopatógenos (ZAGO *et al.*, 2000; RAMAMOORTHY *et al.*, 2001; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Os patógenos de solo apresentam difícil controle, por vezes reduzem a eficiência de práticas como rotação de cultura, melhoramento genético de cultivares e aplicação de fungicidas no controle de doenças nas raízes. Neste sentido, algumas cepas de bactérias do gênero *Pseudomonas* e *Bacillus* são reconhecidas como antagonistas, tendo em vista a ação sobre vários patógenos de raiz, principalmente fungos de solo, num amplo número de plantas cultivadas (HAAS; DÉFAGO, 2005).

Sendo considerado um dos mais eficientes e conhecidos gêneros entre as RPCPs, o *Azospirillum* apresenta bactérias com a capacidade de incrementar o crescimento das plantas através de diferentes mecanismos (BASHAN; De-BASHAN, 2005). Os promotores de crescimento podem colonizar diferentes órgãos das plantas, deste modo promovendo efeitos benéficos, como estimular a germinação das sementes, desenvolvimento de órgãos reprodutivos bem como promoção do crescimento, tanto da parte aérea quanto do sistema radicular, influenciando positivamente no aumento da produtividade das culturas (DEY *et al.*, 2004).

Segundo Vicente (2019), tradicionalmente os agricultores utilizam apenas um gênero de bactéria na inoculação de sementes ou em sulco de plantio da soja. Quando utiliza-se o efeito sinérgico de dois microrganismos busca-se melhorar os resultados, superando os resultados de quando utilizados individualmente. Na co-inoculação, com o uso de *Bradyrhizobium spp.* Associado a *Azospirillum spp.*, são combinadas cepas ou espécies atuando em diferentes processos microbianos, de forma que os benefícios combinados de cada uma resultem em maiores rendimentos (FARIA, 2021).

Deste modo, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o potencial antagonista da rizobactéria *Pseudomonas fluorescens* sobre os principais fungos de solo que afetam a cultura da soja. Tal qual, sua eficiência como promotora de crescimento em plantas de soja ou quando associadas ao *Azospirillum brasiliense*.

2 JUSTIFICATIVA

A adesão por alternativas de manejo mais sustentáveis dentro dos cultivos é uma condição que vem sendo discutida cada vez mais nos últimos anos. O biocontrole é alternativa que promove benefícios ao sistema, tanto na estabilidade no que se refere ao meio ambiente, como no acréscimo da produtividade, pelo controle de patógenos e pragas causadores de doenças e danos em plantas.

Para o cultivo da soja, devido ao variado número de patógenos que acometem a cultura, ainda há muito a ser estudado sobre o uso do controle biológico e suas aplicações. Neste sentido, é importante que se pesquise sobre microrganismos promissores, suas formas de ação, seus efeitos antagônicos e potenciais de aplicação, para que possam vir a ser utilizados na cultura.

As rizobactérias atuam benéficamente em associação às plantas destacando-se por estimular o seu crescimento, favorecendo o desenvolvimento radicular, e com isso, promovem melhor absorção de água, nutrientes, vigor e produtividade, produção de metabólitos secundários e podem vir a promover a resistência de plantas a determinados microrganismos. Além de serem promissoras no controle de outros microrganismos. Deste modo, promovem o melhor desenvolvimento da cultura, sem a necessidade constante do uso de defensivos químicos.

Já existem relatos científicos do uso de *P. fluorescens* no biocontrole de fungos de solo (ALVARÉZ *et al.*, 2015). No entanto, no Brasil tal bactéria vem sendo explorada como promotora de crescimento e solubilizadora de nutrientes, estando carente de informações sobre seu possível potencial no biocontrole de patógenos de solo (BETTIOL, 1991; HAAS; DÉFAGO, 2005).

Ainda se demonstrar potencial de biocontrole de fungos de solo que acometem a cultura da soja, sua utilização em associação com os inoculantes *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* pode ser uma alternativa de sinergismo considerando a fixação biológica de nitrogênio, solubilização de nutrientes, promoção de crescimento e controle de fitopatógenos. A associação entre agentes biológicos promove maiores ganhos e melhores resultados na eficiência destes no cultivo da soja.

O biocontrole por *P. fluorescens* tem como intuito o antagonismo sobre os fitopatógenos de solo que ocorrem na cultura da soja, bem como os demais

benefícios da rizobactéria, quando associada com *A. brasiliense*, visando promover o crescimento de soja e solubilização de nutrientes.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial da bactéria *P. fluorescens* no controle de fitopatógenos de solo que acometem a cultura da soja e na promoção de crescimento.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o potencial da bactéria *P. fluorescens*, no biocontrole dos fungos *Fusarium tucumaniae*, *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Phomopsis longicolla* e *Rhizoctonia solani*, em condições *in vitro*.
- Avaliar o efeito da bactéria *P. fluorescens* na promoção de crescimento da cultura da soja.
- Avaliar o efeito da bactéria *P. fluorescens* em associação com a bactéria *Azospirillum brasilense* na promoção de crescimento na cultura da soja.

4 REVISÃO DA LITERATURA

4.1 Cultura da Soja

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] pertencente à ordem Fabales, família Fabaceae, tribo Phaseoleae e gênero *Glycine*. A espécie é reconhecida como principal produtora de grãos entre as leguminosas no que tange a produção e comercialização mundial (BARBIERI; STUMPF, 2008). Segundo CHUNG; SINGH (2008) a soja é originária e apresenta domesticação no Nordeste do continente asiático, mais precisamente na China e regiões adjacentes, sendo disseminada por meio das navegações do Oriente para o Ocidente.

O primeiro relato da soja no Brasil foi na Bahia em 1882, sem êxito. Aproximadamente uma década depois, foi cultivada pela primeira vez em São Paulo no Instituto Agrônomo de Campinas e a partir de 1908, melhores resultados foram obtidos por pesquisadores japoneses, utilizando cultivares norte-americanas. Em 1914 no Rio Grande do Sul (RS), onde hoje é a Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), estabeleceu-se o estudo e cultivo da soja. Entretanto, apenas em 1949 o desenvolvimento da cultura propiciou ao Brasil sua primeira exportação (CÂMARA, 2012).

As primeiras cultivares de soja implantadas no RS foram estudadas para fins de avaliar o seu desempenho como forrageira, ao invés de plantas produtoras de grãos para a indústria. Até a década de 1960, o Estado do RS era o único com potencial produtor da cultura no Brasil, devido às exigências e características das variedades que foram introduzidas dos EUA (DALL'AGNOL *et al.*, 2007).

Os grãos da *commodity* são amplamente utilizados como matéria prima em diferentes processos do setor industrial, atualmente a soja tem grande influência sobre as demais cadeias produtivas, por ser amplamente utilizada como matéria prima em diferentes processos do setor industrial. Viabiliza a produção da indústria química e alimentícia de produtos como leite de soja, farinhas, carne de soja, óleo vegetal, e outros. Além disso, na produção de biodiesel que tem o óleo vegetal como principal insumo. E ainda na utilização do farelo de soja aplicado à nutrição animal, promovendo a formulação de rações e abastecendo a cadeia de proteína animal (HIRAKURI *et al.*, 2014; AGEITEC, 2021).

A cadeia produtiva da soja tem grande influência socioeconômica para o Brasil, contribuindo para o desenvolvimento regional do país. Promovendo empregos, gerando riquezas, fontes de renda e o progresso de organizações de variados setores econômicos. Os quais, baseiam-se no complexo agroindustrial da oleaginosa, para desenvolver suas atividades (HIRAKURI; LAZZAROTTO, 2014).

Conforme os dados do décimo levantamento da safra de grãos 2021/22, o Brasil totalizou aproximadamente 124 milhões de toneladas colhidas da oleaginosa, apresentando uma redução de 10,2% em relação à safra anterior. Com a produtividade de 3.029 kg/ha, gerando uma redução de 14,1% comparado a última safra. Já a área de cultivo alcançou a marca de 40,9 milhões de hectares, com acréscimo de 4,5% quando comparado à safra 2020/21. A redução da produção total na safra explica-se visto as baixas precipitações em influência do fenômeno La Niña na região Sul e no estado do Mato Grosso do Sul (CONAB, 2022).

Dentre os principais fatores que contribuem para a ascensão da produção sojícola Hirakuri; Lazzarotto, (2014) citam I) a expansão da área de cultivo, que vem aumentando continuamente. II) aumento da produtividade, embora esta seja afetada facilmente por diferentes estresses abióticos que os campos são expostos. III) suporte tecnológico da cadeia produtiva, que por sua vez influencia na criação e transferência de informações, tecnologias e estratégias de manejo favoráveis à exploração de maiores rendimentos, e por fim IV) a garantia de mercado, sustentada pela alta liquidez do grão. Deste modo, torna-se constante a busca por novas tecnologias visando maiores resultados, levando em consideração as práticas que otimizem o cultivo (NETO; SOUZA; MASCARO, 2018).

4.2 Doenças de solo que acometem a soja

As doenças estão entre os principais fatores que restringem a produção e altos rendimentos da cultura da soja. A expansão da cultura, promove a incidência das doenças, entretanto, os níveis de danos variam conforme as condições climáticas de cada região e ano de cultivo. Estima-se perdas anuais médias de produção em torno de 15% a 20%. Contudo, se mal manejadas, algumas doenças podem levar a perdas mais severas, próximas a 100% (EMBRAPA, 2011).

Existem diferentes patógenos divididos em fungos, bactérias, vírus e nematoides, causadores de doenças na soja. No entanto, para que uma doença

ocorra no cultivo é necessário a inter-relação de patógeno, hospedeiro e ambiente (GRIGOLLI, 2014).

A cultura da soja pode ser afetada por diversos patógenos que habitam no solo, dentre estes destacam-se então os fitopatógenos do complexo *Fusarium tucumaniae*, *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Phomopsis longicolla* e *Rhizoctonia solani*.

4.2.1 *Fusarium tucumaniae*

A podridão vermelha da raiz (PVR), também conhecida como síndrome de morte súbita, está entre as doenças fúngicas que acometem o cultivo da soja (AOKI; O'DONNELL; SCANDIANI, 2005). Inicialmente o agente etiológico causador da doença havia sido identificado como *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. Um fungo mitospórico Hifomiceto (ROY *et al.*, 1989; RUPE, 1989). Posteriormente, sua classificação foi modificada para *Fusarium solani f. sp. glycines* (ROY, 1997).

Contudo, estudo realizado posteriormente por AOKI; O'DONNELL; SCANDIANI (2005) mostraram diferenças pertinentes para a separação dos agentes causais em quatro espécies de fungos que pertencem ao gênero *Fusarium spp.*, sendo estes: *Fusarium brasiliense*, *Fusarium cuneirostrum*, *Fusarium tucumaniae* e *Fusarium virguliforme*. Todavia, no Brasil destaca-se a espécie *F. tucumaniae* (AOKI; O'DONNELL; SCANDIANI, 2005; ARRUDA *et al.*, 2005).

No Brasil a PVR foi verificada inicialmente no Estado de Minas Gerais na safra 1981/82, no qual teve sua expansão para outras regiões produtoras como sul e regiões altas do cerrado (ALMEIDA *et al.*, 1997).

Os sintomas iniciais encontram-se na raiz principal, em uma região localizada logo abaixo do nível do solo. Esta apresenta manchas de coloração avermelhadas, evoluindo para arroxeadas e por fim negra, que envolvem toda a raiz. Essa necrose manifesta-se no córtex, enquanto que o lenho apresenta coloração castanho claro. Quando exposto a alta umidade, ocorre a formação de anel vermelho na base da haste, coberta por conídios de coloração bege. Esse acometimento da raiz pela doença acaba deteriorando rapidamente as raízes secundárias e ocasionando a formação de folhas "carijó" em plantas (ALMEIDA *et al.*, 1997).

4.2.2 *Macrophomina phaseolina*

A podridão do carvão ou também chamada de podridão preta das raízes tem como agente etiológico o fungo *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. Esta doença se manifesta principalmente em altas temperaturas, entre 28°C e 35°C e, em solos mal manejados (compactados), que dificultam a penetração das raízes, tornando-as suscetíveis às condições de estresse hídrico (ALMEIDA *et al.*, 1997; ITO, 2013; ALMEIDA *et al.*, 2014).

O primeiro relato de danos significativos da doença na soja foi realizado por FERREIRA *et al.* (1979), onde a falta de chuvas por mais de vinte dias nas principais áreas de produção do Norte e Oeste do Paraná, provocou perdas de produtividade superiores a 50%, principalmente em cultivares tardias.

O acometimento das raízes pode ocorrer desde o início da germinação e os sintomas variam conforme a idade da planta. Quando as infecções ocorrem na emergência, apresentam coloração marrom-avermelhada na região do colo da planta, sendo mais severas com condições de umidade baixa e alta temperatura. As plantas já desenvolvidas infectadas mostram-se aleatórias na lavoura em forma de reboleiras. As plantas que sobreviveram ao ataque inicial, denotam amarelecimento no estágio de formação das vagens, levando à murcha das folhas que permanecem aderidas, porém caídas ao longo das hastes. Por fim, estas secam e exibem coloração marrom escura. As raízes dessas plantas apresentam epiderme deteriorada, com cor negra o que remete aos microescleródios (ALMEIDA *et al.*, 2014).

4.2.3 *Sclerotinia sclerotiorum*

O promotor da doença conhecida como mofo-branco é a *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary, caracteriza-se como um fungo de solo, ascomycota, e patógeno de várias culturas economicamente importantes, incluindo leguminosas como soja, ervilha, feijão e sementes de oleaginosas como a canola e girassol, entre outras (HEGEDUS; RIMMER, 2005; SILVA, *et al.*, 2015). Tendo em vista o grande número de hospedeiros, o controle deste fitopatógeno é bastante complexo, pois este apresenta também estruturas de resistência no solo que dificultam seu controle e manejo (KIM *et al.*, 2011).

Entre as estações, a *S. sclerotiorum* repousa no solo como escleródios, uma alternativa de sobrevivência às condições ambientais desfavoráveis. Os escleródios quando enterrados no solo e expostos às condições que atendam suas exigências começam a germinar e a produzir ascósporos responsáveis pela disseminação do patógeno no campo (ATALLAH; YASSIN, 2020).

Para a cultura da soja, o período vulnerável ao patógeno vai do estágio da floração plena ao início da formação das vagens, com o mofo-branco ocorrendo com maior intensidade em temperatura amena 15°C a 21°C. A transmissão deste patógeno pode ocorrer por sementes, por meio de duas formas, por micélio dormente ou por escleródios misturados às sementes (HENNING *et al.*, 2014).

As plantas infectadas por mofo branco, podem apresentar os sintomas tanto nas folhas, vagens, ramos laterais e hastes. Entretanto, os sintomas são mais presentes nas hastes, onde apresentam manchas aquosas de coloração castanho-claro, que promovem a formação de micélio branco e denso. À medida que as lesões envelhecem, os micélios transformam-se em escleródios negros, nos quais podem ser formados tanto na parte interna do tecido infectado, como na superfície dos órgãos vegetais durante condições de alta umidade. A disseminação da doença ocorre rapidamente, uma vez que a doença entra em contato com o hospedeiro, a infecção pode propagar de uma planta para outra (BOLTON *et al.*, 2006; HENNING *et al.*, 2014).

4.2.4 *Phomopsis longicolla*

O complexo *Diaporthe/Phomopsis* está associado a doenças conhecidas na cultura da soja, nos quais pode-se citar a seca da haste e da vagem, o cancro da haste e a podridão da semente (MORGAN-JONES, 1992). Neste contexto, a decomposição da semente por *Phomopsis* (PSD) na soja é causada principalmente pelo fungo *Phomopsis longicolla* TW Hobbs (sin. *Diaporthe longicolla*) (HOBBS; SCHMITTHENNER; KUTER, 1985)

Esta doença (PSD) causa perda na qualidade germinativa das sementes e no rendimento dos cultivos de soja, ocasionando ou direcionando à grandes perdas de produção. As sementes apresentam aspecto esbranquiçado e sintomas como enrugamento, alongamento e rachaduras (SINCLAIR, 1995). Ainda, ambientes quentes e úmidos, principalmente durante o período do enchimento da vagem até a

colheita, podem favorecer o crescimento do patógeno e o desenvolvimento de doenças (LI, 2011; BALDUCCHI *et al.*, 1987; WRATHER *et al.*, 2003).

4.2.5 *Rhizoctonia solani*

O *damping-off* ou tombamento é ocasionado pelo fungo basidiomiceto habitante do solo *Rhizoctonia solani* Kühn (teleomorfo: *Thanatephorus cucumeris*) que causa doenças em muitas plantas de cultivo economicamente importantes em todo o mundo (GONZALEZ *et al.*, 2011). Na soja, essa doença pode ocorrer em qualquer estágio da cultura, sendo favorecida por solos compactados e períodos chuvosos e frios (ITO, 2013).

Os sintomas dessa doença apresentam-se na fase de plântula, ocorrendo o estrangulamento do colo, próximo ao nível do solo, o que acarreta na murcha e no tombamento. No florescimento, as plantas infectadas apresentam podridão aquosa de cor castanha na haste. Já as raízes têm cor castanho-escuro e córtex solto, expondo o lenho. Por fim, as plantas morrem em reboleiras espalhadas pelo campo (HENNING *et al.*, 2014). O fungo é disseminado via semente e tem ocorrência em solos contaminados por escleródios, além dos restos culturais (SARAN, 2013).

4.3 *Pseudomonas fluorescens*

As rizobactérias internacionalmente conhecidas como PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) cumprem diversos serviços relevantes ao meio ambiente, beneficiam as plantas através do próprio organismo e apresentam-se como alternativa promissora no uso como agente de controle biológico (VIEIRA JUNIOR *et al.*, 2013).

As PGPR rizobactérias fazem parte de um grupo muito amplo de microrganismos, onde, incluem-se quaisquer bactérias que vivem na rizosfera e afetam benéficamente o crescimento de uma ou mais espécies vegetais (SALA; SILVEIRA; CARDOSO, 2007).

Segundo Ferreira *et al.*, (2009) dentre as bactérias de solo, destacam-se as do gênero *Pseudomonas*. Este gênero pertence à ordem Pseudomonadales e família Pseudomonadaceae (ANZAI *et al.*, 2000), estando presentes na rizosfera, mostrando-se versáteis quanto à adaptação em diferentes ambientes e substratos, com variabilidade no aproveitamento nutricional (FERREIRA *et al.*, 2009).

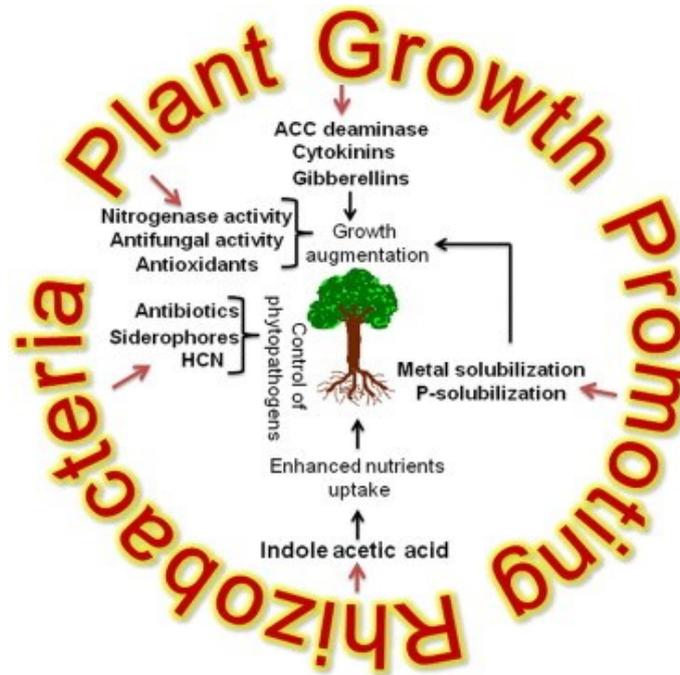
De acordo Hernández (2000), as bactérias do gênero *Pseudomonas* se sobressaem entre os microrganismos presentes na rizosfera, sendo capazes de colonizar órgãos das plantas como tubérculos e raízes. Utilizam de exsudatos radiculares e produzem ampla variedade de metabólitos secundários como antibióticos, alcalóides, compostos orgânicos voláteis e fitormônios, nos quais são tóxicos aos microrganismos fitopatogênicos. Além disso, certas espécies, têm capacidade de produzir compostos sideróforos que complexam o ferro presente em baixas concentrações na rizosfera, privando e inibindo o crescimento de outros microrganismos como os fitopatógenos (ROMEIRO, 2007; SHOWKAT *et al.*, 2012; EMBRAPA, 2021).

A rizobactéria *P. fluorescens* é classificada como gram-negativa, saprófita com forma de bastonete (bacilo), retos ou razoavelmente curvos. Ainda, apresenta pigmento fluorescente (fluoresceína), que reage à luz ultravioleta, tornando-se facilmente visível. Podem ser encontradas em ambientes aquáticos e no solo. A temperatura ideal para seu desenvolvimento apresenta variação entre 25°C a 30°C, embora possa crescer com temperaturas de 5°C a 42°C. Exige pH neutro e não cresce perante condições ácidas (ALVARÉZ *et al.*, 2015).

As *P. fluorescens*, são amplamente utilizadas em diferentes culturas como PGPR, em virtude do potencial em colonizar as raízes, promover o crescimento das plantas, bem como sua ação antagonista na inserção e estabelecimento de fitopatógenos. Ainda, beneficiam na absorção de água e nutrientes, promovendo as plantas maior vigor, produtividade e tolerância às condições climáticas adversas (Figura 1) (ALVARÉZ *et al.*, 2015).

Segundo Werra *et al.* (2009), a produção de ácido glucônico por *P. fluorescens* está envolvida no metabolismo dessa bactéria, seja na regulação da produção de compostos antimicrobianos quando associada à rizosfera ou como consequência moderação na interação com patógenos e ação de biocontrole da bactéria.

Figura 1- Mecanismo de promoção do crescimento das plantas por rizobactérias.



Fonte: Adaptado de Ahemad e Kibret (2014).

Para Freitas e Vildoso (2004), a utilização de PGPRs apresenta outras vantagens, que estão relacionadas na diminuição do uso de insumos químicos na agricultura de forma que beneficiam tanto no contexto econômico quanto no ecossistêmico, levando em conta os problemas promovidos por tais produtos.

4.4 *Azospirillum brasilense*

Inicialmente classificado como *Spirillum*, o gênero passou por reclassificação sendo nomeado então de *Azospirillum*, junto a isso, a descrição de duas espécies conhecidas a *Azospirillum lipoferum* e *Azospirillum brasilense* (TARRAND *et al.*, 1978). Hoje encontram-se descritas mais de 14 espécies no gênero (HUNGRIA, 2011).

Abrangendo um grupo de vida livre de PGPR, as bactérias deste gênero podem ser endofíticas facultativas, ou seja, apresentam uma fase do seu ciclo de vida chamado bifásico, alternando entre plantas e ambiente (HARDOIM *et al.*, 2008). E ainda, podem ser encontradas em todos os lugares da terra (DÖBEREINER; PEDROSA, 1987; HUERGO *et al.*, 2008).

Apresentaram destaque a partir da década de 1970, quando descoberto pela pesquisadora da EMBRAPA, Dra. Johanna Döbereiner (1924-2000), a capacidade de

fixação biológica de nitrogênio (FBN), quando associadas com gramíneas (HUNGRIA, 2011). Ainda, as bactérias diazotróficas do gênero *Azospirillum* além da FBN, são capazes de produzir compostos promotores de crescimento em plantas ou induzir a planta a produzir estes compostos (RODRIGUES *et al.*, 2012).

Em estudos onde utilizou-se *A. brasilense*, pode-se evidenciar o efeito ácido positivo destas devido a aptidão na produção de fitohormônios como o ácido indolacético (AIA), giberelinas e citocininas, compostos promotores de crescimento que resultam no estímulo do crescimento radicular, possibilitando abranger um volume mais amplo do solo (TIEN *et al.*, 1979; FERLINI, 2006; MASCIARELLI *et al.*, 2013).

Sadeghipour e Abbasi (2012), ao estudarem a inoculação de *A. brasilense* via sementes de soja, observaram ganhos quando comparado a plantas não inoculadas, o uso de *A. brasilense* promoveu produtividade de 466,9 g m² na ausência de inoculação obteve-se produtividade de 247,6 g m², ou seja, superioridade de 88,5%. Cassán e Diaz-Zorita (2016), também relatam maior rendimento de grãos em soja quando realizada a inoculação com *A. brasilense*.

Segundo Ferlini (2006), a co-inoculação em leguminosas consiste na utilização de bactérias do gênero *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* resultando em significativos incrementos da nodulação bem como no crescimento radicular, proporcionando uma ascensão na absorção de água e nutrientes, de tal modo, gerando ganhos na produtividade (BRACCINI *et al.*, 2016). O uso da co-inoculação na cultura da soja possibilita um aumento no rendimento de até 13,3% quando comparada a não inoculada (SCHNEIDER *et al.*, 2017).

A estimulação da nodulação posterior a inoculação com *A. brasilense* pode estar relacionada com o incremento na indução da produção de genes Nod, que são responsáveis pelo incremento de raízes laterais, a densidade de pelos radiculares e pelas ramificações dos mesmos (BURDMANN; HAMAQUI; OKON, 2000).

O aumento na produção ocorre devido aos fatores supracitados bem como, a maior fixação de nitrogênio atmosférico (N₂) realizada pelas bactérias, e ação da enzima nitrogenase produzida pelas mesmas, que reduz a amônia e está, sequencialmente é transformada em compostos nitrogenados exportados para a planta (FERLINI, 2006; PRANDO *et al.*, 2019). Cabe salientar que nitrogênio (N) é o nutriente requerido em maior quantidade pela cultura da soja. Exige-se mais de 80 kg de N para cada tonelada de grãos produzidos (SEIXAS *et al.*, 2020). Sendo então a FBN a principal fonte do nutriente para a cultura.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Caracterização da área experimental

O experimento foi conduzido junto ao laboratório de Bioquímica e ao laboratório de Fitossanidade, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Dois Vizinhos (UTFPR-DV), localizada na região Sudoeste do Estado do Paraná (25°41'35" S; 53°05'37" O).

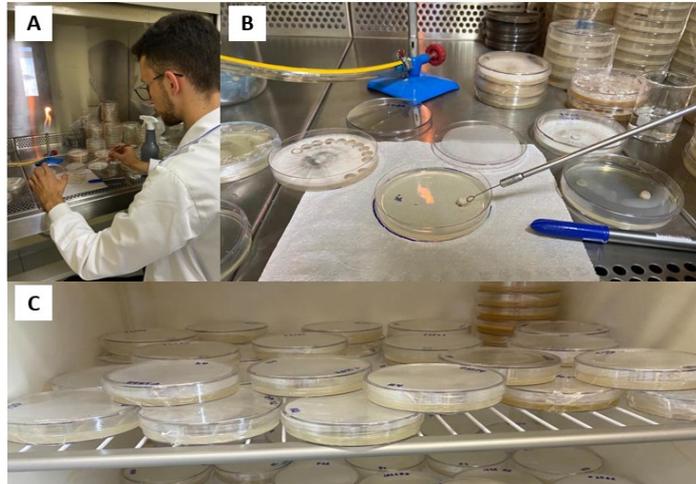
5.2 Material experimental

A cultivar de soja utilizada no experimento foi a BS 1511 IPRO®, grupo de maturação 5.1 que possui hábito de crescimento indeterminado, recomendada para cultivo na região sul (PR/SC/RS). Da marca de licenciamento de sementes de soja SoyTech™ (BASF, 2022).

5.2.1 Obtenção e cultivo dos fitopatógenos

Os fitopatógenos *F. tucumaniae*, *M. phaseolina*, *S. sclerotiorum*, *P. longicolla* e *R. solani* foram obtidos da coleção de microrganismos do laboratório de Fitossanidade, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná- Campus Dois Vizinhos, provenientes da EMBRAPA Soja. Os quais foram repicados, em câmara de fluxo laminar e cultivados em placa de Petri® no meio de cultivo BDA (batata, dextrose, ágar), e sequencialmente conservados em BOD a 25°C, com fotoperíodo de 12 horas por um período de 7 dias (Fotografia 1).

Fotografia 1- A) Repicagem dos discos de micélio dos microrganismos em câmara de fluxo. B) Discos dos microrganismos postos nas placas de Petri® em meio de cultura BDA. C) Placas vedadas e acondicionadas em BOD sob fotoperíodo de 12 horas a 25°.



Fonte: Autoria própria (2022)

5.2.2 Obtenção dos agentes biológicos

A bactéria *P. fluorescens*, utilizada para o estudo, é oriunda do produto comercial PhósUp da Microquímica – Tradecorp, estirpe ATCC 13525, concentração bacteriana 2×10^8 UFC/mL.

Já para a bactéria *A. brasilense*, utilizou-se o produto comercial AzzoFix® da Microquímica – Tradecorp, indicado para co-inoculação em soja, uso conjunto de *Bradyrhizobium* com *A. brasilense* (Cepas AbV5 e AbV6). Na concentração de $2,0 \times 10^8$ UFC/ml.

5.3 Delineamento experimental e tratamentos

5.3.1 Controle de patógenos

Para realização do experimento seguiu-se o delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), considerando para a variável analisada 1: Controle de patógenos o total de 10 tratamentos, e dez repetições, cuja unidade experimental correspondeu a placas de Petri®, utilizadas para avaliação do confronto direto por pareamento *in vitro*.

Os tratamentos constituídos por:

- T1= Testemunha *Fusarium tucumaniae*;
 T2= Testemunha *Macrophomina phaseolina*;
 T3= Testemunha *Sclerotinia sclerotiorum*;
 T4= Testemunha *Phomopsis longicolla*;
 T5= Testemunha *Rhizoctonia solani*;
 T6= *Pseudomonas fluorescens* + *Fusarium tucumaniae*;
 T7= *Pseudomonas fluorescens* + *Macrophomina phaseolina*;
 T8= *Pseudomonas fluorescens* + *Sclerotinia sclerotiorum*;
 T9= *Pseudomonas fluorescens* + *Phomopsis longicolla* e;
 T10= *Pseudomonas fluorescens* + *Rhizoctonia solani*.

5.3.2 Promoção de crescimento

Do mesmo modo, para a variável analisada 2: Promoção de crescimento, seguiu-se o DIC, e aplicação de 4 tratamentos, com quatro repetições, sendo a unidade experimental um vaso de tubo de PVC, utilizado para avaliação de crescimento de parte aérea e raízes.

Sendo os tratamentos constituídos por:

- T1= Testemunha
 T2= *Azospirillum brasilense*
 T3= *Pseudomonas fluorescens*
 T4= *Azospirillum brasilense* + *Pseudomonas fluorescens*.

5.4 Condução do experimento

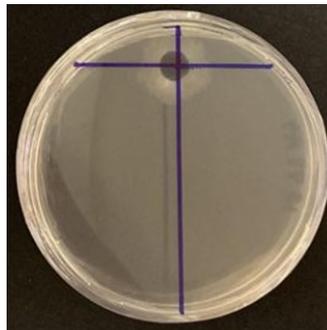
5.4.1 Experimento - Confronto direto por pareamento

A avaliação do confronto direto foi realizada em placas de Petri® de 9 cm de diâmetro que compreenderão cada unidade experimental. Em placa estéril foram vertidos 20mL do meio de cultura BDA (Batata – Dextrose e Agar) e após sua solidificação, foi disposto a 1,5 cm na extremidade da placa, com auxílio de alça de platina, um disco de micélio de 7 mm de diâmetro dos fitopatógenos correspondentes a cada tratamento adaptado de Solino *et al.* (2017). Na outra extremidade foi disposto

um disco de 7 mm, do meio onde a bactéria *P. fluorescens*, descrita no item 6.3, estava sendo cultivada. A testemunha então, sendo composta apenas do meio de BDA e o disco de micélio do fitopatógeno de cada tratamento, isento da bactéria (Fotografia 1).

As placas foram tampadas e sobre elas, com o auxílio de régua graduada em milímetros, demarcou-se duas linhas, uma no sentido horizontal e outra no sentido vertical, para acompanhar o crescimento micelial da colônia (Fotografia 2). Posteriormente, as placas foram devidamente fechadas e vedadas, com papel filme e acondicionadas em BOD com temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas, por um período de 7 dias (BOMFIM *et al.*, 2010).

Fotografia 2- Unidade experimental composta do disco de micélio de testemunha de *M. phaseolina*, apresentando os eixos x e y, utilizados para avaliar o crescimento micelial.



Fonte: Autoria própria (2022).

O crescimento micelial dos fungos foi acompanhado diariamente, a cada 24h, até que a testemunha circundasse completamente toda a placa. Para tal, foi utilizado uma régua graduada em milímetros. Em cada placa por meio das duas medidas foi realizado uma média do crescimento da colônia.

Para calcular o percentual de inibição do crescimento micelial (PIC), foi utilizado a fórmula de MENTEN *et al.* (1976) onde:

$$\text{PIC} = \frac{(\text{Crescimento da testemunha} - \text{Crescimento tratamento}) \times 100}{\text{Crescimento da testemunha}}$$

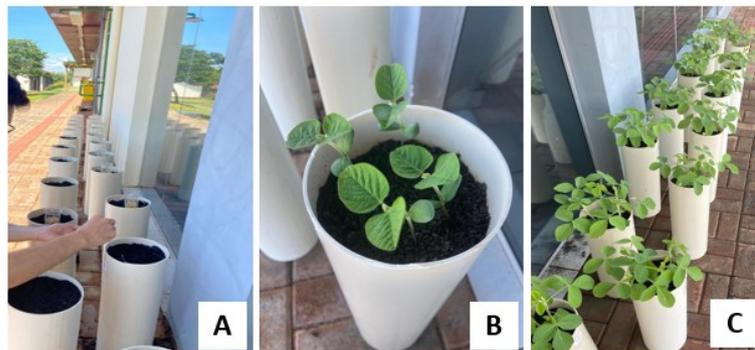
Também foi avaliado a presença de halo de inibição, sendo determinado de forma visual, considerando-se os níveis de inibição, nos quais serão medidos com auxílio de paquímetro digital, compreendendo em sem halo (nota 0) halo menor que 2 mm (nota 1) halo de 1 a 2 mm (nota 2) e acima de 2 mm (nota 3).

5.4.2 Promoção de crescimento em soja

O experimento foi implantado em tubos de PVC (200mm x 70cm), correspondentes às unidades experimentais, no dia 23 de novembro de 2021. Inicialmente as sementes de soja foram inoculadas conforme os tratamentos T1= Testemunha, sem inoculação, T2= Inoculação de *Azospirillum brasilense*, com dose de 2 ml/ kg de semente, T3 = Inoculação de *Pseudomonas fluorescens* com dose de 2 ml/kg de semente e o T4= Inoculação de *Azospirillum brasilense* + *Pseudomonas fluorescens*, com doses de 2 ml + 2 ml/kg de semente respectivamente. Foram utilizados beckers para homogeneizar a mistura dos tratamentos e posterior inoculação.

Sequencialmente realizou-se a semeadura manual, cada vaso com capacidade de 5L, preenchido com substrato comercial, sendo que quatro sementes inoculadas com o respectivo tratamento foram postas para germinar por vaso, com espaçamento de aproximadamente 5cm, de forma a promover a separação semelhante entre as plantas. 20 dias após a germinação, quando as plantas se encontravam no estágio fenológico (V3- V4), foi feito o desbaste deixando-se duas plantas/vaso adaptado de (Fotografia 3) (MASCARENHAS; TANAKA, 1995). A irrigação foi feita manualmente, fornecendo água para as plantas até a capacidade de campo do solo (CC), a qual manteve-se diariamente, no período da tarde. Entende-se por (CC) o limite superior de retenção hídrica no solo, sendo a máxima quantidade de água que o mesmo pode reter sem causar danos ao sistema (MANTOVANI *et al.*, 2009).

Fotografia 3 - A) Semeadura das sementes de soja em vasos realizada de forma manual, correspondentes a cada tratamento. B) Plantas germinadas no estágio vegetativo V1. C) 20 dias após a germinação, plantas em V3-V4, momento de desbaste.



Fonte: Autoria própria (2022).

Seguindo a metodologia descrita por Mascarenhas e Tanaka (1995), com algumas modificações, aos 50 dias após a semeadura avaliou-se comprimento de parte aérea, do sistema radicular, a massa verde da parte aérea e massa verde das raízes, quando as plantas se encontravam no estágio fenológico correspondente à fase vegetativa (V8-V9) (SEIXAS *et al.*, 2020). Para tal avaliação, as raízes foram lavadas em água corrente para remoção do substrato aderido e separaram-se o sistema radicular da parte aérea das plantas conforme (JÚNIOR *et al.*, 2021). Por fim, as medidas foram realizadas sobre uma bancada, com o auxílio de uma régua graduada em milímetros, obtendo-se as medidas médias correspondentes a cada tratamento (Fotografia 4), onde na sequência avaliou-se a massa verde da parte aérea e massa verde do sistema radicular.

Fotografia 4 - A) Plantas acondicionadas em bandejas posterior remoção de excesso de solo aderido no sistema radicular, identificadas e separadas conforme os respectivos tratamentos. B) Avaliação do comprimento do sistema radicular e da parte aérea.



Fonte: Autoria própria (2022).

5.6 Análises estatísticas

Os resultados foram organizados em planilha e posteriormente submetidos ao teste de normalidade de Lilliefors, ocorrendo ou não suas transformações. Em seguida, os mesmos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), as médias do crescimento micelial e promoção de crescimento agrupadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, seguido da análise de regressão por meio do software SASM-Agri:Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas (CANTERI *et al.*, 2001).

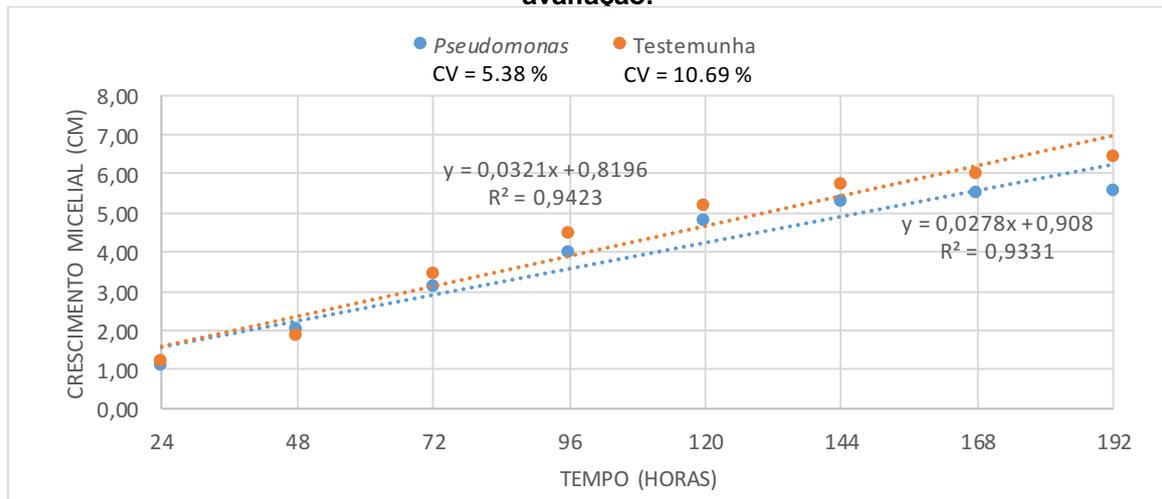
6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 Controle de patógenos - confronto direto

Para o controle de patógenos por meio do confronto direto pode-se observar que o isolado de *Pseudomonas fluorescens* não apresentou potencial antagonista sobre o crescimento micelial dos patógenos *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Phomopsis longicolla* e *Rhizoctonia solani*. Entretanto, quando confrontado com *Fusarium tucumaniae* a bactéria *P. fluorescens* apresentou inibição no crescimento micelial.

Pode-se perceber no gráfico 1 que em relação à testemunha nas 192 horas, houve redução do crescimento micelial de *Fusarium tucumaniae* de 13,26%, quando confrontada com *Pseudomonas fluorescens*. Entretanto, não apresentou a formação de halo de inibição. Resultados positivos também foram encontrados por Sottero *et al.* (2006), quando estudaram a aplicação de rizobactérias na cultura da alface (*Lactuca sativa*) e obtiveram que alguns isolados de bactéria *Pseudomonas fluorescens* apresentaram competição *in vitro* contra *Fusarium sp.*, de modo não determinado.

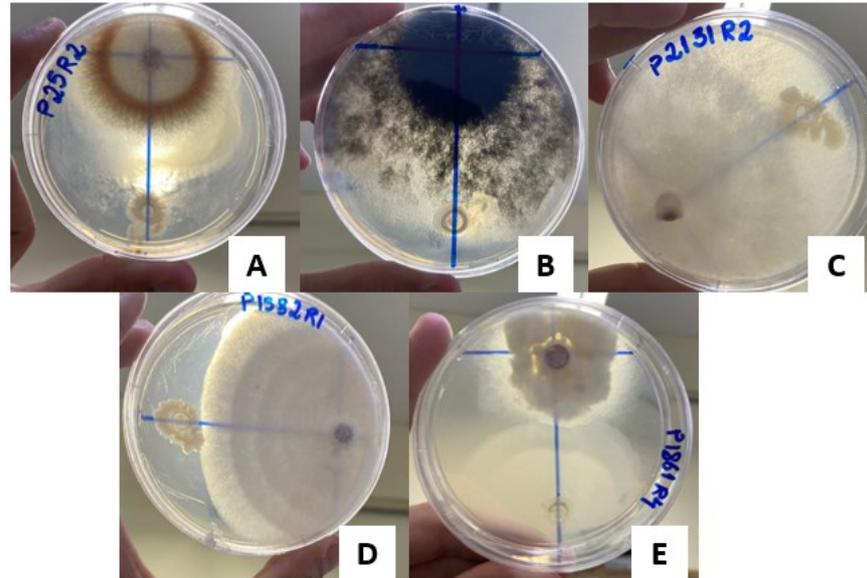
Gráfico 1- Resultado do potencial antagonista de *Pseudomonas fluorescens*. Através do confronto direto no controle biológico *in vitro* de *Fusarium tucumaniae* em 192 horas de avaliação.



Fonte: Autoria própria (2022).

Notou-se em ensaio realizado *in vitro* a redução no crescimento micelial entre *Fusarium tucumaniae* no quinto dia de avaliação após o início do experimento (Fotografia 5).

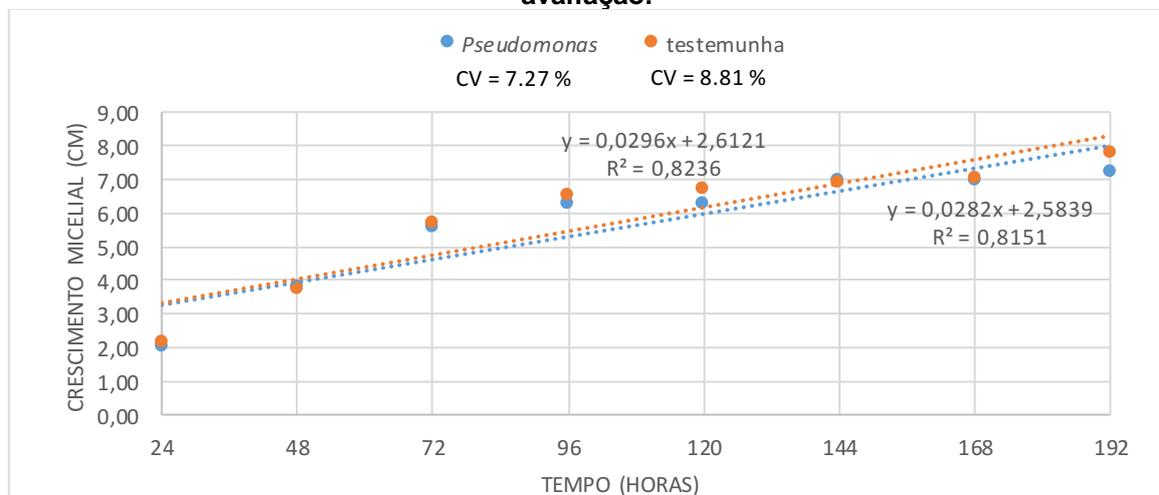
Fotografia 5 - Efeito de *P. fluorescens* na redução do crescimento micelial *in vitro* dos patógenos A) *Fusarium tucumaniae* B) *Macrophomina phaseolina* C) *Sclerotinia sclerotiorum*. D) *Phomopsis longicolla* e E) *Rhizoctonia solani*, em 120 horas após o início das avaliações.



Fonte: Autoria própria (2022).

No gráfico 2, pode-se observar que não ocorreu a redução do crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina* quando realizado o confronto com *Pseudomonas fluorescens* ao longo das 192 horas de avaliação.

Gráfico 2- Resultado do potencial antagonista de *Pseudomonas fluorescens*. Através do confronto direto no controle biológico *in vitro* de *Macrophomina phaseolina* em 192 horas de avaliação.

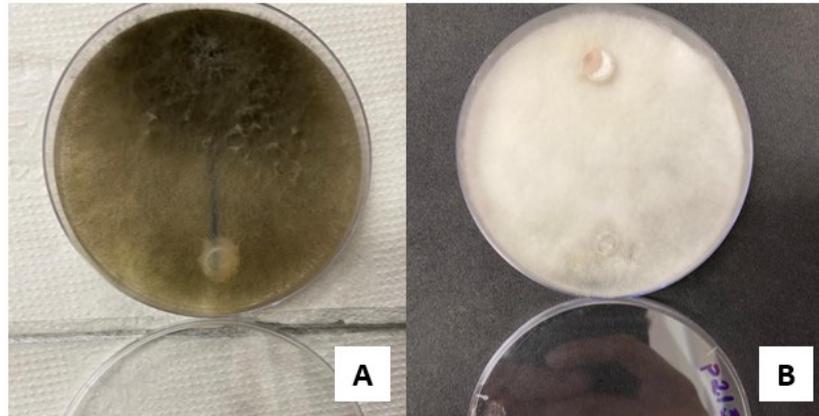


Fonte: Autoria própria (2022).

Embora *Pseudomonas fluorescens* tenha se mostrado promissora para utilização no controle biológico, chegando a inibir até 54,2% do crescimento micelial e desenvolvimento de *Macrophomina phaseolina*, patógeno causador da doença

podridão do carvão na soja (SANTOS *et al.*, 2010), no presente trabalho nenhuma evidência torna significativa a eficiência da mesma em relação ao desenvolvimento da testemunha, pode-se observar também no ensaio *in vitro* (Fotografia 6).

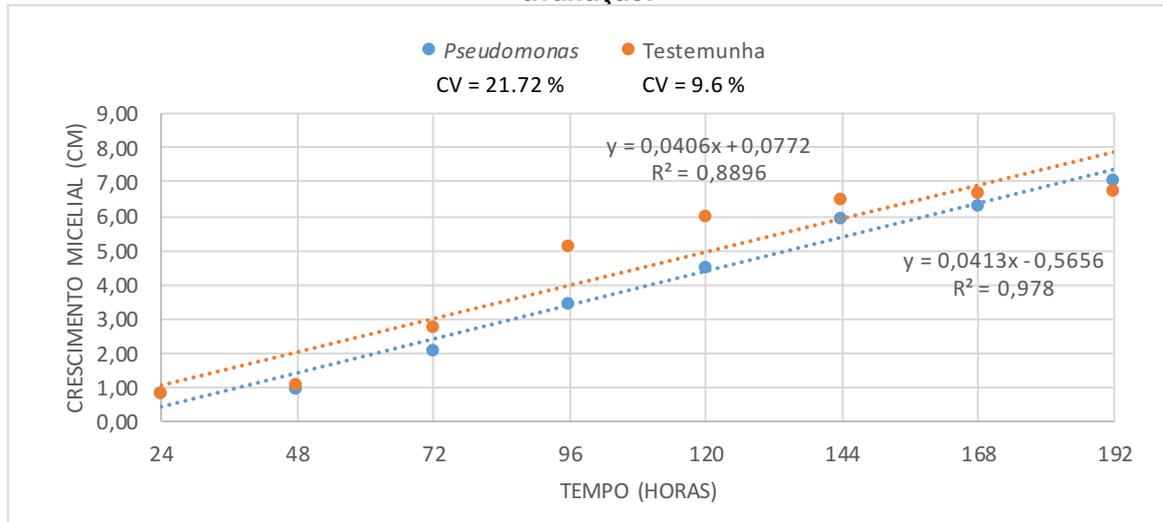
Fotografia 6 - A) Potencial antagonista de *P. fluorescens* através do confronto direto, no controle biológico *in vitro* de *Macrophomina phaseolina* B) Potencial antagonista de *P. fluorescens* através do confronto direto, no controle biológico *in vitro* de *Sclerotinia sclerotiorum*.



Fonte: Autoria própria (2022).

Ao observarmos o gráfico 3 pode-se verificar que no decorrer do experimento houve uma redução de crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum*, podendo ser observado a partir das 72 horas após o início do experimento. Contudo, quando analisamos as 192 horas de avaliação observa-se que *Pseudomonas fluorescens* não apresenta potencial antagonista sobre o patógeno *Sclerotinia sclerotiorum* que não teve inibição do crescimento e circundou completamente toda a placa (Fotografia 6). Sem a presença de halo de inibição por parte de *P. fluorescens*. Entretanto, Aeron *et al.* (2011), observaram potencial antifúngico da estirpe PS1 de *P. fluorescens* que provocou alterações morfológicas nos micélios de *S. sclerotiorum*. Com potencial para ser agente biológico no controle do patógeno.

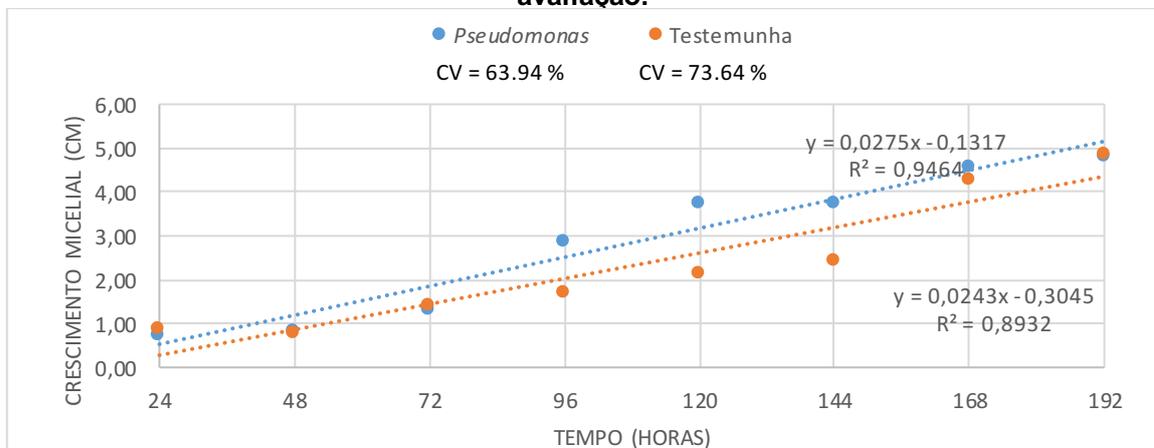
Gráfico 3- Resultado do potencial antagonista de *Pseudomonas fluorescens*. Através do confronto direto no controle biológico *in vitro* de *Sclerotinia sclerotiorum* em 192 horas de avaliação.



Fonte: Autoria própria (2022).

O mesmo pode ser observado no (gráfico 4) onde nas 96 horas posteriores ao início do experimento, ocorreu uma redução no crescimento micelial de *Phomopsis longicolla*, todavia no oitavo dia de avaliação, ou seja, nas 192 horas de experimento, observa-se que não houve a inibição do crescimento micelial do patógeno por parte de *P. fluorescens*, bem como também não apresentando o halo de inibição.

Gráfico 4- Resultado do potencial antagonista de *Pseudomonas fluorescens*. Através do confronto direto no controle biológico *in vitro* de *Phomopsis longicolla* em 192 horas de avaliação.

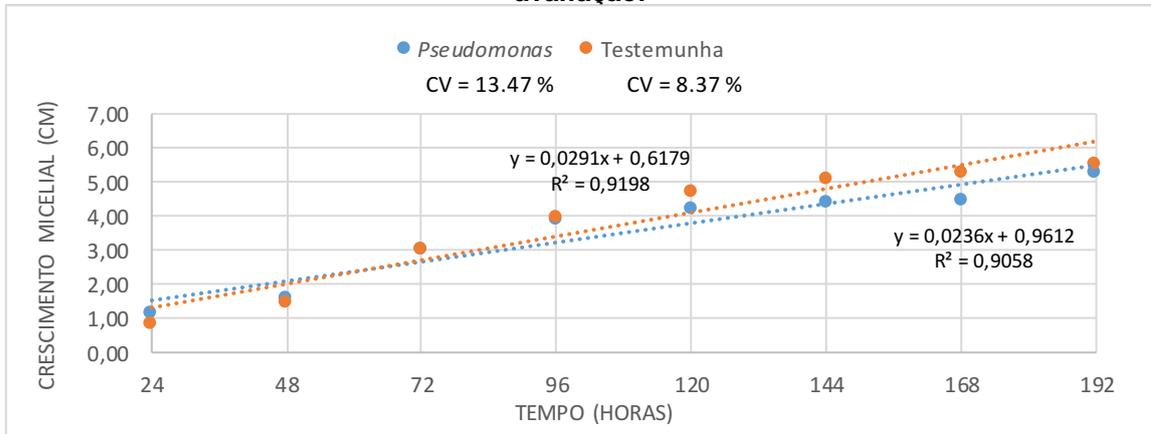


Fonte: Autoria própria (2022).

Nota-se no gráfico 5, redução do crescimento micelial a partir das 120 horas de avaliações, e quando comparado com a testemunha as 192 horas houve a

redução de 4,68% no crescimento de *Rhizoctonia solani*. Contudo não apresentou potencial antagonista sobre o patógeno.

Gráfico 5- Resultado do potencial antagonista de *Pseudomonas fluorescens*. Através do confronto direto no controle biológico *in vitro* de *Rhizoctonia solani* em 192 horas de avaliação.



Fonte: Autoria própria (2022).

Os dados apresentados no gráfico 5 demonstram que a estirpe de *Pseudomonas fluorescens* utilizada no presente trabalho não apresenta potencial antagonista ou de controle para o patógeno *Rhizoctonia solani*. Corroborando com a pesquisa de Bagnasco *et al.* (1998), que estudaram a atividade antagônica de diferentes isolados de *P. fluorescens* oriundos da rizosfera de cornichão (*Lotus corniculatus*), contra os patógenos *Pythium ultimum* e *Rhizoctonia solani*, causadores de doenças em leguminosas. Dos isolados de *P. fluorescentes* testados, 12% apresentaram atividade antagônica *in vitro*, e destas três cepas identificadas como UP61, UP143 e UP148 reduziram a incidência das doenças causadas pelos patógenos em testes *in vivo*.

Contraposto de Britez, Dominguez e Grabowski (2019), que ao estudarem *P. fluorescens* como antagonista no controle biológico de fungos patogênicos em sementes de soja através da microbiolização, obtiveram que a bactéria é eficiente e reduz a intensidade do patógeno *R. solani* em até 45,3% e tem suas justificativas pautadas considerando os compostos antimicrobianos hidrossolúveis produzidos por *P. fluorescens*. Já Nandakumar *et al.* (2001) ao utilizarem *P. fluorescens* relataram ter conseguido a indução de resistência sistêmica à doença causada por *R. solani* em arroz.

6.2 Potencial na promoção de crescimento

A análise de variância mostrou que houve diferença significativa entre os tratamentos para promoção de crescimento levando em consideração as variáveis estudadas (Tabela 1). Diante disso, os dados médios foram analisados sendo apresentados na sequência.

Tabela 1- Promoção de crescimento em plantas de soja da cultivar BS1511 IPRO, avaliando as variáveis: comprimento parte aérea (CPA), comprimento sistema radicular (CSR), massa verde parte da aérea (MVPA), massa verde do sistema radicular (MVSr), oriundos de sementes inoculadas com a bactéria *Pseudomonas fluorescens* e ou associadas com *Azospirillum brasilense*. UTFPR, Dois Vizinhos – PR, 2022.

Tratamentos	CPA (cm)	CSR (cm)	MVPA(g)	MVSr (g)
Testemunha	46c	57c	25c	19b
<i>A. brasilense</i>	53b	61b	34b	26a
<i>P. fluorescens</i>	59a	64b	33b	27a
<i>A. brasilense</i> + <i>P. fluorescens</i>	64a	67a	39a	29a
CV%	13,4	12,5	9,7	8,6

***Médias seguidas pela mesma letra e mesma coluna não possuem diferença estatística pelo teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade.**

Fonte: Autoria própria (2022).

Para a variável comprimento de parte aérea, o tratamento que apresentou melhor desempenho foi a associação de *Azospirillum brasilense* + *Pseudomonas fluorescens*, contudo, não diferindo estatisticamente do tratamento isolado de *P. fluorescens*. Tais tratamentos apresentaram ganhos significativos quando comparados com a testemunha.

Quando tratamos de comprimento de sistema radicular e massa verde da parte aérea, a associação entre *Azospirillum brasilense* + *Pseudomonas fluorescens* apresentou melhores resultados diferenciando dos demais tratamentos. Proporcionando para soja significativos incrementos nas variáveis CSR e MVPA, evidenciando bom desempenho quando se realiza a inoculação associada destes microrganismos. Esses dados corroboram com a pesquisa de Pacentchuk *et al.* (2020), que avaliou o efeito da co-inoculação de bactérias promotoras de crescimento na soja e observou resultados promissores ao estudar a co-inoculação com *P. fluorescens*.

Também verificado por Novinscak, Joly e Fillion (2019), que a partir da inoculação de *P. fluorescens* via semente, evidenciaram a capacidade da bactéria em aumentar a biomassa vegetal e o rendimento de óleo de sementes em soja e outras culturas como a canola (*Brassica napus* L.). Já Domingues *et al.* (2019), em seus estudos verificaram que a inoculação de *Azospirillum brasilense*, promove resultados positivos no crescimento radicular (comprimento radicular e a massa seca da radícula de soja).

Os resultados apresentados na associação de *P. fluorescens* com *A. brasilense* corroboram com os obtidos por Guimarães *et al.* (2021) que ao associar co-inoculando sementes de soja com *P. fluorescens*, Cepa ATCC 13525 e *B. japonicum*, junto fertilizante fosfatado, constatou que *P. fluorescens* mostrou-se, agronomicamente eficiente promovendo ganhos em crescimento e desenvolvimento da cultura, sendo eficiente em disponibilizar fósforo para as plantas de soja, mantendo ou elevando a produtividade. E quando associada, além de contribuir para a cultura, torna a produção agrícola mais sustentável.

Já quando observamos os resultados obtidos para a variável MVSR, a análise de variância (tabela 1), apresenta que não houve diferenças significativas entre os tratamentos T2= *A. brasilense* T3= *P. fluorescens* T4= *A. brasilense* + *P. fluorescens* respectivamente, entretanto esses três tratamentos diferiram do tratamento testemunha, onde não se realizou a inoculação.

Chiarini *et al.* (1997), por sua vez, ao estudarem *P. fluorescens* em plantas de sorgo, obtiveram aumentos significativos tanto na massa da matéria fresca da parte aérea como também da raiz. Já para Gasoni *et al.* (2001) quando estudaram *P. fluorescens* na cultura da alface alcançaram respostas positivas apenas em relação à massa da matéria fresca da parte aérea. E do mesmo modo, Bulegon *et al.* (2016) obtiveram resultados promissores com a inoculação *A. brasilense*, na cultura da soja.

De acordo com Saharan e Nehra (2011), bactérias do gênero *Azospirillum* não detêm preferências entre plantas cultivadas e espontâneas, diante do exposto essa associação pode contribuir benéficamente como promotora de crescimento. Neste sentido, Hungria (2011), observou o potencial de incremento de raízes e altura das plantas de milho quando realizada a inoculação com *Azospirillum*. Bem como, Cotrim *et al.* (2016) que obteve que plântulas de trigo demonstraram benefícios no crescimento da raiz, da parte aérea e matéria seca de parte aérea através do tratamento via semente com ácido húmico em associação do *Azospirillum brasilense*.

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no estudo realizado, pode-se concluir que a bactéria *P. fluorescens* possui ação na redução do crescimento micelial de *Fusarium tucumaniae*, no entanto quando confrontada com os patógenos *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Phomopsis longicolla* não apresentou potencial antagonista e redução do crescimento micelial dos mesmos. Em todos os confrontos realizados não ocorreu a formação do halo de inibição.

Houve incrementos positivos relacionados às variáveis estudadas para a promoção de crescimento com as condições adotadas no presente estudo. Mostrando que a associação de rizobactérias como *P. fluorescens* e *A. brasilense* na cultura da soja promove ganhos de comprimento de parte aérea e sistema radicular, bem como incrementos na biomassa das plantas. Sendo essa associação positiva no tratamento de sementes.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho foi realizado o estudo preliminar em condições *in vitro* referente ao potencial antagonista da bactéria *P. fluorescens* sobre patógenos de solo que acometem a cultura da soja. Bem como, sua utilização como rizobactéria promotora de crescimento para a cultura, seja em associação ou não com outros agentes biológicos potenciais.

Todavia, com base na revisão da literatura notou-se que diferentes estirpes da bactéria *P. fluorescens* tem potencial como antagonistas de patógenos, apresentam promissores resultados na promoção de crescimento em plantas e potencial de solubilização de fósforo do solo, fornecendo-o para as plantas. Contudo, condições do ambiente em que estão inseridas podem contribuir moderando a sua ação como antagonista. Neste sentido, surgem novas oportunidades de estudo que levam em consideração a área experimental, tentando assim a eficiência da mesma a campo.

REFERÊNCIAS

- AERON, A.; DUBEY, R. C.; MAHESHWARI, D. K.; PANDEY, P.; BAJPAI, V. K.; KANG, S. C. Multifarious activity of bioformulated *Pseudomonas fluorescens* PS1 and biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum* in Indian rapeseed (*Brassica campestris* L.). **European Journal of Plant Pathology**, v. 131, n. 1, p. 81–93, 21 abr. 2011.
- AHEMAD, M.; KIBRET, M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. **Journal of King Saud University-Science**, v. 26, n. 1, p. 1-20, 2014.
- ALMEIDA, A. M. R.; Seixas, C. D. S.; FARIAS, J. R. B.; OLIVEIRA, M. N. D.; FRANCHINI, J. C.; DEBIASI, H.; COSTA, J. M. D.; GAUDÊNCIO, C. A. *Macrophomina phaseolina* em soja. **Embrapa Soja-Docmentos (INFOTECA-E)**, 2014.
- ALMEIDA, A. M. R.; FERREIRA, L. P.; YORINORI, J. T.; SILVA, J. F. V.; HENNING, A.A. Doenças da Soja (*Glycine max* L.). In: KIMATI, H.; AMORIN, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. **Manual de Fitopatologia: Doenças de Plantas cultivadas**. 3ª ed., Vol. 2, São Paulo: Ceres, 1997. p. 596-618.
- ÁLVAREZ, S.P.; ARBELO, O. C.; PÉREZ, M. E.; QUEZADA, G. A. *Pseudomonas fluorescens* Migula, control biológico o patógeno: *Pseudomonas fluorescens*, biological control or pathogen?. **Revista de Protección Vegetal**, v. 30, n. 3, p. 225-234, 2015.
- ANZAI, Y.; KIM, H.; WAKABAYASHI, H.; OYAIZU, H. Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, n. 4, p.1563-1589, 2000.
- AOKI, T.; O'DONNELL, K.; SCANDIANI, M.M. Sudden death syndrome of soybean in South America is caused by four species of Fusarium: *Fusarium brasiliense* sp. nov., *F. cuneirostrum* sp. nov., *F. tucumaniae* and *F. virguliforme*. **Mycoscience**, v. 46, n. 3, p. 162- 183, 2005.
- ARRUDA, G.M.T et al. Caracterização morfológica e molecular do patógeno da síndrome da morte súbita da soja no Brasil. **Plant Pathology**, v. 54, n. 1, pág. 53-65, 2005.
- ARTUZO, F. D.; FOGUESATTO, C. R.; SOUZA, Â. R. L. D.; SILVA, L. X. D. Gestão de custos na produção de milho e soja. **Revista Brasileira de Gestão de Negócios**, v. 20, n. 2, p. 273-294, 2018.
- ATALLAH, O.; YASSIN, S. *Aspergillus* spp. eliminate *Sclerotinia sclerotiorum* by imbalancing the ambient oxalic acid concentration and parasitizing its sclerotia. **Environmental Microbiology**, v. 22, n. 12, p. 5265-5279, 2020.

BARBIERI, R.L.; STUMPF, E.R.T. **Origem e evolução de plantas cultivadas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2008., 2008.

BALDUCCHI, AJ et al. Fatores ambientais que influenciam a infecção de sementes de soja pelas espécies *Phomopsis* e *Diaporthe* durante a maturação das sementes. **Plant Disease** , v. 71, n. 3, pág. 209-212,1987.

BETTIOL, W. Controle biológico de doenças de plantas. **Embrapa Meio Ambiente-Livro científico (ALICE)**, 1991.

BAGNASCO, P.; DE LA FUENTE, L.; GUALTIERI, G.; NOYA, F. & ARIAS, A. *Fluorescent Pseudomonas spp.* as biocontrol agents against forage legume root pathogenic fungi. **Soil Biol. Biochem.**, 30:1317-1322, 1998.

BASF. BS 1511 IPRO. Disponível em < <https://agriculture.basf.com/br/pt/protecao-de-cultivos-e-sementes/produtos/soytech/SoyTech/BS-1511-IPRO.html>>.

BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L.E. Bacteria/Plant Growth-Promoting. In: HILLEL, D. (Ed.) **Encyclopedia of soils in the environment**, Oxford: [S.N.], 2005. v. 1, p. 103-115.

BOLTON, M. D.; THOMMA, B. P.H.J.; NELSON, B. D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. **Molecular plant pathology**, v. 7, n. 1, p. 1-16, 2006.

BOMFIM, M. P.; SÃO JOSÉ, A. R.; REBOUÇAS, T. N. H.; ALMEIDA, S. S. D.; SOUZA, I. V. B.; DIAS, N.O. Avaliação antagonista in vitro e in vivo de *Trichoderma spp.* a *Rhizopus stolonifer* em maracujazeiro amarelo. **Summa Phytopathologica**, v. 36, p. 61-67, 2010.

BORLACHENCO, N. G. C.; GONÇALVES, A. B. Expansão agrícola: elaboração de indicadores de sustentabilidade nas cadeias produtivas de Mato Grosso do Sul. **Interações (Campo Grande)**, v. 18, p. 119-128, 2017.

BRACCINI, A. L.; MARIUCCI, G. E. G.; SUZUKAWA, A. K.; DA SILVA LIMA, L. H.; PICCININ, G. G. Co-inoculação e modos de aplicação de *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* e adubação nitrogenada na nodulação das plantas e rendimento da cultura da soja. **Scientia Agraria Paranaensis**, p. 27-35, 2016.

BRITEZ, A.; DOMINGUEZ, J.A.; GRABOWSKI, C.J. Bactérias benéficas, mecanismos de antagonismo no controle biológico de fungos patogênicos em sementes de soja (*Glycine max* L.). In: **Congresso Brasileiro de Fitopatologia**. 51., Recife. 2019. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Asunción. San Lorenzo, Paraguay. 2019.

BULEGON, L.G.; RAMPIM, L.; KLEIN, J.; KESTRING, D.; GUIMARÃES, V.D.; BATTISTUS, A. G.; INAGAKI, A. M. Componentes de produção e produtividade da cultura da soja submetida à inoculação de *Bradyrhizobium* e *Azospirillum*. **Terra Latinoam** vol.34 no.2. 2016.

BURDMANN, S.; HAMAOU, B.; OKON, Y. Improvement of legume crop yields by coinoculation with *Azospirillum* and *Rhizobium*. The Otto Warburg Center for Agricultural Biotechnology. Israel: **The Hebrew University of Jerusalem**, 2000.

BURDMANN, S.; HAMAOU, B.; OKON, Y. Improvement of legume crop yields by coinoculation with *Azospirillum* and *Rhizobium*. The Otto Warburg Center for Agricultural Biotechnology. Israel: **The Hebrew University of Jerusalem**, 2000.
CÂMARA, G. M. de S. **Introdução ao Agronegócio Soja**. Piracicaba: USP/ESALQ, 2012.

CASSÁN, C. DIAZ-ZORITA, M. *Azospirillum* sp. in current agriculture: From the laboratory to the field. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 1, n. 103, p. 117-130, 2016.

CANTERI, M. G.; ALTHAUS, R. A. DAS VIRGENS FILHO, J. S.; GIGLIOTI, E. A.; GODOY, C. V. . Sasm-agri-sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott-Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, v. 1, n. 2, p. 18 – 24, 2001.

CHIARINI, L.; BEVIVINO, A.; TABACCHIONI, S.; DALMASTRI, C. Inoculation of *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorescens* and *Enterobacter* sp. on *Sorghum bicolor*: Root colonization and plant growth promotion of dual strain inocula. **Soil Biol. Biochem.**, 30:81-87, 1997.

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

CONAB- Companhia Nacional de Abastecimento. **Boletim da safra de grãos**. Disponível em: < <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos>>. Acesso em: 26/07/2022.

COTRIM, M. F.; ALVAREZ, R. C. F.; SERON, A. C. C. qualidade fisiológica de sementes de trigo em resposta a aplicação de azospirillum brasileiro e ácido húmico. **Revista Brasileira de Engenharia de Biosistemas**, 10:349-357, 2016.

CRUZ, C. D. Genes Software-extended and integrated with the R, Matlab and Selegen. **Acta Scientiarum**. Agronomy, v. 38, p. 547-552, 2016.

DALL'AGNOL, A.; ROESSING, A. C.; LAZZAROTTO, J. J.; HIRAKURI, M. H.; OLIVEIRA, A. D. O complexo agroindustrial da soja brasileira. **Embrapa Soja-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2007.

DÖBEREINER, J.; MARRIEL, I.; NERY, M. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 22, n. 1, p. 1464–1473, 1976.

DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F.O. Nitrogen-fixing bacteria in nonleguminous crop plants. **Science Tech, Springer Verlag**, Madison, USA, p. 1-155.1987.

DE WERRA, P.; PÉCHY-TARR, M.; KEEL, C.; MAURHOFER, M.. Papel da produção de ácido glucônico na regulação de características de biocontrole de *Pseudomonas fluorescens* CHA0. **Microbiologia Aplicada e Ambiental**, v. 75, n. 12, pág. 4162-4174, 2009.

DEY, R.K.K.P.; PAL, K.K.; BHATT, D.M.; CHAUHAN, S.M. Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth promoting rhizobacteria. **Microbiological Research**, Gujarat, Índia, 2004. v. 159.p. 371-394, 2004.

DOMINGUES, S.C.O.; DE CUNHA, E.C.P.; SILVA, L.S.; LOPES, E.C.; FERNANDES, S.C.; DE OLIVEIRA, L.C.A.; DE CARVALHO, M.A.C. *Azospirillum brasilense* atuando como promotor de crescimento na cultura da soja. **I Congresso online para aumento da produtividade na soja**. Santa Maria/RS. 2019.

EMBRAPA. **Controle alternativo de doenças de plantas**. Disponível em: < https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia23/AG01/arvore/AG01_23_29920069_2526.html >. Acesso em: 14 de julho de 2021.

EMBRAPA, SOJA. Tecnologias de produção de soja—região central do Brasil 2012 e 2013. **Londrina: Embrapa Soja**, v. 15, p. 261, 2011.

AGEITEC- Agência Embrapa de Informação e Tecnologia. **Soja**. Disponível em: < <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agroenergia/arvore/CONT000fbl23vmz02wx5eo0sawqe3vtdl7vi.html> >. Acesso em: 14 de julho de 2021.

FARIA, T. C. **Resposta da cultura da soja à coinoculação com *Bradyrhizobium japonicum* e *Pseudomonas fluorescens***. Dissertação (Doutorado na Área de concentração em Produção Vegetal Sustentável no Cerrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias, Agronomia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde. 2021.

FERLINI, H. A. Co-Inoculación en Soja (*Glycine max*) con *Bradyrhizobium japonicum* y *Azospirillum brasilense*. **Artículos Técnicos – Agricultura**. 2006. Disponível em: . Acesso: 19 de julho de 2022.

FERREIRA, E. P. de B.; VOSS, M.; DOS SANTOS, H. P.; DE-POLLI, H.; NEVES, M. C.; RUMJANEK, N. G. Diversidade de *Pseudomonas fluorescentes* em diferentes sistemas de manejo do solo e rotação de culturas. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 4, n. 2, p. 140-148, 2009.

FERREIRA, L. P.; LEHMANN, P. S.; ALMEIDA, A. M. R. Doenças da soja no Brasil. **Embrapa Soja-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 1979.

FREITAS, S. S.; VILDOSO, C. I. Rizobactérias e promoção do crescimento de plantas cítricas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 28, p. 987-994, 2004.

GASONI, L.; COZZI, J.; KOBAYASHI, K.; YOSSEN, V.; ZUMELZU, G.; BABBITT, S.; KAHN, N. Yield response of lettuce and potato to bacterial fungal inoculants under field conditions in Cordoba (Argentina). *Zeitschrift Fur Pflanzenkheiten Und Pflanzenschutz J.* **Plant Diseases Protec.**, 108:530-535, 2001.

GAZZONI, D. L.; DALL'AGNOL, A. A saga da soja: de 1050 aC a 2050 dC. **Embrapa Soja-Livro científico (ALICE)**, 2018.

GONZALEZ, M.; PUJOL, M.; METRAUX, J. P.; GONZALEZ-GARCIA, V.; BOLTO, M. D.; BORRÁS-HIDALGO, O. Tobacco leaf spot and root rot caused by *Rhizoctonia solani* Kühn. **Molecular plant pathology**, v. 12, n. 3, p. 209-216, 2011.

GRIGOLLI, J. F. J. **Manejo de Doenças na Cultura da Soja**. Tecnologia e Produção: Soja 2013/2014. Fundação MT: Rondonópolis, 2014.

GUIMARÃES, V. F.; KLEIN, J.; KLEIN, D. K. Promoção de crescimento e solubilização de fosfato na cultura da soja: coinoculação de sementes com *Bradyrhizobium japonicum* e *Pseudomonas fluorescens*. **Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento**, v. 10, n. 11, pág. e366101120078-e366101120078, 2021.

HAAS, D; DÉFAGO, G. Controle biológico de patógenos transmitidos pelo solo por pseudomonas fluorescentes. **Nature reviews microbiology**, v. 3, n. 4, pág. 307-319, 2005.

HARDOIM, P. R.; OVERBEEK, L. S. V & ELSAS, K. D. V. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends in Microbiology** v.16 n.10, p. 463-471, 2008.

HENNING, A.; ALMEIDA, A. M. R.; GODOY, C. V.; SEIXAS, C. D. S.; YORINORI, J. T.; COSTAMILAN, L. M.; FERREIRA, L. P.; MEYER, M. C.; SOARES, R. M.; DIAS, W. P. Manual de identificação de doenças de soja. **Embrapa Soja-Documentos (INFOTECA-E)**, 2014.

HEGEDUS, Dwayne D .; RIMMER, S. Roger. *Sclerotinia sclerotiorum*: quando “ser ou não ser” um patógeno ?. **Cartas de microbiologia FEMS**, v. 251, n. 2, pág. 177-184, 2005.

HERNÁNDEZ, A.; GARCÍA, D.; SOROA, M. R.; HERNÁNDEZ, A. N. Estudio de algunos géneros bacterianos asociados a la rizósfera de los cultivos de Gerbera (*Gerbera jamesonii*) y clavel (*Dianthus barbatus*, *Dianthus caryophyllus*). **Cultivos tropicales**, v. 21, n. 3, p. 15-18, 2000.

HIRAKURI, Marcelo Hiroshi.; LAZZAROTTO, Joelsio José. O agronegócio da soja nos contextos mundial e brasileiro. **Embrapa Soja-Documentos (INFOTECA-E)**, 2014.

HIRAKURI, M. H.; CASTRO, C. D; FRANCHINI, J. C.; DEBIASI, H.; PROCOPIO, S. D. O.; BALBINOT JUNIOR, A. A. Indicadores de sustentabilidade da cadeia produtiva da soja no Brasil. **Embrapa Soja-Documentos (INFOTECA-E)**, 2014.

HOBBS, T.W., SCHMITTHENNER, A.F.; KUTER, G.A. A new *Phomopsis* species from soybean. **Mycologia**, v. 77, p. 535-544, 1985.

HUERGO, L.F.; MONTEIRO, R.A.; BONATTO, A.C.; RIGO, L.U.; STEFFENS, M.B.R.; CRUZ, L.M.; CHUBATSU, L.S.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O. Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense*. In: CASSÁN, F.D.; GARCIA DE

SALAMONE, I. *Azospirillum sp.*: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. **Asociación Argentina de Microbiología**, Argentina, 2008. p.17-35.

HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo.** Londrina – PR: Embrapa Soja, 2011.

ITO, Margarida Fumiko. Principais doenças da cultura da soja e manejo integrado. **Nucleus**, v. 10, n. 3, p. 83-101, 2013.

JÚNIOR, A. F. C.; BORBA, E.; MARTINS, A. L. L.; SOUZA, M. C.; GOMES, F. L.; O, R. S.; CHAGAS, L. F. B. *Bacillus sp.* como promotor de crescimento em soja *Bacillus sp.* **Revista de Ciências Agrárias**, v. 44, n. 2-3, 2021.

KIM, H. J.; CHEN, C.; KABBAGE, M.; DICKMAN, M. B. Identification and characterization of *Sclerotinia sclerotiorum* NADPH oxidases. **Applied and environmental microbiology**, v. 77, n. 21, p. 7721-7729, 2011.

LI, Shuxian. Phomopsis seed decay of soybean. **Soybean—molecular aspects of breeding.** Vienna: Intech Publisher, p. 277-92, 2011.

MASCARENHAS, H. A. A.; TANAKA, R. T. Crescimento em vasos, de cultivares de soja e de trigo em função da saturação de alumínio. **Scientia Agricola**, v. 52, p. 257-262, 1995.

MASCIARELLI, O.; URBANI, L.; REINOSO, H.; LUNA V. Alternative mechanism for the evaluation of indole-3-acetic acid (IAA) production by *Azospirillum brasilense* strains and its effects on the germination and growth of maize seedlings. **Journal of microbiology**, v. 51, p. 590-597, 2013.

MANTOVANI, E. C.; BERNARDO, S.; PALARETTI, L. F.; Irrigação – Princípios e Métodos. 3.ed. Viçosa: Editora UFV, 2009.

MELO, I.S de. *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. **Revisão anual de patologia de plantas**, v. 4, n. 1, p. 261-295, 1996.

MELO, I. S. de.; VALARINI, P. J. Potencial de rizobactérias no controle de *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. em pepino (*Cucumis sativum* L.). **Scientia Agricola**, v. 52, p. 326- 330, 1995.

MENTEN, J. O. M; MACHADO, C. C; MINUSSI, E; CASTRO, C; KIMATI, H. Efeito de alguns fungicidas no crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina* (Tass.) Goid. “*in vitro*”. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 1, n. 2, p. 57-66, 1976.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo. Rizosfera.** p. 407-447. 2 ed. ISBN: 85-87692-33-x. 2006.

MORGAN-JONES, G. The *Diaporthe Phaseolorum* complex of soybean. **Fitopatologia Brasileira**, v. 17, p. 359-359, 1992.

NANDAKUMAR, R.; BABU, S.; VISWANATHAN, R.; RAGUCHANDER, T.; SAMIYAPPAN, R. Induction of systemic resistance in rice against sheath blight disease by *Pseudomonas fluorescens*. **Soil Biol Biochem.**, 33:603-612,2001.

NETO, A. S.; SOUZA, B. DE P.; MASCARO, M, DE H. N. Controle químico associado a indutores de resistência no índice e severidade de mancha alvo em Soja. **III CICA – CONGRESSO INTERNACIONAL DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**. Toledo, 2018.

NOVINSKAK, A.; JOLY, D. L.; FIOLON, M. Complete Genome Sequence of the Plant Growth- Promoting Rhizobacterium *Pseudomonas fluorescens* LBUM677. **Microbiol Resources Announcements**, 8(25), 1-2. 2019.

PACENTCHUK, F.; GOMES, J.M.; DE LIMA,V.A.; MENDES, M.C.; SANDINI, I.E.; JADOSKI, S.O. Efeito da co-inoculação de bactérias promotoras de crescimento na cultura da soja. **Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento** , v. 9, n. 12, pág. e39291211360-e39291211360, 2020.

PRANDO, A. M.; OLIVEIRA, A. B.; LIMA, D. D.; POSSAMAI, E. J.; REIS, E. A.; NOGUEIRA, M. A.; CONTE, O. Coinoculação da soja com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* na safra 2018/2019 no Paraná. **Londrina: Embrapa Soja**, 2019.

RAMAMOORTHY, V.; VISWANATHAN, R.; RAGUCHANDER, T.; PRAKASAM, V.; SAMIYAPPAN, R. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. **Crop protection**, v. 20, n. 1, p. 1-11, 2001.

REZENDE, C. C.; SILVA, M. A.; DE MELLO, L. L. F.; FARIA, D. R.; DE FILIPPI, M. C. C.; LANNA, A. C.; NASCENTE, A. S. Microrganismos multifuncionais: utilização na agricultura. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 2, p. e50810212725-e50810212725, 2021.

RODRIGUES, A.C.; ANTUNES, J.E.L.; DE MEDEIROS, V.V.; DE FRANÇA BARROS, B.G.; FIGUEIREDO, M.D.V.B. Resposta da co-inoculação de bactérias promotoras de crescimento em plantas e *Bradyrhizobium sp.* em caupi. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 1, 2012.

RODRIGUES, R.; SANTANA, C. A. M.; BARBOZA, M. M.; PENA JÚNIOR, M. A. Drivers de mudanças no sistema agroalimentar brasileiro. **Parcerias Estratégicas**, v. 17, n. 34, p. 07-44, 2013.

ROMEIRO, R. da S. **Controle biológico de doenças de plantas: fundamentos**. Universidade Federal de Viçosa, 2007.

ROY, K.W.; LAWRENCE, G.W.; HODGES, H.H.; MCLEAN, K.S.; KILLEBREW, J.F. Sudden death syndrome of soybean: *Fusarium solani* as incitant of *Heterodera glycines* to disease severity. **Phytopathology**, v. 79, p. 191-197, 1989.

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

RUPE, J.C. Frequency and pathogenicity of *Fusarium solani* recovered from soybeans with sudden death syndrome. **Plant Disease**, v. 73, p. 581-584, 1989.

SADEGHIPOUR, O. ABBASI, S. Resposta da soja à seca e inoculação de sementes. **Mundial Appl. Sci. J** , v. 17, n. 1, pág. 55-60, 2012.

SALA, V. M. R.; SILVEIRA, A. P. D da.; CARDOSO, E. J. B. N. Bactérias diazotróficas associadas a plantas não-leguminosas. **Microbiota do solo e qualidade ambiental**, p. 97, 2007.

SAHARAN, B.S.; NEHRA, V. Rizobactérias promotoras de crescimento vegetal: uma revisão crítica. **Life Sci Med Res** , v. 21, n. 1, pág. 30, 2011.

SANTOS, P.; BENATO, L.; DE SOUZA, N.V.; VIEIRA, N.; ALMEIDA, A. Utilização de *Pseudomonas fluorescens* no controle biológico de *Macrophomina phaseolina*. **Embrapa Soja-Documentos (INFOTECA-E)**, 2010.

SARAN, P.E. Manual de identificação das doenças da soja. 2013. 196 p

SCHNEIDER, F.; PANIZZON, L.; SORDI, A.; LAJÚS, C.; CERICATO, A.; KLEIN, C. EFICIÊNCIA AGRONÔMICA DA CULTURA DA SOJA (*Glycine max (L.) Merrill*) SUBMETIDA A COINOCULAÇÃO. Curitiba, vol. 18, nº. 4, p. 72-79, out/Dez, 2017.
SFREDO, G; OLIVEIRA, M. Soja Molibdênio e Cobalto. Londrina, PR, p.14, 2010.
Disponível em:
<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/859439/1/Doc322online1.pdf>
Acesso em: 20 de julho de 2022.

SILVA, G. B. P.; HECKLER, L. I.; dos SANTOS, R. F.; DURIGON, M. R.; BLUME, E. Identificação e utilização de *Trichoderma spp.* armazenados e nativos no biocontrole de *Sclerotinia sclerotiorum*. **Revista Caatinga**, v. 28, p. 33-42, 2015.

SINCLAIR, J.B. Reevaluation of grading standards and discounts for fungus-damaged soybean seeds. **Journal of the American Oil Chemists Society, Quebec**, v. 72, p. 1415- 1419, 1995.

SHOWKAT, Sageera et al. Controle biológico de *Fusarium oxysporum* e *Aspergillus sp.* por *Pseudomonas fluorescens* isoladas do solo da rizosfera de trigo da Caxemira. **Journal of Pharmacy and Biological Sciences** , v. 1, n. 4, pág. 24-32, 2012.

SOLINO, A. J. S.; Oliveira, J. B. S.; Schwan-Estrada, K. R. F.; Alencar, M. S. R.; Ribeiro, L. M. Potencial antagonista e controle *in vitro* de alternaria solani por fungos sapróbios. **Summa Phytopathologica**, v. 43, p. 199-204, 2017.

SOJA, Embrapa. **Sistemas de produção 15**. 2011.

SOTTERO, A.N.; FREITAS, S.D.S.; MELO, A.M.T.D.;Trani, P.E. Rizobactérias e alface: colonização rizosférica, promoção de crescimento e controle biológico. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 30, p. 225-234, 2006.

TARRAND, J.J.; KRIEG, N.R.; DÖBEREINER, J. A taxonomic study of the Spirillum lipoferum group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 24, n. 1, p. 967-980, 1978.

TIEN, T.M.; GASKINS, M.H.; HUBBELL, D.H. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). **Applied and Environmental Microbiology**, v.37, p.1016-1024, 1979.

VICENTE, E. R. J.S. **Produtividade da soja inoculada com duas espécies de bactérias e benefícios à pastagem em sucessão**. Dissertação (Doutorado Área de concentração em Produção Vegetal)- Pró-reitoria e Pós-Graduação Universidade do oeste Paulista. 2019.

VIEIRA JUNIOR, J. R.; FERNANDES, C. D. F.; ANTUNES JÚNIOR, H.; da SILVA, M. S.; da SILVA, D. S. G.; da SILVA, U. O. Rizobactérias como agentes de controle biológico e promotores de crescimento de plantas. **Embrapa Rondônia- Documentos (INFOTECA-E)**, 2013.

WRATHER, JA et al. Data de plantio e efeitos da cultivar na produtividade da soja, qualidade da semente e *Phomopsis* sp. infecção de sementes. **Doença de planta**, v. 87, n. 5, pág. 529-532, 2003.

ZAGO, V. C. P.; DE-POLLI, H.; RUMJANEK, N. G. *Pseudomonas* spp. fluorescentes- bactérias promotoras de crescimento de plantas e biocontroladoras de fitopatógenos em sistemas de produção agrícola. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2000. 31 f. (Embrapa-CNPAB. Documento, 127).