

DENISE PAULETTO SPANHOL

**POTENCIAL DE BACTÉRIAS PARA PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO
VEGETAL E PRODUÇÃO DE COMPOSTOS RELACIONADOS AO
SISTEMA DE DEFESA EM PLANTAS DE SOJA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Mestrado Profissional em Defesa Sanitária Vegetal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2017

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa

T

S735p
2017 Spanhol, Denise Pauletto, 1988-
Potencial de bactérias para promoção do crescimento vegetal e produção de compostos relacionados ao sistema de defesa em plantas de soja / Denise Pauletto Spanhol. - Viçosa, MG, 2017.
viii, 36f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: José Rogério de Oliveira.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.28-36.

1. Mofo-branco - Controle biológico. 2. Bactérias. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Fitopatologia. Programa de Pós-graduação em Defesa Sanitária Vegetal. II. Título.

CDD 22 ed. 632.96

DENISE PAULETTO SPANHOL

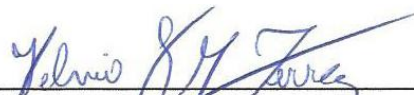
**POTENCIAL DE BACTÉRIAS PARA PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO
VEGETAL E PRODUÇÃO DE COMPOSTOS RELACIONADOS AO
SISTEMA DE DEFESA EM PLANTAS DE SOJA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Mestrado Profissional em Defesa Sanitária Vegetal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

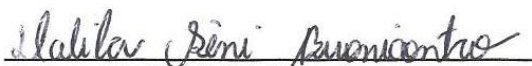
APROVADA: 27 de abril de 2017.



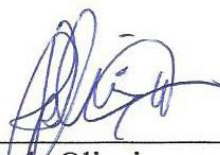
Bianca Obes Corrêa
(Coorientadora)



Hêlvio Gledson Maciel Ferraz
(Coorientador)



Dalila Sêni Buonicontro



José Rogério de Oliveira
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade da vida.

À minha mãe Gessi Spanhol e ao meu pai Vergílio Spanhol, pelo incentivo aos estudos.

À minha irmã Caroline Spanhol, pelo apoio em todas as horas.

Ao meu namorado Marcelo Vedovatto, por ter estado sempre ao meu lado.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), pelo Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal (UNIDERP), por ter autorizado o uso de suas estruturas para a realização deste trabalho.

À minha Professora e Coorientadora Dra. Bianca Obes Corrêa, pela orientação, pelo carinho, pela atenção, pela confiança, pela paciência, pelo apoio e pela amizade.

Ao meu Professor e Orientador Dr. José Rogério de Oliveira e ao meu Coorientador Dr. Hélvio Ferraz, pela orientação, pelo apoio, pela confiança e pela disposição em me auxiliar.

À Professora Dra. Denise Pedrinho, por ter-me acompanhado neste trabalho.

À Professora Dra. Rosemary Matias, pelo auxílio na análise fitoquímica e pela disponibilidade em me atender.

À Professora Dra. Juliane Ludwig, por sempre me incentivar a dar continuidade aos estudos.

Ao Marlos e ao Éder, responsáveis pela Horta Didática, pelo auxílio na manutenção dos experimentos.

Aos estagiários Willyan, Richard, Wellington, Lara, Amanda, Marcos, Emily, Felipe e Fernanda, por não terem medido esforços para me auxiliar nos experimentos.

Às técnicas de laboratório Evaneza, Karen e Ellen, por estarem sempre à disposição.

Aos meus amigos, por terem-me acompanhado nesta jornada, em especial a Janaína Oliveira, Mayara Comparim, Priscilla Castilhos, Sandro Brauner e Marcelo Pessatto.

Aos meus colegas do Mestrado, em especial a Clara Brandão e Talita Fernanda.

Aos membros da minha banca examinadora, pela disponibilidade de seu tempo em propor melhorias neste trabalho.

Aos meus professores e à Universidade Federal de Viçosa, pelo ensino e pela oportunidade de poder estudar e fazer parte desta Instituição.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	v
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO GERAL	4
2.1. Objetivos específicos	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
4. MATERIAL E MÉTODOS	11
4.1. Local dos experimentos e origem do material vegetal	11
4.2. Origem, cultivo e manutenção dos microrganismos	11
4.3. Antagonistas e compatibilidade com <i>Bradyrhizobium japonicum</i>	12
4.4. Ensaio de promoção de crescimento vegetal	13
4.5. Análise fitoquímica	14
4.6. Quantificação dos compostos fenólicos e flavonoides	14
4.7. Ensaio com folhas destacadas	15
4.8. Ensaio de biocontrole via microbiolização em casa de vegetação	16
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
6. CONCLUSÃO	27
7. REFERÊNCIAS	28

RESUMO

SPANHOL, Denise Pauletto, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2017. **Potencial de bactérias para promoção do crescimento vegetal e produção de compostos relacionados ao sistema de defesa em plantas de soja.** Orientador: José Rogério de Oliveira. Coorientadores: Bianca Obes Corrêa e Hêlvio Gledson Maciel Ferraz.

Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de bactérias isoladas de solo sob o cultivo de cana-de-açúcar em dois cultivares de soja na promoção de crescimento vegetativo, na produção de compostos relacionados ao sistema de defesa em condições *in vivo* e no controle biológico do mofo-branco. Os ensaios foram realizados com as bactérias antagonistas Fit 09 (*Bacillus cereus*) e Fit 62 (*Bacillus thuringiensis*), com o fungo *Sclerotinia sclerotiorum* e com os cultivares de soja M6210 IPRO e Brasmax Garra IPRO. Nos ensaios *in vivo* foi avaliada a capacidade das bactérias na promoção do crescimento de plantas de soja e na constituição dos compostos secundários produzidos pelas plantas oriundas de sementes microbiolizadas com suspensões bacterianas. Foi avaliada também a compatibilidade de *Bradyrhizobium japonicum* com as bactérias Fit 09 e Fit 62, e o ensaio de controle do mofo-branco *in vitro* se deu por meio de bioensaios com folhas destacadas e *in vivo*, com a microbiolização das sementes dos dois cultivares com suspensões dessas bactérias. No ensaio de promoção de crescimento, as bactérias aumentaram o poder germinativo do cultivar M6210 IPRO. A avaliação da massa de matérias fresca e

seca não apontou diferenças, e a análise fitoquímica revelou que as bactérias auxiliam positivamente a produção dos compostos relacionados ao sistema de defesa, principalmente no cultivar Brasmax Garra IPRO. As bactérias Fit 09 e Fit 62 apresentaram compatibilidade com *B. japonicum*, ressaltando-se que no ensaio de controle biológico *in vitro* foi verificado que a bactéria Fit 09 teve controle superior a 70% em ambos os cultivares, enquanto no controle *in vivo*, a doença não se manifestou.

ABSTRACT

SPANHOL, Denise Pauletto, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, April, 2017.
Potential of bacteria to promote plant growth and production of compounds related to the defense system in soybean plants. Adviser: José Rogério de Oliveira.
Co-Advisers: Bianca Obes Corrêa and Hélivio Gledson Maciel Ferraz.

The objective of this work was to evaluate the potential of isolated soil bacteria under sugarcane cultivation in two soybean cultivars, in the promotion of vegetative growth and in the production of compounds related to the defense system in in vivo conditions, and in the Biological control of white mold. The assays were performed with the antagonistic bacteria Fit 09 (*Bacillus cereus*) and Fit 62 (*Bacillus thuringiensis*), with the fungus *Sclerotinia sclerotiorum* and with soybean cultivars M6210 IPRO and Brasmax Garra IPRO. The in vivo assays evaluated the ability of bacteria to promote the growth of soybean plants and the formation of the secondary compounds produced by plants derived from microbiolized seeds with bacterial suspensions. The compatibility of *Bradyrhizobium japonicum* with the Fit 09 and Fit 62 bacteria was also evaluated, and the in vitro white mold control assay was performed by means of detached and in vivo leaf bioassays with the microbiolization of the seeds of the two cultivars. Suspensions of Fit 09 and Fit 62 bacteria. In the growth promoting assay, bacteria increased the germinative power in the cultivar M6210 IPRO, in the evaluation of the fresh and dry mass there were no differences and in the phytochemical analysis, the bacteria positively in the production of the

related compounds to the defense system, mainly in the cultivar Brasmax Garra IPRO. The bacteria Fit 09 and Fit 62 showed compatibility with *B. japonicum* and in the biological control test in vitro, it was verified that the bacterium Fit 09 promoted control superior to 70% in both cultivars and in vivo the disease did not manifest itself.

1. INTRODUÇÃO

A cultura da soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é considerada uma das mais importantes culturas agrícolas do país devido ao seu considerável valor socioeconômico, determinado pela ampla utilização dos seus produtos, subprodutos e expressão nos mercados externo e interno (RESENDE, 2009). É a cultura agrícola brasileira que mais cresce no país, correspondendo a mais de 56% da área cultivada em grãos (CONAB, 2016). O acréscimo da produtividade está ligado aos avanços tecnológicos, ao manejo e à eficiência dos produtores rurais. O grão é um componente fundamental na fabricação de rações animais e de alimentos para o consumo humano. A soja é cultivada especialmente nas Regiões Centro-Oeste e Sul do país e tornou-se um dos produtos de maior destaque da agricultura nacional e da balança comercial (MAPA, 2013).

Em 2010, Vencato et al. (2010) mostraram o Brasil como o país com a maior capacidade de aumentar a produção de soja em comparação com os grandes produtores mundiais, tanto pelo aumento da produtividade quanto pela ampliação da área cultivada. Esses autores previam que até 2020 a produção brasileira ultrapassaria a casa dos 100 milhões de toneladas, o que tornaria o Brasil o maior produtor mundial desse grão. Dados da CONAB (2017) apontaram uma projeção de 10,6% de crescimento da safra 2016/2017 de soja, cuja produção pode atingir 105,6 milhões de toneladas, antecipando a previsão de Vencato et al. (*Op. Cit.*). Apesar dos números positivos e do otimismo do setor, deve-se atentar para os fatores que podem afetar a produção. Entre esses fatores, as doenças estão entre os principais, pois

podem reduzir drasticamente a produtividade da soja. Já foram identificadas no Brasil em torno de 40 doenças causadas por fungos, bactérias, nematoides e vírus (YORINORI et al., 2005), afetando a cultura. De acordo com Almeida et al. (2005), estima-se que os danos ocasionados por doenças podem diminuir a produtividade de 15 a 20%; porém, se medidas de controle não forem tomadas, as perdas na produção podem ser de até 100%.

Entre as doenças que afetam a cultura da soja, destaca-se o mofo-branco, causado pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, que pertence ao Filo Ascomycota, Classe Leotiomycetes, Ordem Helotiales e Família Sclerotiniaceae (MACENA, 2009). A disseminação do patógeno ocorre, principalmente, por meio de sementes infectadas com o micélio do fungo ou contaminadas por estruturas de sobrevivência denominadas escleródios. Estes, quando presentes no solo em condições favoráveis, germinam e formam apotécios, que produzem grande quantidade de ascósporos, fonte primária de infecção (BOLTON et al., 2006). Os sintomas iniciais são lesões aquosas de onde surgem as hifas, formando o abundante micélio. Com o avanço da colonização do tecido vegetal, as lesões tornam-se secas, de aspecto descolorido, normalmente esbranquiçadas, e não apresentam mais sinais externos. O fungo *S. sclerotiorum* já está disseminado por todo o país, sendo as Regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste as mais afetadas, pois possuem condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento do patógeno, como alta umidade relativa do ar e temperaturas amenas (ALMEIDA et al., 2005).

Ferraz et al. (2003) relataram que, em várias culturas, o controle do mofo-branco tem sido muito difícil, em decorrência da capacidade do patógeno em produzir escleródios, associado à alta variabilidade genética. Outro problema encontrado pelos sojicultores é a aplicação de fungicidas para o controle do mofo-branco, devido ao alto custo, à baixa eficiência e a efeitos negativos para o meio ambiente e também para o homem, fazendo que novas alternativas de controle e manejo da doença sejam buscadas. Há crescente preocupação da sociedade diante da utilização de produtos químicos na agricultura, os quais podem causar danos tanto à saúde humana quanto ao equilíbrio dos sistemas biológicos, o que leva à necessidade de diminuir o seu uso nas mais diversas culturas (MORANDI; BETTIOL, 2009). Nesse contexto, o controle biológico surge como opção para o manejo de diferentes doenças de plantas (MORANDI; BETTIOL, 2009), envolvendo a redução da

densidade populacional do patógeno, a proteção biológica da superfície de plantas e o controle dentro da planta (SILVEIRA, 2001).

Tendo em vista que a sustentabilidade é um caminho a ser seguido na produção de alimentos, a utilização de microrganismos benéficos é uma opção para substituir ou reduzir o uso de produtos químicos na agricultura (CASTRO; MELO, 2007; SHAHAROONA et al., 2008), seja diretamente como promotores do crescimento, seja como agentes de controle biológico de doenças (FREITAS; AGUILAR-VILDOSO, 2004). Entre esses promotores, destacam-se as bactérias, por apresentarem diferentes mecanismos de ação, como parasitismo, antibiose, competição ou indução de resistência (ROMEIRO, 2007; KUMAR et al., 2012). Bactérias pertencentes aos gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus* têm sido as mais estudadas, devido à sua capacidade de induzir resistência, bem como de exercer antagonismo direto pela produção de compostos antimicrobianos (LATHA et al., 2011; WU et al., 2014).

Considerando a necessidade de encontrar alternativas para o manejo do mofo-branco na cultura da soja, as bactérias do gênero *Bacillus*, especialmente a espécie *B. subtilis*, mostram-se importantes agentes de biocontrole e podem também atuar como rizobactérias promotoras de crescimento em plantas – PGPR (GUPTA et al., 2000). Com isso, neste trabalho avaliou-se o potencial de bactérias isoladas de solo sob o cultivo de cana-de-açúcar no controle biológico do mofo-branco em dois cultivares de soja, bem como na promoção do crescimento vegetativo em condições de casa de vegetação e na capacidade de produção de compostos relacionados ao sistema de defesa das plantas.

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial de bactérias isoladas de solo sob o cultivo de cana-de-açúcar na promoção do crescimento vegetativo, na produção de compostos relacionados ao sistema de defesa das plantas e no controle biológico do mofo-branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) em dois cultivares de soja.

2.1. Objetivos específicos

- Avaliar a capacidade de isolados bacterianos na promoção do crescimento de plantas de soja.
- Analisar a constituição dos compostos secundários produzidos por plantas oriundas de sementes microbiolizadas com isolados bacterianos, visando à produção de compostos relacionados à defesa vegetal.
- Examinar o controle do mofo-branco *in vitro*, utilizando bactérias antagonistas, por meio de bioensaios com folhas destacadas, em dois cultivares de soja.
- Testar a eficiência da microbiolização de sementes de dois cultivares de soja, com bactérias antagonistas, diante da capacidade de controle do mofo-branco *in vivo*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma cultura produzida em todo o mundo. Originária do continente asiático, mais precisamente da China, essa leguminosa foi domesticada e melhorada por meio de cruzamento natural entre duas espécies selvagens e introduzida na Europa e América (EMBRAPA, 2013). A inserção da soja no Brasil ocorreu por volta do ano 1882, porém o interesse pela cultura não era pelo grão e, sim, pela sua utilização como forrageira e para a rotação de culturas (EMBRAPA, 2003). O primeiro registro do cultivo comercial de soja no Brasil está datado do ano 1914, no município de Santa Rosa, Estado do Rio Grande do Sul, em virtude da equivalência com o clima do sul dos Estados Unidos (EMBRAPA, 2003). A partir de 1960, com o desenvolvimento da política de subsídios ao trigo e a ampliação da indústria de óleo foi que a soja alcançou o *status* de alta importância econômica para o Brasil, e a sua introdução em outras regiões do país só foi possível graças ao avanço das pesquisas, que resultaram no desenvolvimento de cultivares adequados às regiões mais quentes, no uso da técnica do plantio direto e na eficiência dos produtores (APROSOJA, 2014).

Levantamentos da safra de soja 2015/2016 evidenciaram que o Brasil atingiu a produção de 95,631 milhões de toneladas, com área plantada de 33,177 milhões de hectares e produtividade de 2.882 kg/ha, sendo o segundo maior produtor mundial desse grão, atrás somente dos Estados Unidos, que obtiveram a produção de 106,934 milhões de toneladas (CONAB, 2016). Os três maiores produtores de soja no Brasil são os Estados do Mato Grosso, Paraná e Rio Grande do Sul (CONAB, 2016).

Mesmo com o país obtendo excelentes safras, alguns fatores acabam limitando o aumento da produção. Entre esses fatores, podemos citar a ocorrência de pragas, que podem ser nematoides, vírus, fungos, bactérias, insetos, ácaros e plantas daninhas. Diante dessas potenciais ameaças, destacam-se os fitopatógenos, os quais podem causar altas perdas de produtividade devido às dificuldades de controle. A cultura da soja está sujeita ao ataque de grande número de fitopatógenos, principalmente os fungos, que podem ocasionar danos tanto ao rendimento quanto à qualidade das sementes (GOULART, 2011).

Entre as doenças fúngicas que atacam a cultura da soja, podemos destacar o mofo- branco, ou podridão-branca da haste, causada por *S. sclerotiorum*, patógeno relatado pela primeira vez no Brasil em 1921, em São Paulo, em cultivos de batateira (CHAVES, 1964). O mofo-branco é uma das principais enfermidades da soja, juntamente com a ferrugem-asiática. Devido aos danos causados em várias culturas de interesse agrônômico, *S. sclerotiorum* é considerado um dos patógenos fúngicos de maior seriedade no mundo; outro fator preocupante é que esse fungo está disseminado em praticamente todas as regiões produtoras (LEITE, 2005). Relatos nos Estados Unidos, entre os anos de 1997 a 2007, informam que as perdas causadas por *S. sclerotiorum* alcançaram 4,9 milhões de toneladas. No Brasil, os relatos de perdas na produção somente na cultura da soja variam em até 70%, porém, se as condições climáticas forem muito favoráveis ao patógeno, essas perdas podem ser ainda superiores (CANTERI; SUMIDA, 2017). Diante da grande limitação que doenças podem causar a diversas culturas, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) divulgou, no ano 2015, uma lista com as oito pragas de maior risco fitossanitário para as principais culturas, com validade de um ano, em que se prioriza o registro de produtos fitossanitários e técnicas de controle. Nessa lista, encontra-se *Sclerotinia sclerotiorum* nas culturas de soja, feijão e algodão (MAPA, 2015). A disseminação desse patógeno ocorre, principalmente, por meio de sementes infectadas, que podem apresentar o micélio do fungo; ou por meio da contaminação, devido à presença de estruturas de sobrevivência denominadas escleródios, que podem permanecer no solo por vários anos. Os escleródios presentes no solo, em condições favoráveis, germinam e formam apotécios, que produzem grande quantidade de ascósporos, fonte primária de infecção (BOLTON et al., 2006). Todos os estádios de desenvolvimento da cultura são suscetíveis ao patógeno, e as fases mais críticas vão desde a floração total até o começo do desenvolvimento das

vagens e do enchimento dos grãos (DANIELSON et al., 2004). O fungo pode colonizar todas as partes da planta, mas os sintomas da doença são mais evidentes no terço inferior, nas axilas das folhas e nos ramos laterais (ALMEIDA et al., 2005). As perdas podem ser de grande proporção, sobretudo quando há demora na tomada de decisão e as medidas preventivas não são adotadas.

O controle do mofo-branco é considerado difícil, pois os escleródios podem permanecer por longo período no solo e os ascósporos que produzem a infecção aérea podem ser procedentes de escleródios que se encontram a longas distâncias (LOBO JUNIOR, 2010). Dessa maneira, o controle deve integrar várias medidas, como a utilização de sementes livres do patógeno, tratamento de sementes, destruição de restos culturais, rotação de culturas, controle de plantas daninhas, adubação correta, controle biológico, uso de fungicidas, limpeza do maquinário e espaçamento entre linhas.

O controle biológico com o uso de microrganismos antagonistas é alternativa bastante promissora no controle do mofo-branco, pois auxilia na redução da densidade do inóculo que o patógeno produz no solo e, conseqüentemente, tem-se menor incidência e, ou, severidade da doença (LOBO JUNIOR, 2013). É um método de controle que está em destaque na agricultura, pois pode substituir ou ser aplicado em conjunto com produtos químicos, melhorando a qualidade dos produtos e contribuindo para a preservação do ambiente (SUMIDA, 2012). Vários fungos e bactérias têm sido estudados com o propósito de utilização no biocontrole de doenças de plantas, entre os quais podem ser citados: *Trichoderma*, *Penicillium*, *Pseudomonas* e *Bacillus* (BETTIOL et al., 2009).

Entre os microrganismos utilizados no controle biológico, as bactérias merecem destaque, e grande ênfase tem sido dada às rizobactérias, que são definidas como bactérias que podem se multiplicar e colonizar as raízes das plantas em todas as fases de desenvolvimento, mesmo com a existência de microflora opoente (ANTOUN; KLOPPER, 2001). Existem muitas rizobactérias benéficas às plantas, denominadas *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria* (PGPR), que podem promover o biocontrole e o crescimento vegetal e aumentar a produtividade (ROMEIRO, 2007). O controle biológico realizado pelas bactérias pode ocorrer por antagonismo direto, como antibiose, competição por espaço e nutrientes, parasitismo ou, também, pela indução de resistência (ROMEIRO, 2007; KUMAR et al., 2012). No antagonismo direto, o que possui maior destaque é a antibiose, em que um ou mais

metabólitos gerados por um organismo têm eficácia contrária sobre o outro (BETTIOL, 1991). Na antibiose são produzidos os antibióticos, que são compostos orgânicos de baixo peso molecular e que, em baixas concentrações, são prejudiciais ao desenvolvimento de outros indivíduos (FRAVEL, 1988). Também podemos citar a disputa por espaço, que é a apropriação de sítios de colonização; a disputa por nutrientes, como ferro, nitrogênio e carbono (PAULITZ, 1990); e o parasitismo, que é a interação entre duas espécies em que uma delas se beneficia da outra.

Entre as principais bactérias utilizadas no controle biológico, destacam-se aquelas pertencentes aos gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus*. Bactérias antagonicas, como *Bacillus subtilis*, agem, principalmente, por antibiose, parasitismo e competição. Os microrganismos que exercem antibiose possuem vasto espectro de ação (KUPPER et al., 2003). A promoção de crescimento proporcionada pela espécie *B. subtilis* é resultante do incremento da fixação de nitrogênio, da síntese de fito-hormônios e da solubilização de nutrientes (MANJULA; PODILE, 2005). A associação positiva possibilita o incremento fisiológico de metabólitos que estimulam o sistema radicular, facilitando a absorção de nutrientes (MANJULA; PODILE, 2005).

Bactérias do gênero *Pseudomonas* promovem o crescimento de plantas e influenciam na atividade de microrganismos fitopatogênicos por diversas maneiras, abrangendo a produção de hidrocianetos, compostos voláteis e antibióticos (WELLER; TOMASHOW, 1994). As bactérias desse grupo são aptas a gerar compostos que capturam o Fe^{+++} na rizosfera, deixando esse nutriente indisponível para os outros microrganismos. Esses compostos são nomeados sideróforos e, em ambientes pobres em Fe^{+++} , limitam o crescimento de microrganismos não produtores de quelantes de ferro (FREITAS, 2007; ROMEIRO, 2007).

Hormônios produzidos por microrganismos são intensivamente estudados para o controle de doenças em plantas. Por exemplo, Barka et al. (2000) notaram melhora da resistência de videiras a *Botrytis cinerea* relacionada ao acréscimo da produtividade de citocininas na rizosfera. Tem sido estudado o emprego de hormônios para a promoção de crescimento em plantas. A facilidade demonstrada pelas rizobactérias em incitar o crescimento é atribuída a diversos mecanismos, como a fixação de nitrogênio e a produção de fito-hormônios, como auxinas, citocinas e giberelinas (GRAY; SMITH, 2005).

O controle biológico pode ser por meio da indução de resistência, quando uma rizobactéria coloniza a raiz da planta; e de elicitores, que se encontram na célula bacteriana e são condensados e agem como indutores de resistência. Esses indutores atuam em forma de sinais e mobilizam os mecanismos de defesa, ocorrendo, dessa maneira, a resistência sistêmica induzida (VAN LOON et al., 1998; BARBOSA, 2009). A indução de resistência possui diversos benefícios, como efetividade contra vários patógenos, como vírus, bactérias, fungos e nematoides. Entretanto, há equilíbrio no orquestramento dos componentes de resistência expressados pela planta de acordo com o tipo de patógeno, sendo os mecanismos de resistência estimulados quando o patógeno se encontra presente (STADNIK, 2000; CAMARGO; BERGAMIN FILHO, 1995). Diversos microrganismos podem induzir a formação de sinais no vegetal, ocasionando respostas de proteção contra vasto número de fitopatógenos (SOBRINHO et al., 2005). Ongena et al. (2007) constataram a eficácia do uso de moléculas produzidas por *Bacillus subtilis*, em que essas moléculas podem agir como eliciadoras para ocasionar a indução de resistência, possibilitando a ação sistêmica de proteção contra o ataque de patógenos. Em estudos de biocontrole *in vitro* e *in vivo* contra patógenos causadores de doenças, Sangiogo et al. (2014) relataram que, em ensaios com folhas destacadas de canola procedentes de sementes tratadas com bactérias dos gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus*, houve a redução de 100% do crescimento micelial de *S. sclerotiorum*. Em estudos realizados por Zhou et al. (2014), foi demonstrada a eficiência de alguns isolados de *P. fluorescens* para ativar a defesa contra *Ralstonia solanacearum*, tanto em laboratório quanto *in vivo*, além de favorecerem a promoção de crescimento na cultura do tomateiro. O uso de *Bacillus subtilis* resultou no controle de *Fusarium oxysporum* na cultura do grão-de-bico em condições *in vivo* (MORADI et al., 2012). Maketon et al. (2008) avaliaram a eficiência de *Bacillus subtilis* e *Trichoderma harsianum* contra *Ralstonia solanacearum*, *Pythium aphanidermatum* e *Cercospora nicotiana* na cultura do fumo, e os microrganismos revelaram ser eficazes para o controle desses patógenos.

Como forma de defesa das plantas, podemos citar a produção de metabólitos secundários que elas produzem. Esses metabólitos podem ser induzidos pelo ataque de patógenos e por danos causados por agentes químicos e mecânicos, bem como por intermédio de reações bioquímicas (AGRIOS, 2004). Essas reações são constantemente relacionadas com a geração de substâncias fungitóxicas em volta do sítio do ferimento, ocasionando, assim, o desenvolvimento de uma camada protetora.

Alguns dos compostos apresentam elevadas concentrações, que são capazes de limitar o desenvolvimento dos fungos e bactérias (AGRIOS, 2004). Os metabólitos secundários podem ser classificados quanto à sua estrutura química em: nitrogenados, que são os alcaloides, aminoácidos não proteicos e glicosídeos cianogênicos; os terpenoides, que são triterpenos, saponinas, glicosídeos cardiotônicos e esteroides; e os compostos fenólicos, que são representados pelas ligninas, flavonoides, taninos, antocianinas, antraquinonas e cumarinas (HARBONE, 1988; CARVALHO et al., 2004; SANTOS, 2004). Os compostos fenólicos comuns na resistência contra os patógenos podem ser produzidos em plantas saudáveis e também em plantas doentes, mas sua concentração aumenta quando ocorre a infecção provocada pelo patógeno (EBEL, 1986). Os compostos fenólicos são encontrados em todas as plantas e consistem de fenóis simples, ácido benzoico, cinâmico, cumarinas, taninos, ligninas, lignanos e flavonoides (KHODDAMI et al., 2013). A soja produz a gliceolina, um pterocarpanoide (flavonoide) utilizado na defesa contra patógenos (GOUVEA et al., 2011).

O uso de rizobactérias para promover o crescimento ou aumentar o rendimento de determinada cultura pode promover maior valor agregado, pois elas são menos nocivas ao meio ambiente e, também, podem proporcionar maior rendimento, o que possibilitará ao produtor rural melhor retorno financeiro (EMBRAPA, 2013).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Local dos experimentos e origem do material vegetal

Os experimentos foram realizados nos Laboratórios de Fitopatologia, de Microbiologia e de Química e os experimentos com material vegetal, na casa de vegetação da Horta Didática. Todas as dependências utilizadas pertencem à Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal (UNIDERP), no Campus UNIDERP Agrárias, localizado em Campo Grande, MS.

Os cultivares de soja utilizados foram M6210 IPRO e Brasmax Garra IPRO, todos de ciclo precoce, cultivados no centro sul do Estado de Mato Grosso do Sul. Os ensaios foram realizados entre os meses de novembro de 2016 e março de 2017.

4.2. Origem, cultivo e manutenção dos microrganismos

Os ensaios foram realizados com bactérias antagonistas isoladas de solo em cultivo com cana-de-açúcar. Foram utilizados os isolados Fit 09 (*Bacillus cereus*) e Fit 62 (*Bacillus thuringiensis*) previamente selecionados em estudos anteriores e identificados por sequenciamento do gene 16S rDNA, com códigos de acesso hm104656.1 e EU702408.1, respectivamente. Para preservação, os isolados foram cultivados em meio de cultura nutriente-ágar (NA: extrato de carne – 3,0 g; peptona – 5,0 g; ágar – 20,0 g; água destilada – qsp 1.000 mL), com pH 6,8-7,0, em tubos de ensaio durante 48 h, a 28 °C. Logo após, as culturas bacterianas foram cobertas com

óleo mineral esterilizado e os tubos, tampados com algodão, selados com filme plástico e armazenados em posição vertical. Para a preparação de inóculo, as bactérias foram sempre cultivadas em meio de cultura 523 (KADO; HESKETT, 1970) por 24 h e mantidas em BOD na temperatura de 28 °C.

O fungo fitopatogênico *Sclerotinia sclerotiorum* utilizado foi obtido de plantas com sintomas característicos da doença, e os isolados foram mantidos por repicagens contínuas em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA). Para preparação do inóculo, o patógeno foi cultivado em meio BDA e mantido em BOD por 120 h, com temperatura média de 22 °C e fotoperíodo de 12 h.

Tanto os isolados de bactérias antagonistas quanto os isolados de *S. sclerotiorum* eram pertencentes à coleção do Laboratório de Fitopatologia e Microbiologia Agrícola da UNIDERP.

4.3. Antagonistas e compatibilidade com *Bradyrhizobium japonicum*

Os isolados bacterianos utilizados neste trabalho foram avaliados quanto à compatibilidade com *B. japonicum*. Foi realizado o isolamento da bactéria do inoculante líquido da Fertibio Soja®, pertencente à espécie *Bradyrhizobium japonicum*, em 10 placas com o meio de cultura LM (levedura-manitol), (fosfato de potássio 0,5 g L⁻¹; sulfato de magnésio 0,2 g L⁻¹; cloreto de sódio 0,1 g L⁻¹; manitol 10 g L⁻¹; extrato de levedura 0,5 g L⁻¹; ágar 20,0 g L⁻¹; ph 6,8) (VICENT, 1970). Essas placas foram mantidas em câmara de incubação a 28 °C, por 48 h, para crescimento.

As bactérias Fit 09, Fit 62 e *B. japonicum* foram repicadas para placas de Petri com meio de cultura 523 (KADO; HESKETT, 1970), sendo, com o auxílio de uma alça de Drigalski, feita uma estria contendo propágulos dos isolados bacterianos (separadamente) e outra estria com a bactéria *B. japonicum* em lados opostos na placa. Utilizaram-se quatro placas, com duas repetições, para cada bactéria. Essas placas foram mantidas em câmara escura sem ventilação por 24 h. Após esse período, foi avaliado o crescimento das bactérias antagonistas e de *B. japonicum*.

4.4. Ensaio de promoção de crescimento vegetal

Para este ensaio, as sementes dos cultivares M6210 IPRO e Brasmax Garra IPRO foram microbiolizados com suspensões das bactérias Fit 09 (Tratamento 3) e Fit 62 (Tratamento 4), e as concentrações foram ajustadas para $A_{540} = 0,50$ em espectrofotômetro FEMTO®, Modelo 432. As testemunhas foram microbiolizadas com o inoculante (Tratamento 2) e imersas em solução salina (0,85% de NaCl) (Tratamento 1).

As sementes tratadas foram plantadas em vasos com capacidade para cinco litros, previamente preenchidos com solo não esterilizado, coletado em canteiros da Horta Didática da UNIDERP, sendo realizados cinco orifícios por vaso, com 3 cm de profundidade, para a colocação das sementes. O solo foi adubado com fósforo e potássio, conforme recomendações de Ribeiro et al. (1999). Após o plantio, os vasos foram molhados diariamente e foi dado início às avaliações do Índice de Velocidade de Emergência (IVE), durante um período de sete dias. A velocidade de emergência compreendeu contagens diárias das plântulas emergidas por vaso até o sétimo dia após o plantio. Para realizar o cálculo do IVE, foi aplicada a equação indicada por Maguire (1962), em que $IVE = (E1/N1 + E2/N2 + ... + En/Nn)$, em que IVE = índice de velocidade de emergência; E1, E2 e En = número de plântulas emergidas determinado na primeira, na segunda e ... na última contagem; N1, N2 e Nn = número de dias da semeadura na primeira, na segunda e ... na última contagem.

Depois de concluídas as avaliações do IVE, foi efetuado o desbaste das plantas, deixando-se apenas duas por vaso. Após 35 dias do plantio, foi realizada a avaliação da massa de matéria fresca da parte aérea e do sistema radicular das plantas, em que se separou a parte aérea do sistema radicular, as quais foram pesadas. Posteriormente, cada parte foi colocada separadamente em sacos de papel acondicionados em estufa com circulação forçada de ar a 65 °C até peso constante. No final desse período, cada parte foi pesada em balança de precisão para determinação do peso da massa de matéria seca da parte aérea (MSPA) e radicular (MSR). O peso da massa de matéria seca total (MST) foi a soma do MSPA e MSR, sendo os resultados expressos em gramas.

O delineamento foi inteiramente casualizado com cinco repetições cada e os dados, submetidos ao teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4.5. Análise fitoquímica

As amostras de folhas e caules das plantas de cada tratamento do ensaio de promoção do crescimento vegetal foram coletadas 35 dias após o plantio, para realização também da análise fitoquímica. Após a pesagem da massa de matérias fresca e seca, as folhas e os caules foram triturados em liquidificador industrial e, em seguida, o material triturado foi utilizado para obtenção do extrato etanólico 14% (14 g por 100 mL de etanol 99,5%), que ficaram em repouso por 24 h. Posteriormente, as amostras foram filtradas, obtendo-se o extrato etanólico para realização da análise fitoquímica de acordo com a metodologia descrita por Matos (2009).

Os extratos foram avaliados por meio de sequência de reações qualitativas para compostos fenólicos (reação de precipitação com cloreto férrico), flavonoides (reação de cianidina e ácido sulfúrico) e taninos (reação com sais de ferro, precipitação de proteínas); teste de acidulação e alcalinização para detecção de antocianinas e catequinas; teste de fluorescência sob luz UV para cumarinas, triterpenos e esteroides (reação de Liebermann-Burchard) e glicosídeos cardiotônicos (teste de Baljet e de Kedde); e teste de espuma para os açúcares redutores (reação de Benedict) (MATOS, 2009).

As avaliações foram realizadas visualmente seguindo protocolo com três repetições, sendo os resultados confrontados com a testemunha (em branco) e também entre si, para observação de alguma possível modificação da cor e precipitação com os extratos etanólicos originais. A existência da classe à qual pertence o metabólito secundário foi marcada como positiva (+) e a inexistência de cor e, ou, precipitação, como negativa (-). As intensidades de cor foram denominadas como negativas (- = 0%), parciais (+- = 10%), baixas (+ = 25%), moderadamente moderadas (++ = 50%), moderadas (+++ = 75%) e altas (++++ = 100%) (FONTOURA et al., 2015).

4.6. Quantificação dos compostos fenólicos e flavonoides

Para quantificar os fenóis totais (FT), os extratos etanólicos brutos foram analisados pelo método Folin-Ciocalteu, com ácido gálico (10 a 350 mg mg mL⁻¹) como padrão, utilizando-se a curva de calibração $y = 0,781 x - 0,0031$; e $R^2 = 0,9959$ (SOUSA et al., 2007). Os flavonoides (F) foram analisados pela técnica do cloreto de

alumínio, adotando-se como padrão a quercetina ($y = 0,132 x + 0,0353$ $R^2 = 0,9949$) (PEIXOTO SOBRINHO et al., 2008). Na leitura de compostos fenólicos e flavonoides, foi utilizado o espectrofotômetro FEMTO[®], Modelo 432, em que as amostras foram mensuradas com comprimento de onda de 450 nm e 750 nm, respectivamente. Usaram-se cubetas de quartzo de caminho ótico de 1 cm (Hellma, Müllheim, Germany), com três repetições para cada tratamento.

Os dados de quantificação dos compostos fenólicos e flavonoides foram submetidos à análise de variância pelo teste F ($p < 0,05$) e as médias, comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), utilizando o programa SAS 9.3.

4.7. Ensaio com folhas destacadas

Sementes dos cultivares M6210 IPRO e Brasmax Garra IPRO foram semeadas em vasos com capacidade para cinco litros, previamente preenchidos com solo não esterilizado. O solo foi adubado com fontes de fósforo e potássio, conforme recomendações de Ribeiro et al. (1999). Foram plantadas cinco sementes por vaso, na profundidade de 3 cm, sendo os vasos mantidos em casa de vegetação. Para esse ensaio, foram realizados três tratamentos: sementes com suspensão da bactéria Fit 09 (Tratamento 2), sementes com suspensão da bactéria Fit 62 (Tratamento 3) e testemunha com solução salina (NaCl 0,85%) (Tratamento 1).

Após aproximadamente 28 dias, os trifólios compostos por folhas maduras e expandidas de plantas em estágio V3 (SCHWARTZ, 2004) de cada cultivar foram destacados, higienizados e levados ao laboratório, onde inicialmente foram preparadas bandejas plásticas contendo três folhas de papel-filtro umedecido. Colocaram-se sobre essas folhas cinco trifólios de cada cultivar de soja, os quais foram, a seguir, pulverizados com as suspensões das bactérias Fit 09 e Fit 62 (concentrações ajustadas para $A_{540} = 0,50$). As testemunhas foram pulverizadas somente com solução salina (0,85% de NaCl). Em seguida, adicionaram-se discos de micélio de *S. sclerotiorum* com 5 mm de diâmetro (cinco dias de crescimento micelial), no folíolo central e, na sequência, as bandejas foram cobertas com papel-filme e armazenadas em BOD, na temperatura de 22 °C, com fotoperíodo de 12 h. Após 48 h, foram realizadas avaliações do diâmetro da lesão com o auxílio de paquímetro digital. Essas avaliações foram feitas diariamente, por um período de sete dias.

Os ensaios foram montados em delineamento inteiramente casualizado com 10 repetições para cada uma das bactérias e para cada um dos cultivares, sendo os valores submetidos à análise de variância e as médias, comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4.8. Ensaio de biocontrole via microbiolização em casa de vegetação

Neste ensaio, foram utilizados como antagonistas as bactérias do ensaio com folhas destacadas, item 4.7. Para tanto, sementes dos cultivares M6210 IPRO e Brasmax Garra IPRO foram microbiolizadas com suspensões bacterianas, cujas concentrações foram previamente ajustadas para $A_{540} = 0,50$.

O tratamento das sementes foi realizado conforme recomendado para o inoculante. Os produtos foram depositados em sacos plásticos, seguindo-se a adição das sementes e agitação manual até a cobertura homogênea delas. Neste ensaio foram realizados seis tratamentos: Sementes microbiolizadas mais combinação do inoculante líquido da Fertibio soja com a suspensão da bactéria Fit 62 (Tratamento 6), Somente a suspensão da bactéria Fit 62 (Tratamento 5), Somente a suspensão da bactéria Fit 09 (Tratamento 4), Inoculante com a suspensão da bactéria Fit 09 (Tratamento 3), Inoculante (Tratamento 2) e Solução salina (NaCl 0,85%) (Tratamento 1).

Depois de tratadas, as sementes foram semeadas em vasos com capacidade para cinco litros, previamente preenchidos com solo não esterilizado. Após o plantio, os vasos foram irrigados diariamente e, após a emergência, realizou-se o desbaste das plantas, deixando apenas duas plantas por vaso.

A inoculação do fungo foi realizada quando as plantas alcançaram o estágio V4, as quais foram mantidas em casa de vegetação. Para a inoculação, foi feito um corte no pecíolo do quarto trifólio a 2,5 cm do quarto nó. Para colocar o inóculo e manter a alta umidade, foram utilizadas ponteiras descartáveis (1.000 μ L), cortadas de forma a retirar a parte em formato de cone. Cada ponteira cortada continha, em sua extremidade, um disco de micélio de *Sclerotinia sclerotiorum* com 120 h de cultivo. Essas ponteiras foram colocadas nos segmentos dos pecíolos restantes, de maneira que estivessem em contato o micélio do fungo e a planta. Dessa forma, foi preservado o pecíolo e mantida a umidade nesse local de contato (PETZOLDT; DICKSON, 1996). As avaliações da severidade da doença foram realizadas

empregando-se a escala de notas adaptada por Petzoldt e Dikson (1996): 1 = plantas sem sintomas; 2 = invasão do fungo além do sítio de inoculação; 3 = invasão do fungo próximo ao primeiro nó; 4 = invasão do fungo até o primeiro nó; 5 = invasão do fungo além do primeiro nó; 6 = invasão do fungo próximo ao segundo nó; 7 = invasão do fungo até o segundo nó; 8 = invasão do fungo além do segundo nó; e 9 = morte da planta.

Cada unidade experimental foi formada por um vaso com duas plantas e cinco repetições.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No ensaio de compatibilidade entre as bactérias antagonistas e *B. japonicum*, todos os isolados bacterianos testados apresentaram compatibilidade com esta bactéria. A não inibição do crescimento de *B. japonicum* pelos antagonistas mostra o potencial de combinação desses microrganismos. A combinação do inoculante recomendado para a cultura da soja com outras bactérias promotoras de crescimento é um procedimento conhecido como coinoculação (HUNGRIA et al., 2013). Estudos de Mazzuchelli et al. (2014) apontaram que a coinoculação com *B. subtilis* e *Bradyrhizobium* spp. promoveu 3,96% de incremento na nodulação, em comparação com a inoculação-padrão em plantas de soja. Combinações de antagonistas compatíveis entre si podem possibilitar a colonização do substrato e da rizosfera, de maneira mais eficaz. E isso proporciona melhor adaptação às mudanças climáticas, além dos diferentes mecanismos de ação, que podem favorecer a inibição de patógenos devido ao maior espectro de ação vinculado à promoção do crescimento vegetal (CAVAGLIERI et al., 2005).

Nos ensaios de avaliação da promoção de crescimento (Tabela 1) não foram observadas diferenças significativas entre os índices de velocidade de emergência. As porcentagens de germinação para o cultivar Brasmax Garra IPRO foram inferiores às da testemunha, porém iguais às do tratamento com o inoculante. Já para o cultivar M6210 IPRO os tratamentos com as bactérias antagonistas aumentaram significativamente a germinação, tanto em relação à testemunha quanto ao inoculante.

Tabela 1 – Índice de Velocidade de Emergência (IVE) e germinação (%) dos cultivares de soja M6210 IPRO e BRASMAX GARRA IPRO, oriundos de sementes microbiolizadas com as bactérias Fit 09 (*B. cereus*) e Fit 62 (*B. thuringiensis*), o inoculante Fertibio® soja e a solução salina (0,85% de NaCl) para a testemunha

Tratamentos	IVE	Germinação (%)
Brasmax Garra IPRO		
Testemunha	4,20a	92a
Inoculante	3,74a	76b
Fit 09	3,64a	84b
Fit 62	3,55a	80b
M6210 IPRO		
Testemunha	1,73a	68b
Inoculante	2,49a	68b
Fit 09	2,53a	84a
Fit 62	2,24a	80a

Médias seguidas pela mesma letra e mesma coluna não possuem diferença estatística pelo teste de Tukey a 0,05% de probabilidade.

Os isolados Fit 09 (*B. cereus*) e Fit 62 (*B. thuringiensis*) promoveram aumento no percentual de germinação das sementes do cultivar M6210 IPRO. Vieira e Castro (2001), analisando a ação de hormônios de *B. subtilis* na germinação de sementes de soja, perceberam que concentrações intermediárias causaram aumento na germinação. A bactéria *B. subtilis* produz fito-hormônios durante o desenvolvimento, os quais são capazes de estimular o crescimento radicular da soja (ARAÚJO et al., 2005). Da mesma forma, Araújo (2008), em ensaios com plantas de soja e algodão, notou que um formulado de *B. subtilis* com farinha de ostras levava a uma interação benéfica, melhorando a velocidade de germinação das sementes. Bassan et al. (2001), em ensaios de tratamento de sementes com inoculante e sem inoculante, observaram que as sementes tratadas com inoculante tiveram sua velocidade de emergência acelerada. Mazzuchelli et al. (2014) encontraram incremento na produção de soja de 30,72% em relação à testemunha, com a inoculação de *B. subtilis*.

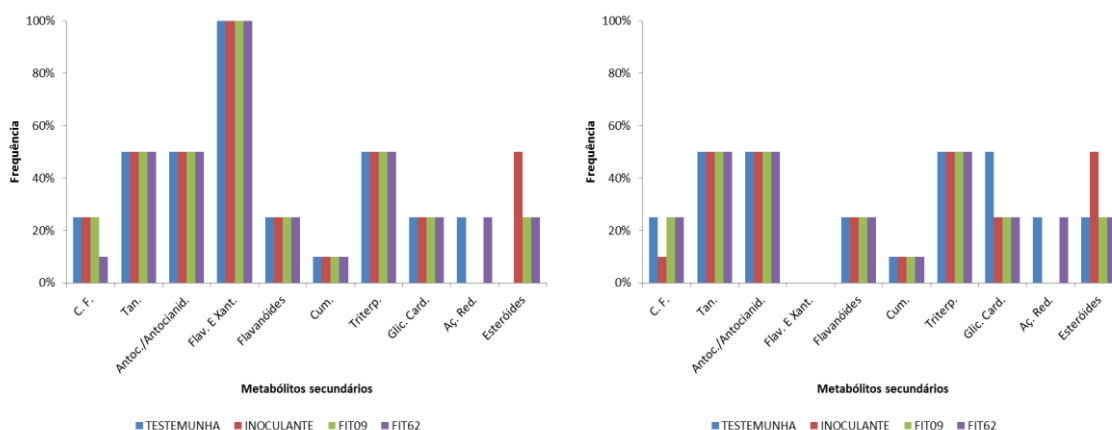
Os isolados de *B. cereus* (Fit 09) e *B. thuringiensis* (Fit 62) não atuaram como promotores de crescimento nos cultivares de soja testados (Tabela 2)

Tabela 2 – Promoção do crescimento de plantas de soja dos cultivares M6210 IPRO e Brasmax Garra IPRO, avaliando as variáveis: número de folhas (NF), massa de matéria fresca das folhas (MFF), massa de matéria fresca da raiz (MFR), massa de matéria fresca do caule (MFC), massa de matéria fresca total (MFT), massa de matéria seca das folhas (MSF), massa de matéria seca da raiz (MSR), massa de matéria seca do caule (MSC) e massa de matéria seca total (MST), oriundos de sementes microbiolizadas com as bactérias Fit 09 (*B. cereus*) e Fit 62 (*B. thuringiensis*)

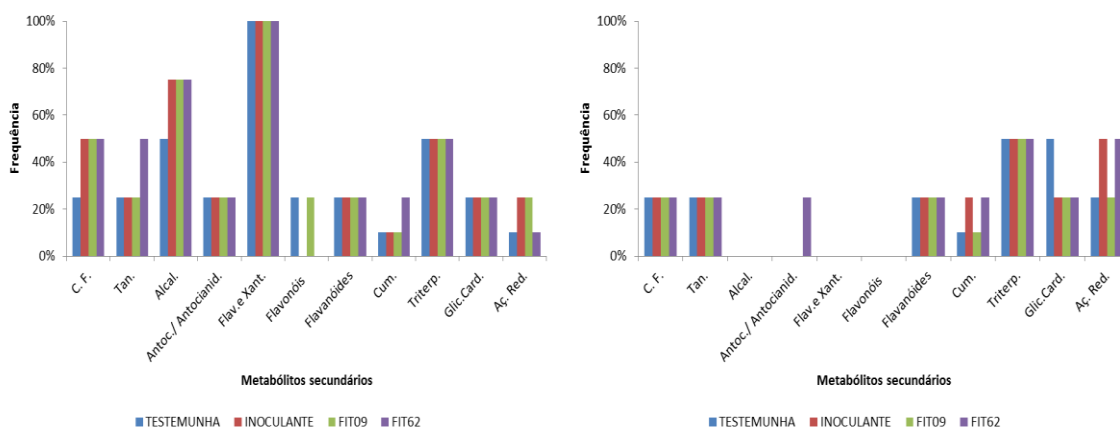
Tratamentos	Cultivares								
	Brasmax Garra IPRO								
	NF	MFF	MFR	MFC	MFT	MSF	MSR	MSC	MST
Testemunha	73,00	12,96	9,48	17,60	40,05	5,01	4,47	4,68	14,16
Inoculante	70,40	12,50	9,20	18,24	39,94	5,02	4,61	4,83	14,40
Fit 09	68,60	14,59	10,35	15,67	40,62	4,74	3,63	4,14	12,51
Fit 62	64,00	12,77	10,15	18,73	41,65	4,40	3,56	4,06	12,02
M6210 IPRO									
Testemunha	67,20	11,20	7,60	17,60	36,40	3,83	2,67	3,58	10,09
Inoculante	69,80	11,20	7,20	17,20	35,40	4,40	2,54	3,77	10,71
Fit 09	69,00	13,40	12,20	22,00	47,60	4,50	4,02	4,10	12,62
Fit 62	66,60	10,00	9,20	17,20	36,40	4,35	3,09	3,57	11,01

Não houve diferenças estatísticas.

As bactérias Fit 09 e Fit 62 auxiliaram positivamente a produção dos metabólitos secundários analisados (Figuras 1-4). Nas folhas do cultivar Brasmax Garra IPRO, foram detectadas 11 classes de metabólitos (Figura 1) e, nos caules, 10 classes (Figura 3). Já nas folhas do cultivar M6210 IPRO foram detectadas oito classes de metabólitos (Figura 2) e nos caules, nove classes (Figura 4). Para folhas e caules ocorreu também diferença no número de classes dentro do mesmo cultivar. Os constituintes químicos comuns distribuídos nas folhas e nos caules dos dois cultivares foram compostos fenólicos, taninos, flavonoides, antocianinas, antocianidinas, cumarinas, triterpenos, glicosídeos cardiotônicos e açúcares redutores. Os alcaloides foram encontrados somente nas folhas do cultivar Brasmax Garra IPRO (Figura 1) e os esteroides, no caule dos dois cultivares (Figuras 3 e 4). Já as flavonas e xantonas foram encontradas somente no caule e nas folhas do cultivar Brasmax Garra IPRO, em todos os tratamentos (Figuras 1-3). Todavia, os resultados negativos não permitem afirmar a sua inexistência, pois o método utilizado pode não detectar constituintes nas escalas micro e ultramicro (BRUM et al., 2011).



Figuras 1 e 2 – Frequência (parcial +- = 10%, baixa + = 25%, mediantemente moderada ++ = 50%, moderado +++ = 75%, alta intensidade ++++ = 100% e negativa (-) = 0%) (FONTOURA et al., 2015) dos metabólitos secundários (CF. = compostos fenólicos, Tan. = taninos, Antoc./Antocianid. = antocianinas e antocianidinas, Flav. E Xant. = flavonas e xantonas, Cum. = cumarinas, Triterp. = triterpenos, Glic. Card. = glicosídeos cardiotônicos, Aç. Red. = açúcares redutores) encontrados nos caules do cultivar de soja Brasmax Garra IPRO (Figura 1) e nos caules do cultivar de soja M6210 IPRO (Figura 2) após 35 dias de plantio, cultivados em Campo Grande, Mato Grosso do Sul.



Figuras 3 e 4 – Frequência (parcial +- = 10%, baixa + = 25%, mediantemente moderada ++ = 50%, moderado +++ = 75%, alta intensidade ++++ = 100% e negativa (-) = 0%) (FONTOURA et al., 2015) dos metabólitos secundários (CF. = compostos fenólicos, Tan. = taninos, Alcal. = alcaloides, Antoc./Antocianid. = antocianinas e antocianidinas, Flav. e Xant. = flavonas e xantonas, Cum. = cumarinas, Triterp. = triterpenos, Glic. Card. = glicosídeos cardiotônicos, Aç. Red. = açúcares redutores) encontrados nas folhas do cultivar de soja Brasmax Garra IPRO (Figura 3) e nas folhas do cultivar de soja M6210 IPRO (Figura 4) após 35 dias de plantio, cultivados em Campo Grande, Mato Grosso do Sul.

A diversidade e frequência (%) de classes de metabólitos secundários entre folhas e caules e entre os cultivares estudados podem estar relacionadas a fatores abióticos e bióticos. Segundo Gobbo-Neto e Lopes (2007), fatores climáticos (luminosidade, temperatura, pluviosidade) e nutricionais não atuam isoladamente e exercem influência conjunta no metabolismo secundário de plantas. Os metabólitos secundários não exercem função evidente nas sequências de crescimento e desenvolvimento vegetal, mas agem no sistema de defesa das plantas contra patógenos, pois apresentam atividades biológicas relacionadas à ação antimicrobiana (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Os compostos cumarínicos estão presentes em plantas, principalmente nas folhas, frutas, raízes e talos (HOULT; PAYÁ, 1996). Neste estudo, as cumarinas foram detectadas em todos os tratamentos com a mesma frequência em folhas de ambos os cultivares (Figuras 1-4), mas diferindo na frequência nos caules. No cultivar Brasmax Garra IPRO, a maior frequência no caule foi no tratamento com o isolado Fit 62, e no cultivar M6210 IPRO o inoculante e o isolado Fit 62 destacaram-se pela frequência (Figuras 1 e 2). Em geral, a produção de cumarinas é influenciada pela sazonalidade, condições ambientais ou estresses provocados por interação com microrganismos, os quais podem afetar a sua ocorrência em diversas partes da planta, nas quais possuem a função de proteção do vegetal contra infecções de fungos e contra herbivoria (PEREIRA, 2002).

As duas classes de flavonoides consideradas como mais importantes são os flavonóis e as antocianidinas. Apenas nas folhas do cultivar M6210 IPRO, tanto com o inoculante quanto com o isolado Fit 62, houve influência positiva dessas substâncias (Figura 4). É comum o fato de alguns pigmentos como as antocianidinas e antocianinas atuarem como antioxidantes e possuírem a capacidade de proteger a planta contra a ação de patógenos (ZHANG et al., 2004).

Já os terpenos foram produzidos em maior quantidade nos caules, independentemente do cultivar e da bactéria antagonista (Figuras 1 e 2). Como *S. sclerotiorum* produz apotécios no solo e estes irão disseminar os esporos no ar, ao se relacionar com o processo de microbiolização e ativação de compostos relacionados ao sistema de defesa, com a maior concentração de terpenos no caule, imagina-se que haverá maior proteção contra o ataque do fungo. Segundo Sartori (2005), esses compostos são ativos contra vários microrganismos. Seu modo de ação envolve a ruptura da membrana celular por compostos lipofílicos e, quando ocorre o

rompimento da membrana, esses constituintes atuam nos aminoácidos do fungo, causando sua inibição.

Os açúcares redutores foram evidenciados, em mesma frequência, apenas nos caules dos dois cultivares das testemunhas e com a inoculação do isolado Fit 62 (Figuras 1 e 2). Já nas folhas ocorreram diferenças de frequência nos dois cultivares, porém maior frequência pôde ser observada no cultivar M6210 IPRO com o inoculante e com o isolado Fit 62 (Figura 4). Esses resultados indicam que o inoculante e o isolado Fit 62 desencadearam o aumento da atividade metabólica das folhas, pois nestas, quando maduras, ocorre maior translocação dos açúcares, elevando, conseqüentemente, sua respiração (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Nas folhas dos dois cultivares de soja foram encontradas as mesmas frequências de glicosídeos cardiotônicos independentes do tratamento (Figuras 3 e 4). O mesmo ocorreu nos caules, exceto no cultivar testemunha M6210 IPRO, que apresentou maior frequência dos glicosídeos cardiotônicos (Figuras 1 e 2).

Os taninos foram influenciados positivamente pela aplicação do isolado Fit 62, apenas nas folhas do cultivar Brasmax Garra IPRO, comparado com os caules e com as folhas do cultivar M6210 IPRO (Figuras 1-4).

Os compostos fenólicos e os taninos são os encarregados de proporcionar a resistência de tecidos vegetais jovens ao ataque de patógenos e, dessa maneira, são inibidores de várias enzimas hidrolíticas, que são produzidas por patógenos, durante a patogênese (AGRIOS, 2005). Santos (2004) relatou que as plantas que dispõem de grande quantidade de metabólitos secundários possuem maior índice de sobrevivência, pois, conseqüentemente, são plantas com maior resistência a problemas ocasionados por fatores bióticos e, ou, abióticos.

A quantificação dos compostos fenólicos e flavonoides (Tabela 3) evidencia que nas folhas de soja do cultivar Brasmax Garra IPRO, cujas sementes foram microbiolizadas com o isolado Fit 62 (*B. thuringiensis*) e com o inoculante, foram detectadas maiores concentrações de compostos fenólicos, enquanto no cultivar de soja M6210 IPRO as plantas tratadas com o inoculante apresentaram menores teores de compostos fenólicos, seguidos das plantas que tiveram sementes microbiolizadas com o antagonista Fit 09 (*B. cereus*). O tratamento com o isolado Fit 09 foi superior aos demais tratamentos quanto aos teores de flavonoides nas folhas desses dois cultivares. Os caules não seguiram o mesmo perfil, e o cultivar Brasmax Garra IPRO, tratado com o isolado Fit 62, apresentou resultado superior, tanto para os

teores de compostos fenólicos quanto para os flavonoides. Para o cultivar M6210 IPRO, os flavonoides apresentaram maiores concentrações quando tratados com o isolado Fit 62 (*B. thuringiensis*), seguidos do inoculante, enquanto para os compostos fenólicos o inoculante foi superior, seguido da bactéria antagonista Fit 09 (*B. cereus*). Na Tabela 3, os resultados expressaram diferenças significativas nos conteúdos de compostos fenólicos e flavonoides totais em folhas e caules dos cultivares Brasmax Garra IPRO e M6210 IPRO.

Tabela 3 – Quantificação dos compostos fenólicos e flavonoides presentes em caules e folhas de soja dos cultivares Brasmax Garra IPRO e M6210 IPRO, oriundos de sementes microbiolizadas com as bactérias Fit 09 (*B. cereus*) e Fit 62 (*B. thuringiensis*), com inoculante e sem inoculante (testemunha)

Tratamentos	Cultivares			
	Folhas		Caule	
	Comp. Fenólicos	Flavonoides	Comp. fenólicos	flavonoides
Brasmax Garra IPRO				
Testemunha	95,05b	29,35d	15,64d	7,92c
Inoculante	90,36c	30,00c	21,89c	7,92c
Fit 09	85,93d	37,42a	25,01b	8,58b
Fit 62	117,96a	31,64b	28,26a	10,03a
M6210 IPRO				
Testemunha	57,04d	26,01c	24,75d	12,50c
Inoculante	139,56a	31,61b	39,86a	13,66b
Fit 09	121,86b	32,96a	28,92b	8,11d
Fit 62	94,79c	10,29d	25,80c	14,59a

Médias seguidas pela mesma letra e mesma coluna não possuem diferença estatística pelo teste de Tukey a 0,05% de probabilidade.

Os compostos fenólicos apresentam como mecanismo de ação no sistema de defesa a inibição do crescimento de fungos, pois inutilizam sistemas enzimáticos que fazem parte da produção de energia e síntese dos constituintes estruturais dos microrganismos (PORTE; GODOY, 2001). Os flavonoides podem atuar como elicitores e também como mecanismos químicos que conferem proteção às plantas contra os fitopatógenos (ZUANAZZI; MONTANHA, 2004). Cushnie e Lamb (2005) afirmaram que os flavonoides induzem alterações metabólicas nos patógenos, impedindo a síntese de ácido nucleico, a atividade da membrana citoplasmática e o

metabolismo. A biossíntese e o acúmulo de flavonoides estão interligados a diversas funções nas plantas, como proteção contra a incidência de raios ultravioleta, insetos, fungos, vírus e bactérias e, também, como mecanismo de defesa contra estresses ambientais (SIMÕES et al., 2010).

Quando avaliado o potencial de controle do mofo-branco, via pulverização dessas bactérias (Tabela 4), observou-se que o isolado Fit 09 (*B. cereus*) proporcionou controle superior a 70% em ambos os cultivares testados. Wu et al. (2014) demonstraram a eficiência de *Bacillus* sp., o qual reduziu em 80% a ocorrência de mofo-branco em folhas destacadas de canola, via pulverização. Zhang e Xue (2010), também em ensaios com folhas destacadas de soja pulverizadas com *Bacillus subtilis*, constataram 90% de redução da severidade de sintomas causados por *S. sclerotiorum*. Já Remuska e Dalla Pria (2007) relataram que a bactéria *B. thuringiensis*, além de diminuir o desenvolvimento de *S. sclerotiorum* em 37,44%, afetou a capacidade do fungo em produzir escleródios. Segundo Nielsen e Sorensen (1997), em torno de 20 a 40% das espécies de *Bacillus* isoladas do solo possuem alguma forma de antagonismo contra fungos patogênicos. O antagonismo direto realizado contra fitopatógenos abrange os mecanismos de antibiose, como a síntese de substâncias antimicrobianas, a competição por espaço e por nutrientes e a síntese de compostos voláteis (LEELASUPHAKUL et al., 2008). Da mesma forma, Leelasuphakul et al. (2008) relataram que bactérias do gênero *Bacillus* são capazes de causar a lise de esporos e produzir compostos voláteis tóxicos a diferentes fitopatógenos, o que pode acabar contribuindo para a diminuição da severidade de doenças em plantas.

No ambiente de casa de vegetação, a doença não se manifestou, e várias possibilidades podem ser aventadas para o ocorrido. Embora o patógeno possa infectar a planta em qualquer estágio, a fase mais suscetível ocorre na floração. As plantas foram inoculadas no estágio vegetativo (V4), fase em que a incidência da doença é geralmente menor. Também, a temperatura muito elevada, em torno de 35 °C, no momento da inoculação, associada ainda à umidade relativa do ar muito baixa, pode ter contribuído para que a doença não se manifestasse.

Tabela 4 – Diâmetro das lesões (DM) provocadas por *Sclerotinia sclerotiorum* e porcentagem de biocontrole em relação à testemunha em bioensaio utilizando folhas destacadas em dois cultivares de soja (*Glycine max*), pulverizados com solução salina (0,85% de NaCl) e com as suspensões das bactérias Fit 09 (*B. cereus*) e Fit 62 (*B. thuringiensis*)

Tratamentos	Cultivares	
	DM (mm)	Controle (%)
Brasmax Garra IPRO		
Testemunha	4,530a	-
Fit 09	0,520b	88,5
Fit 62	2,617a	42,2
M6210 IPRO		
Testemunha	3,622a	-
Fit 09	1,022b	71,8
Fit 62	1,812a	50,0

Médias seguidas pela mesma letra e mesma coluna não possuem diferença estatística pelo teste de Tukey a 0,05% de probabilidade.

6. CONCLUSÃO

Os dois isolados de bactérias antagonistas estudados, Fit 09 (*B. cereus*) e Fit 62 (*B. thuringiensis*), apresentaram compatibilidade com *B. japonicum*, os quais auxiliaram positivamente na produção de classes de metabólitos secundários relacionados ao sistema de defesa em plantas de soja.

A bactéria Fit 09 (*B. cereus*) reduziu o diâmetro das lesões necróticas causadas por *S. sclerotiorum* em ambos os cultivares de soja avaliados, Brasmax Garra IPRO e M6210 IPRO, em teste de folhas destacadas.

7. REFERÊNCIAS

AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5. ed. San Diego: Academic Press, 2004. 922 p.

AGRIOS, G. N. How plants defend themselves against pathogens. In: AGRIOS, G. N. (Ed.). **Plant pathology**. 5. ed. California: Academic Press, 2005. p. 93-114.

ALMEIDA, A. M. R. et al. Doenças da soja. In: KIMATI, H. et al. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, 663 p.

ANTOUN, H.; KLOEPPER, J. W. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). In: BRENNER, S.; MILLER, J. H. (Ed.). **Encyclopedia of genetics**. New York: Academic, 2001. p. 1477-1480.

APROSOJA BRASIL. **A história da soja**. 2014. Disponível em: <<http://aprosojabrasil.com.br/2014/sobre-a-soja/a-historia-da-soja>>. Acesso em: 22 jan. 2017.

ARAÚJO, F. F. Inoculação de sementes com *Bacillus subtilis*, formulado com farinha de ostras e desenvolvimento de milho, soja e algodão. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, p. 456- 462, 2008.

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

BARBOSA, R. N. T. **Seleção de rizobactérias visando o controle biológico da murcha-de-esclerócio em tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.)**. 2009. 44 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2009.

BARKA, E. A.; BELARBI, A.; HACHET, C.; NOWAK, J.; AUDRAN, J. C. Enhancement of in vitro growth and resistance to gray mould of *Vitis vinifera* co-cultures with plant growth-promoting rhizobacteria. **FEMS Microbiol Lett**, p. 91-95, 2000.

BASSAN, D. A. Z.; ARF, O.; BUZETTI, S.; CARVALHO, M. A. C.; SANTOS, N. C. B.; SÁ, M. E. Inoculação de sementes e aplicação de nitrogênio e molibdênio na cultura do feijão de inverno: produção e qualidade fisiológica de sementes. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 23, p. 76-83, 2001.

BETTIOL, W. Componentes do controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W. (Org.). **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna, SP: Embrapa-Cnpda, 1991. 338 p.

BETTIOL, W.; GHINI, R.; MARIANO, R. R. L.; MICHEREFF, S. J.; MATTOS, L. P. V.; ALVARADO, I. C. M.; PINTO, Z. V. Supressividade de fitopatógenos habitantes do solo. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Ed.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente, 2009. p. 187-208.

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. 11, p. 1-16, 2006.

BRUM, T. F.; ZADRA, M.; FROEDER, A. L. F.; BOLIGON, A. A.; FROHLICH, J. K.; ATHAYDE, M. L. Análise fitoquímica preliminar das folhas de *Vitex megapota mica* (Sprengel) Moldenke. **Ahead of Print**, Santa Maria, RS, v. 37, p. 57-62, 2011.

CAMARGO, L. E. A.; BERGAMIN FILHO, A. Controle genético. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. p. 729-758.

CANTERI, M. G.; SUMIDA, C. H. **Aumenta incidência de mofo branco na soja**. 2017. Disponível em: <<http://www.revistacampoenegocios.com.br/aumenta-incidencia-de-mofo-branco-na-soja>>. Acesso em: 11 jan. 2017.

CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. de; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Ed.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Editora da UFRGS/UFSC; Florianópolis, 2004. p. 519-535.

CASTRO, V. L. S. S.; MELO, I. S. Avaliação toxicopatológica em ratos expostos à *Pseudomonas putida*. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, São Paulo, v. 2, p. 1-5, 2007.

CAVAGLIERI, L.; ORLANDO, J.; ETCHEVERRY, M. *In vitro* influence of bacterial mixtures on *Fusarium verticilloides* growth and fumonisin B production; effect of seeds treatment on maize root colonization. **Letters In Applied Microbiology**, Oxford, v. 41, p. 390-396, 2005.

CHAVES, G. M. Estudos sobre *Sclerotinia sclerotium* (Lib) de Bary. **Experientiae**, v. 4, p. 69-133, 1964.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Levantamentos de safra, décimo segundo levantamento, setembro 2016**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_09_09_15_18_32_boletim_12_setembro.pdf>. Acesso em: 25 jan. 2017.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Levantamentos de safra, quinto levantamento da safra 2016/2017, fevereiro 2017**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/imprensa-noticia.php?id=43011>>. Acesso em: 12 fev. 2017.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Levantamentos de safra, quarto levantamento da safra 2015/2016, janeiro 2016**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_01_12_09_00_46_boletim_graos_janeiro_2016.pdf>. Acesso em: 12 fev. 2017.

CUSHNIE, T. T.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 26, p. 343-356, 2005.

DANIELSON, G. A.; NELSON, B. D.; HELMS, T. C. Effect of *Sclerotinia* stem rot on yield of soybean inoculated at different growth stages. **Plant Disease**, v. 88, p. 297-300, 2004.

EBEL, J. Phytoalexin synthesis: the biochemical analysis of the induction process. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 24, p. 235-264, 1986.

EMBRAPA – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Rizobactérias como agentes de controle biológico e promotores de crescimento de plantas**. 2013. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/125981/1/doc-155-rizobacterias.pdf>>. Acesso em: 25 jan. 2017.

EMBRAPA – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Tecnologias de produção de soja, região central do Brasil**. 2003. Disponível em: <<https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Soja/SojaCentralBrasil2003/importancia.htm>>. Acesso em: 23 jan. 2017.

EMBRAPA – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Tecnologias de produção de soja – Região central do Brasil**. Londrina, PR: Embrapa Soja, 2013. 265 p.

FERRAZ, L. C. L.; BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L.; NASSER, L. C. B. Viabilidade de *Sclerotinia sclerotiorum* após a solarização do solo na presença de cobertura morta. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 17-26, 2003.

FONTOURA, F. M. et al. Seasonal effects and antifungal activity from bark chemical constituents of *Sterculia apetala* (Malvaceae) at Pantanal of Miranda, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 45, p. 283-292, 2015.

FRAVEL, D. R. Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases. **Annual Review of Phytopathology**, v. 26, p. 75-91, 1988.

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

FREITAS, S. S. Rizobactérias promotoras do crescimento de plantas. In: SILVEIRA, A. P. D.; FREITAS, S. S. **Microbiologia do solo e qualidade ambiental**. Campinas, SP: Instituto Agrônomo, 2007. p. 1-20.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, p. 374-381, 2007.

GOUVEA, A.; ZANOTTI, J.; LUCKMANN, D.; PIZZATTO, M.; MAZARO, S. M.; POSSENTI, J. C. Efeito de extratos vegetais em soja sob condições de laboratório e campo. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 6, p. 70-78, 2011.

GOURLART, A. C. P. Tratamento de sementes de soja com fungicidas. In: ROSARIO, A. R. **Mercosoja**. Un Grano, Un Universo, 2011.

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

GUPTA, V. P.; BOCHOW, H.; DOLEJ, S.; FISCHER, I. **Plant growth-promoting *Bacillus subtilis* strain as potential inducer of systemic resistance in tomato against *Fusarium* wilt**, v. 107, p. 145-154, 2000.

HARBONE, J. B. **Introduction to ecological biochemistry**. 4. ed. London: Academic Press, 1988. 318 p.

HOULT, JR.; PAYA, M. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential. **Gen Pharmacol**, v. 27, p. 713-22, 1996.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. Coinoculação de soja e feijão com rizóbio e azospirilla: estratégias para melhorar a sustentabilidade. **Revista Biologia e Fertilidade do Solo**, v. 49, p. 791-801, 2013.

KADO, C. I.; HESKETT, M. S. Seletive media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v. 60, p. 969-976, 1970.

KHODDAMI, A.; WILKES, M. A.; ROBERTS, T. H. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. **Molecules**, Basel, v. 18, p. 2328-2375, 2013.

KUMAR, A.; KUMAR, S.; DEVI, H.; PATIL, S.; PAYAL, C.; NEGI, S. Isolation, screening and characterization of bacteria from Rhizospheric soils for different plant growth promotion (PGP) activities: an in vitro study. **Recent Research in Science and Technology**, v. 4, p. 1-5, 2012.

KUPPER, K. C.; GIMENES-FERNANDES, N.; GOES, A. de. Controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 251-257, 2003.

LATHA, P.; ANAND, T.; PRAKASAM, V.; JONATHAN, E. I.; PARAMATHMA, M.; SAMIYAPPAN, R. Combining *Pseudomonas*, *Bacillus* and *Trichoderma* strains with organic amendments and micronutrient to enhance suppression of collar and root rot disease in physic nut. **Applied Soil Ecology**, v. 49, p. 215-223, 2011.

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.

LEITE, R. M. V. B. C. **Ocorrência de doenças causadas por *Sclerotinia sclerotiorum* em girassol e soja**. Londrina, PR: Embrapa Soja, 2005. p. 1-3.

LOBO JUNIOR, M. Perspectivas e recentes resultados do uso de microrganismos no controle de doenças do feijoeiro comum. In: ——. **Feijão: produção e sustentabilidade**. Piracicaba, SP, 2013. p. 97-108.

LOBO JUNIOR, M. **Mofo branco – *Sclerotinia sclerotiorum***. Boletim Técnico – Passarela da Soja. 2010. p. 12. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/880828/1/murillo.pdf>>. Acesso em: 14 jan. 2017.

MACENA, A. M. F. **Associação de diferentes métodos de controle de *Sclerotinia sclerotiorum* na cultura do feijoeiro**. 2009. 55 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, 2009.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v. 2, p. 176-177, 1962.

MAKETON, M.; APISITSANTIKUL, J.; SIRIRAWEEKUL, C. Greenhouse evaluation of *Bacillus subtilis* AP-01 and *Trichoderma harzianum* AP-001 in controlling tobacco diseases. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 296-300, 2008.

MANJULA, K.; PODILE, A. R. Increase in seedling emergence and dry weight of pigeon pea in the field with chitin-supplemented formulations of *Bacillus subtilis* AF 1. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 21, p. 1057-1062, 2005.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Soja, 2013**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/soja>>. Acesso em: 12 jan. 2017.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Mapeia principais pragas das lavouras brasileiras**. 2015. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2015/08/ministerio-da-agricultura-mapeia-principais-pragas-das-lavouras-brasileiras>>. Acesso em: 12 jan. 2017.

MATOS, F. J. A. **Introdução a fitoquímica experimental**. 2. ed. Fortaleza: UFC, 2000. 141 p.

MAZZUCHELLI, E. H. L.; MAZZUCHELLI, R. C. L.; ROMERO, E. F.; ROMERO, R. F.; ARAUJO, F. F. **Nodulação da soja em função da coinoculação de *Bradyrhizobium* spp. e *Bacillus subtilis***. Resumo do trabalho de conclusão do curso de Agronomia da Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE, 2014.

MORANDI, M. A. B.; BETTIOL, W. Controle biológico de doenças de plantas no Brasil. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Ed.). **Controle de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente, 2009. 341 p.

MORADI, H. et al. Suppression of chickpea (*Cicer arietinum* L.) *Fusarium* wilt by *Bacillus subtilis* and *Trichoderma harzianum*. **Plant Omics Journal**, v. 5, p. 68-74, 2012.

NIELSEN, P.; SORENSEN, J. Multi-target and medium-independent fungal antagonismo by hydrolytic enzymes in *Paenibacillus polymyxa* and *Bacillus pumilus* strains from barley rhizosphere. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 22, p. 183-192, 1997.

ONGENA, M.; JOURDAN, E.; ADAM, A.; PAQUOT, M.; BRANS, A.; JORIS, B.; ARPIGNY, J. L.; THONART, P. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. **Environmental Microbiology**, West Sussex, v. 9, p. 1084-1090, 2007.

PAULITZ, T. C. Biochemical and ecological aspects of competition in biological control. In: BAKER, R. R. (Ed.). **New directions in biological control: alternatives for suppressing agricultural pests and diseases**. New York: Liss, 1990. p. 713-724.

PEIXOTO SOBRINHO, T. J. S. et al. Validação de metodologia espectrofotométrica para quantificação dos flavonoides de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 44, p. 683-689, 2008.

PEREIRA, J. O. P. P.; FREITAS, B. M. Estudo da biologia floral e requerimentos de polinização do muricizeiro (*Byrsonima crassifolia* L.). **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 33, p. 5-12, 2002.

PETZOLDT, R.; DICKSON, M. Straw test for resistance to white mold in beans. **Annual Report of Bean Improvement Cooperative**, v. 39, p. 142-143, 1996.

PORTE, A.; GODOY, R. L. O. Alecrim (*Rosmarinus officinallis* L.): propriedades antimicrobianas e química do óleo essencial. **Revista Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos (CEPPA)**, Curitiba, v. 19, p. 193- 210, 2001.

REMUSKA, A. C.; DALLA PRIA, M. **Efeito de *Bacillus thuringiensis* e *Trichoderma* sp. no crescimento de fungos fitopatogênicos**. Ponta Grossa, PR: UEPG: Ciências Exatas e da Terra, Agrárias e Engenharias, 2007. v. 13, p. 31-36.

RESENDE, A. **Avaliação do hipoclorito de sódio na severidade da ferrugem asiática, do oídio e nas características químicas da soja**. 2009. 81 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

RIBEIRO, A. C.; GUIMARÃES, P. T.; ALVAREZ, V. H. **Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais – 5ª aproximação**. Visconde do Rio Branco, MG, 1999. p. 306-307.

ROMEIRO, R. S. **Controle biológico de enfermidades de plantas: fundamentos**. Viçosa, MG: Editora UFV, 2007. 269 p.

SANGIOGO, M.; BERMUDEZ, J. M. M.; RODRIGUEZ, D. P.; BARBOZA, L. F.; MOCELLIN, R. Avaliação da indução de resistência por bactérias promotoras do crescimento de plantas a *Sclerotinia sclerotiorum* em folhas de canola. In: **VII Reunião Brasileira de Indução de Resistência em Plantas a Patógenos**. 2014.

SANTOS, A. R.; BARROS, M. P.; SANTIN, S. M. O.; SARRAGIOTTO, M. H.; SOUZA, M. C.; EBERLIN, M. N.; MEURER, E. C. Constituintes polares das folhas de *Machaonia brasiliensis* (Rubiaceae). **Química Nova**, São Paulo, v. 27, p. 525-527, 2004.

SARTORI, M. R. K. **Atividade antimicrobiana de fração de compostos puros obtidos das flores da *Acmela brasiliensis* Spreng (*Wedelia paludosa*) (Asteraceae)**. 2005. 81 f. Dissertação (Mestrado Ciências Farmacêuticas) – Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, SC, 2005.

SCHWARTZ, H. F. Dry bean production and pest management. **Fort collins: regional publication of the Colorado State University**. 2004. p. 95.

SHAHAROONA, B.; NAVEED, M.; ARSHAD, M.; ZAHIR, Z. A. Fertilizer-dependent efficiency of *Pseudomonads* for improving growth, yield, and nutrient use efficiency of wheat (*Triticum aestivum* L.). **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, p. 147- 155, 2008.

SILVEIRA, E. B. Bactérias promotoras de crescimento de plantas e biocontrole de doenças. In: MICHEREFF, S. J.; BARROS, R. (Ed.). **Proteção de plantas na agricultura sustentável**. Recife: UFRPE, 2001. 368 p.

SIMÕES, M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2010. 1102 p.

SOBRINHO, C. A.; FERREIRA, P. T. O.; CAVALCANTI, L. S. Indutores abióticos. In: CAVALCANTI, L. S.; DI PIERO, R. M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S. F.; RESENDE, M. L. V.; ROMEIRO, R. S. (Ed.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba, SP: FEALQ, 2005. p. 51-80.

SOUSA, C. M. M. S. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, p. 351-355, 2007.

STADNIK, M. Indução de resistência a oídios. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 23., 2000, Campinas, SP, **Anais...** Campinas, SP, 2000. p. 176-181.

SUMIDA, C. H. **Controle químico e biológico do mofo branco**. 2012. 81 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, 2012.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

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

VENCATO, A. Z. et al. **Anuário Brasileiro da Soja 2010**. Santa Cruz do Sul, RS: Ed. Gazeta Santa Cruz, 2010. p. 144.

VIEIRA, E. L.; CASTRO, P. R. C. Efeito de bioestimulante na germinação de sementes, vigor das plântulas, crescimento radicular e produtividade de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, RS, v. 23, p. 222-228, 2001.

VICENT, J. M. **A manual for the practical study of root nodule bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific, 1970. 200 p. (ICB HandBook, 15).

WELLER, D. M.; THOMASHOW, L. S. Current challenges in introducing beneficial microorganisms into the rhizosphere. In: O’GARA, F.; DOWLING, D. N.; BOESTEN, B. (Ed.). **Molecular ecology of rhizosphere microorganisms**. Germany: VCH, 1994. p. 67-89.

WU, Y.; YUAN, J.; RAZA, W.; SHEN, Q.; HUANG, Q. Biocontrol traits and antagonistic potential of *Bacillus amyloliquefaciens* Strain NJZJSB3 against *Sclerotinia sclerotiorum*, a causal agent of canola stem rot. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 1327-1336, 2014.

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 from 2001 to 2003. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 89, p. 675-677, 2005.

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

ZHANG, Z.; KOU, X.; FUGAL, K.; MCLAUGHLIN, J. Comparison of HPLC methods for determination of anthocyanins and procyanindins in bilberry extracts. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 52, p. 688-691, 2004.

ZHOU, T. T.; LI, C. Y.; CHEN, D.; WU, K.; SHEN, Q. R.; SHEN, B. phlF mutant of *Pseudomonas fluorescens* J2 improved 2,4-DAPG biosynthesis and biocontrol efficacy against tomato bacterial wilt. **Biological Control**, v. 78, p. 1-8, 2014.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonoides. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Florianópolis: UFSC; Porto Alegre: UFRGS, 2004. p. 577-614.