



VICTOR HUGO TEIXEIRA BUTTRÓS

**BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO NO
CONTROLE BIOLÓGICO DA FERRUGEM ASIÁTICA DA
SOJA**

**LAVRAS - MG
2021**

VICTOR HUGO TEIXEIRA BUTTRÓS

**BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO NO CONTROLE BIOLÓGICO
DA FERRUGEM ASIÁTICA DA SOJA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

Profa. Dra. Joyce Doria Rodrigues
Orientadora

**LAVRAS - MG
2021**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Buttrós, Victor Hugo Teixeira.

Bactérias promotoras de crescimento no controle biológico da ferrugem asiática da soja / Victor Hugo Teixeira Buttrós. - 2021.
43 p. : il.

Orientador(a): Joyce Doria Rodrigues.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2021.

Bibliografia.

1. BPCP. 2. Biosurfactantes. 3. Bioestimulantes. I. Rodrigues, Joyce Doria. II. Título.

VICTOR HUGO TEIXEIRA BUTTRÓS

**BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO NO CONTROLE BIOLÓGICO
DA FERRUGEM ASIÁTICA DA SOJA**

**GROWTH-PROMOTING BACTERIA IN THE BIOLOGICAL CONTROL OF
ASIAN SOYBEAN RUST**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 15 de abril de 2021.

Dr. Vinícius de Abreu D'Ávila UEMG

Dr. Moacir Pasqual UFLA

Profa. Dra. Joyce Doria Rodrigues
Orientadora

**LAVRAS - MG
2021**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e aos Orixás por iluminarem meu caminho.

Ao meu pai, Wagner, por todo o apoio, amor e carinho.

Aos meus irmãos Ygor, Savilly, Luísa e Laís, por tornarem tudo na minha vida mais alegre.

Aos meus amigos... todos eles, por serem meu porto seguro, pois tenho certeza de que não estaria aqui sem eles.

Ao Pedro, por estar sempre ao meu lado e apoiando todas minhas decisões.

À Professora Joyce Dória, minha orientadora, por todo o incentivo e apoio.

Aos Professores Ênio Brandão e Aline Castro, que me ensinaram a gostar de ciência, e aos professores Maria Catarina Kasuya e Mauricio Dutra, pelo primeiro contato com a área a qual hoje me dedico.

A todos que contribuíram mesmo que sem perceber, para que eu chegasse até aqui.

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Muito obrigado!

RESUMO

Bactérias promotoras de crescimento já são utilizadas como ferramentas para uma produção agrícola sustentável no Brasil, embora de forma ainda tímida quando comparado a países da Europa. O mercado é dominado por inoculantes de bactérias fixadoras de nitrogênio, seguido por defensivos de origem microbiológica, o que não alcança todo o potencial dessa ferramenta no que diz respeito às questões mercadológicas e ambientais do setor agrícola mundial. O uso de microrganismos promotores de crescimento na agricultura satisfaz uma demanda crescente por produtos agrícolas de menor impacto ambiental e menor risco à saúde humana, quando comparado aos métodos tradicionais. A soja se destaca como uma das culturas de maior importância na economia do Brasil, sendo a ferrugem asiática da soja, causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*, a doença mais importante da cultura, com alto custo anual de controle e alta capacidade destrutiva devido à grande severidade e alta taxa de sobrevivência do inóculo em campo. Bactérias promotoras de crescimento apresentam como um de seus mecanismos de promoção indireta, a capacidade de exercer controle biológico das doenças, através da produção de compostos bioativos antifúngicos que impedem a germinação das estruturas reprodutivas do patógeno, prevenindo ou atrasando a infecção pelo patógeno, o que culmina na redução da severidade da doença.

Palavras-chave: BPCP. Biosurfactantes. *Phakopsora pachyrhizi*. *Glycine max*. Bioestimulantes.

ABSTRACT

Bacteria that promote plant growth are already used as tools for sustainable agricultural production in Brazil, although still in a timid way when compared to European countries. The market is dominated by inoculants of nitrogen-fixing bacteria, followed by pesticides of microbiological origin, which does not reach the full potential of this tool with regard to market and environmental issues in the world agricultural sector. The use of growth-promoting microorganisms in agriculture satisfies an increasing demand for agricultural products with less environmental impact and less risk to human health when compared to traditional methods. Soy stands out as one of the most important crops in the economy of Brazil, being Asian soybean rust, caused by the fungus *Phakopsora pachyrhizi*, the most important disease in the crop, with high annual cost of control and high destructive capacity due to great severity and high rate of inoculum survival in the field. Growth-promoting bacteria have as one of their indirect promotion mechanisms the ability to exercise biological control of diseases through the production of bioactive antifungal compounds that prevent the germination of the pathogen's reproductive structures, preventing or delaying infection by the pathogen, which culminates in reducing the severity of the disease.

key words: PGPB. Biosurfactants. *Phakopsora pachyrhizi*. Glycine max. Biostimulants.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1	A cultura da soja.....	12
2.2	A ferrugem asiática da soja	12
2.3	Bactérias promotoras de crescimento em plantas	13
2.3.1	Definição e principais gêneros	13
2.3.2	Mecanismos diretos	15
2.3.2.1	Fixação biológica de nitrogênio	15
2.3.2.2	Produção de sideróforos.....	16
2.3.2.3	Produção de hormônios.....	17
2.3.2.4	Solubilização de fosfato	17
2.3.3	Mecanismos indiretos	18
2.3.3.1	Controle de patógenos	18
2.3.3.1.1	Indução de resistência sistêmica.....	19
2.3.3.1.2	Antibiose e destruição de estruturas do patógeno	19
2.3.3.1.3	Competição direta por espaço e nutrientes	20
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1	Obtenção e cultivo dos microrganismos e biosurfactantes	21
3.2	Avaliação dos mecanismos de promoção de crescimento	22
3.2.1	Fixação biológica de nitrogênio	22
3.2.2	Produção de sideróforos.....	22
3.2.3	Produção de hormônios (auxina)	23
3.2.4	Solubilização de fosfato	24
3.2.5	Inibição da germinação de uredósporos de <i>Phakopsora pachyrhizi</i>	24
3.3.	Avaliação do controle da ferrugem asiática	26
3.3.1	Origem e manutenção do material vegetal.....	26
3.3.2	Tratamentos	26
3.3.3	Inoculação do patógeno.....	27
3.3.4	Avaliação da severidade da ferrugem da soja.....	28
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1	Avaliação dos mecanismos diretos de promoção de crescimento.....	29
4.2	Inibição da germinação de uredósporos de <i>Phakopsora pachyrhizi</i>	30

4.3	Avaliação do controle da ferrugem asiática	32
5	CONCLUSÃO	35
	REFERÊNCIAS	36

1 INTRODUÇÃO

Diversos microrganismos são conhecidos pela íntima associação com plantas, podendo exercer efeito benéfico, neutro, variável ou deletério (BAREA, 2015). Bactérias promotoras de crescimento em plantas (BPCP) estão entre os microrganismos capazes de exercer efeitos benéficos através de diversos mecanismos, que podem ser diretos: (1) Solubilização de fosfato no solo; (2) Fixação de nitrogênio; (3) Produção de sideróforos; (4) Produção de hormônios; (5) Produção de enzimas (ACC desaminase), ou indiretos: (1) Controle biológico de patógenos e pragas; (2) Alívio do estresse abiótico (BHARTI; BARNAWAL, 2019; LOBO; JUÁREZ TOMÁS; VIRUEL; FERRERO *et al.*, 2019).

A promoção de crescimento de plantas mediada por BPCP não pode ser atribuída à apenas um dos mecanismos descritos, pois os mesmos, podem ocorrer de forma simultânea ou sequencial, onde o incremento observado nas características agronômicas observadas se dá pela somatória dos efeitos de cada mecanismo presente. Diversos gêneros de bactérias como: *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Pantoea*, *Burkholderia*, *Rhizobium* e *Enterobacter* já foram atribuídos a um ou mais mecanismos de promoção de crescimento em plantas (AHMAD; AHMAD; HILGER; NADEEM *et al.*, 2018; ANDRADE; PEREIRA; SOUZA; GUIMARÃES *et al.*, 2019; BATISTA; LACAVA; FERRARI; TEIXEIRA-SILVA *et al.*, 2018; MARTÍNEZ-VIVEROS; JORQUERA; CROWLEY; GAJARDO *et al.*, 2010).

Com a crescente demanda por produtos agrícolas de menor impacto ambiental, o uso de BPCP, associado a outras ferramentas integradas de manejo de culturas, acompanha essa demanda, tornando promissor o uso das BPCP em culturas de alto valor econômico.

Diante do papel promissor do uso de BPCP em culturas de alto valor, se destaca a cultura da soja (*Glycine max* L.), que atualmente é um dos elementos mais fortes da economia do Brasil, que ocupa a posição de maior produtor do grão, com produção de 122,647 milhões de toneladas e uma área plantada de 36,950 milhões de hectares (EMBRAPA, 2020).

Dentre os principais fatores que limitam a exploração máxima do potencial produtivo da soja, as doenças, sejam elas causadas por vírus, bactérias, fungos ou nematoides, são responsáveis pela maior parte do dano econômico. A ferrugem asiática da soja, causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* Sydow é a principal doença da cultura, e o cultivo ininterrupto da soja em áreas irrigadas, ou não, associado à presença contínua de plantas hospedeiras, incluindo a soja na entressafra, fazem dessa doença uma ameaça contínua (YORINORI; PAIVA, 2002).

Os primeiros indícios da ocorrência da ferrugem se dão pelo aparecimento de pequenos pontos de coloração mais escura que o tecido sadio e aproximadamente 1 mm de diâmetro, vistos na face adaxial da folha (EMBRAPA, 2013). Após um período latente, sob tais pontos, são formadas as estruturas de reprodução assexuada, as urédias, que darão origem aos uredósporos inicialmente de coloração hialina, mas que se tornam amarronzados e se acumulam na abertura do poro para serem carregados pelo vento. Enquanto a esporulação progride, o tecido foliar ao redor das primeiras urédias adquire coloração castanho-claro nas chamadas lesões do tipo ‘tan’ (bronzado) devido ao seu aspecto amarronzado (BROMFIELD, 1984). A perda de área fotossintética devido ao rápido amarelecimento e/ou queda prematura de folhas, prejudica a plena formação dos grãos, afetando diretamente a produtividade. Desde os primeiros relatos, ao final da safra de 2001, epidemias da doença foram detectadas em diversas regiões do Brasil, com perdas que chegaram a 70% (COSTAMILAN; CARRÃO-PANIZZI; STRIEDER; BERTAGNOLLI, 2012). Nas últimas safras, apesar da incidência precoce, a ferrugem não evoluiu devido às condições ambientais desfavoráveis ao patógeno, porém, o controle da doença compromete até 20 % da receita anual das lavouras no Brasil, com custo anual aproximado de 2,8 bilhões de dólares (CONSÓRCIO-ANTIFERRUGEM, 2019).

O controle da ferrugem da soja ocorre por uma série de procedimentos adotados em conjunto, quando já se nota os sinais do patógeno na área. O controle químico é o método mais difundido, mas outras medidas para reduzir os prejuízos causados pela doença podem ser aliadas. Estas consistem na utilização de cultivares mais precoces, semeadas no início da época recomendada para cada região; evitar um período de semeadura muito prolongado; vistoria constante das lavouras e rotação de culturas com espécies não hospedeiras do patógeno (YORINORI; PAIVA, 2002). Há uma tendência crescente na procura por novos métodos de controle de doenças em plantas, seja buscando reduzir os danos ambientais causados pelos métodos tradicionais, ou buscando retardar o aparecimento de populações resistentes do patógeno causado pela utilização indiscriminada de defensivos sintéticos, ou ainda, pela preocupação acerca dos cultivos orgânicos, nos quais o Brasil vem se destacando. Produtos alternativos que sirvam como defensivos e causem menores danos ao ambiente, sejam estes sintéticos ou naturais vêm acompanhando essa tendência, o que inclui os diversos biofertilizantes, caldas, óleos essenciais e os agentes de biocontrole disponíveis atualmente no mercado (FERNANDES, 2000).

O controle de doenças em plantas utilizando agentes microbianos, como bactérias, já é amplamente utilizado, sendo considerado uma alternativa promissora aos defensivos tradicionais (ZOUARI; MASMOUDI; MEDHIOUB; TOUNSI *et al.*, 2020). O gênero *Bacillus*

é um dos gêneros mais comuns de bactérias gram-positivas capazes de utilizar diversas fontes de carbono para seu crescimento (PANDA; BISHT; DE MANDAL; SENTHIL KUMAR *et al.*, 2014; ZOUARI; MASMOUDI; MEDHIOUB; TOUNSI *et al.*, 2020) são aeróbicas estritas e formadoras de endósporos resistentes à alta temperatura, pressão e radiação, servindo como esporos de resistência das bactérias em ambientes e situações inóspitos (IZUMI; FUJIFURU; OKADA; TAKAI *et al.*, 2016). Algumas espécies de *Bacillus* são conhecidas por sua eficiência no controle de doenças em plantas, e compõem formulações comerciais de fungicidas de origem biológica, como o Serenade®, que contém *B. subtilis*, e Sonata®, com *B. pumilus*. Além destes, *B. thuringiensis*, *B. formosus* e *B. amyloliquefaciens* se destacam como espécies importantes devido à aplicabilidade dos seus efeitos antifúngicos e antibacterianos no controle biológico de doenças em plantas (ALBAYRAK, 2019; EDWARDS; SEDDON, 2001). Bactérias do gênero *Bacillus*, e grupos filogeneticamente próximos, são capazes de produzir complexas misturas de substâncias anfipáticas conhecidas como biosurfactantes, compostas por ácidos graxos apolares ligados a um radical polar na extremidade. Os biosurfactantes afetam a integridade das membranas plasmáticas de diferentes microrganismos, incluindo fungos, estando diretamente ligados à capacidade das bactérias em controlar diversas doenças, como mofo-cinza (*Botrytis cinerea*), antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*), pinta-preta (*Alternaria solani*) (AGROFIT, 2019b). O princípio de controle explorado em fungicidas de origem microbiológica como Serenade®, é a interação dos lipopeptídeos, enquanto moléculas anfipáticas, com a membrana celular das estruturas reprodutivas e de resistência do patógeno, ocasionando perda na conformação, funcionalidade além de rupturas. Além disso, a presença do antagonista estabelece competição direta com o patógeno, por espaço e nutrientes na superfície vegetal e na rizosfera (AGROFIT, 2019a).

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a competência de bactérias promotoras de crescimento pré-selecionadas em controlar a ferrugem asiática da soja, e confirmar a presença de mecanismos de promoção de crescimento diretos para cada um dos microrganismos avaliados.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A cultura da soja

A soja (*Glicine max* L.) é uma leguminosa (Fabaceae) originária da Ásia, mais especificamente na China e no Japão. É mundialmente utilizada na alimentação humana e animal devido a qualidade e o teor de suas proteínas e lipídeos, que correspondem por aproximadamente 40 e 20% respectivamente, se destacando entre os grãos como a cultura de maior potencial de produção de uma proteína de baixo custo (CLEMENTE; CAHOON, 2009; DUBEY; KUMAR; ABD-ALLAH; HASHEM *et al.*, 2019).

O Brasil ocupa a posição de maior produtor mundial do grão, com uma área plantada de 36,950 milhões de hectares e produção de 122,647 milhões de toneladas do grão, o que ainda não reflete a totalidade do potencial produtivo do setor no país, que é limitado por diversos fatores, incluindo a incidência de doenças. Devido a importância econômica da soja e ao potencial destrutivo da ferrugem, parcerias público-privadas como o Consórcio Antiferrugem foram criadas, buscando unir forças no combate à doença que vem causando prejuízo nas diversas regiões produtoras de soja no Brasil (CONSÓRCIO-ANTIFERRUGEM, 2019; EMBRAPA, 2020).

A soja como cultura, é suscetível a uma infinidade de doenças que podem afetar a produtividade no Brasil, tais como: vírus do mosaico, podridão radicular (*Rhizoctonia solani*), mancha-parda (*Septoria glycines*), crestamento foliar ou cercosporiose (*Cercospora kikuchii*) e oídio (*Microsphaera difusa*). Apesar de numerosas, as doenças variam na incidência e importância a depender da região de cultivo (GODOY, 2017; WRATHER; SHANNON; BALARDIN; CARREGAL *et al.*, 2010)

2.1 A ferrugem asiática da soja

A ferrugem asiática da soja, causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*, é uma das doenças mais importantes da cultura, sendo um problema grave na Ásia (centro de origem) durante décadas. Foi identificada também na África, em 1997, e, nas Américas, em 2001 (RUPE; SCONYERS, 2008). Foi relatada pela primeira vez no Brasil em 2001, onde desde então, a preocupação com as perdas causadas pela doença são constantes (GODOY; SEIXAS; SOARES; MARCELINO-GUIMARÃES *et al.*, 2016).

Os primeiros sintomas decorrentes da infecção por *P. pachyrhizi* se iniciam como pequenas pontuações marrom-avermelhadas na face abaxial das folhas. As lesões em si permanecem pequenas (2-5mm), mas seu número cresce à medida que a doença progride. Pústulas chamadas urédias se formam nessas lesões, de onde são expelidos os uredósporos, estrutura reprodutiva do fungo, de coloração levemente amarelada a hialina, e aspecto equinulado e ornamentado. À medida que mais pústulas vão se formando, a área afetada vai se tornando amarelada, resultando em perda de área fotossintética e em perdas de produtividade de 30% a 80%. A perda está diretamente relacionada a distribuição temporal da doença e o quão rápido ela progride, a depender de fatores climáticos como temperatura (10 a 27,5 °C, ótima entre 20 e 23 °C), umidade do ar e molhamento foliar (BROMFIELD, 1984; MELCHING; DOWLER; KOOGLE; ROYER, 1989; RUPE; SCONYERS, 2008)

No Brasil, no início dos anos 2000, o desconhecimento acerca da existência da doença e falta de fungicidas para controle foram os grandes responsáveis pelo alto volume de perdas de produtividade, que foi estimada em 4,6 milhões de toneladas do grão. Após a chegada da doença no Brasil, esforços foram concentrados para reunir e aplicar os conhecimentos e tecnologia disponíveis para o controle da doença. Graças aos esforços da iniciativa pública e privada, as perdas na produtividade em decorrência da doença minimizaram. Porém, a dependência de fungicidas para controle foi intensificada. Atualmente, o manejo da ferrugem asiática da soja custa em média 2,8 bilhões de dólares ao setor (CONSÓRCIO-ANTIFERRUGEM, 2019).

Além do controle químico, estratégias de manejo como vazio sanitário, que consiste na remoção total da cultura e de plantas hospedeiras alternativas do campo, por um período de 90 dias, visa reduzir a quantidade inicial do inóculo. Tais medidas podem ser prejudicadas principalmente pela fácil dispersão dos uredósporos pelo ar (GODOY; SEIXAS; SOARES; MARCELINO-GUIMARÃES *et al.*, 2016).

2.2 Bactérias promotoras de crescimento em plantas

2.2.1 Definição e principais gêneros

O solo, além de ser o substrato para crescimento das plantas e uma grande reserva de nutrientes para as mesmas, é também um ecossistema complexo repleto de microrganismos, nas quais as bactérias são o grupo mais abundante, com valores entre 10^8 – 10^9 células por grama de solo (SCHOENBORN; YATES; GRINTON; HUGENHOLTZ *et al.*, 2004).

Independentemente do número em que se encontram, bactérias podem afetar as plantas de três maneiras diferentes, podendo ser de forma benéfica, neutra ou deletéria. As que influenciam positivamente o crescimento das plantas são as denominadas bactérias promotoras de crescimento em plantas (BPCP), que podem ser de vida livre, associadas, endofíticas ou até mesmo formarem relações de simbiose com plantas. Independentemente do tipo de relação com a planta, as bactérias promotoras de crescimento influenciam o crescimento da planta através dos mesmos mecanismos, que podem ser diretos ou indiretos, e podem ocorrer de forma simultânea resultando num efeito cumulativo dos mecanismos que são traduzidos na promoção de crescimento mensurável, como: aquisição de nutrientes, acúmulo de biomassa, teor de pigmentos, atividade de enzimas ligadas à tolerância, à estresse e severidade de doenças (GLICK, 1995; 2012; SCHIRAWSKI; PERLIN, 2018)

Historicamente, as bactérias do gênero *Rhizobium* são as mais estudadas e comercializadas quando se fala em promoção de crescimento em plantas, porém, diversos outros gêneros têm se tornado importantes devido a presença de mais de um mecanismo simultaneamente, como por exemplo, bactérias dos gêneros: *Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Delfitia*, *Paenobacillus*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Serratia* e *Streptomyces* (BATISTA; LACAVAL; FERRARI; TEIXEIRA-SILVA *et al.*, 2018; GLICK, 2012; RAMAKRISHNA; YADAV; LI, 2019).

Embora as espécies conhecidas dotadas de mecanismos de promoção de crescimento sejam abundantes, seu uso como linha de frente no manejo de culturas ainda é tímido nas maiores potências agrícolas do mundo, incluindo no Brasil. Para que esse mercado se torne mais atrativo, diversos pontos devem ser muito bem esclarecidos: (1) Determinar os mecanismos mais importantes e de maior impacto na produtividade; (2) Obter uma consistência no que diz respeito à regulação dos microrganismos que podem ser utilizados, tendo em vista o ponto de vista ambiental; (3) Seleção das estirpes otimizadas para cada condição ambiental; (4) Desenvolvimento de tecnologias de formulação e aplicação, visando diminuir as perdas de viabilidade no armazenamento e na aplicação do princípio ativo (GLICK, 2012; LEE; LUR; LO; CHENG *et al.*, 2016; LOBO; JUÁREZ TOMÁS; VIRUEL; FERRERO *et al.*, 2019; RAMAKRISHNA; YADAV; LI, 2019; SOUZA; AMBROSINI; PASSAGLIA, 2015)

2.2.2 Mecanismos diretos

Diversas são as formas pelas quais os microrganismos podem afetar positivamente o metabolismo e crescimento vegetal, através de uma relação que varia desde a colonização da rizosfera até uma simbiose completa. Tais mecanismos podem ser classificados como diretos ou indiretos. Os mecanismos diretos são observados como efeito imediato dos microrganismos ou de seus metabólitos no metabolismo vegetal, através do fornecimento de compostos essenciais (OLANREWAJU; GLICK; BABALOLA, 2017).

2.2.2.1 Fixação biológica de nitrogênio

Um dos nutrientes mais limitantes para o crescimento vegetal e, conseqüentemente, para a produção agrícola, é o nitrogênio (WANG; LAW; PAK, 2010), que apesar de abundante a biosfera, encontra-se em sua maior parte na forma de N_2 , sua forma molecular e inerte, sendo necessário a incorporação do nitrogênio molecular em um composto orgânico através da fixação, que é essencial para o fluxo desse nutriente ao longo da cadeia trófica (SHABANAMOL; DIVYA; GEORGE; RISHAD *et al.*, 2018)

Uma das formas de incorporação desse elemento em moléculas orgânicas se dá pela ação da enzima nitrogenase, em uma reação sensível à presença de oxigênio e dependente de *input* energético (GABY; BUCKLEY, 2011). A Enzima nitrogenase pode ocorrer em 3 isoformas, a depender do metal presente no sítio ativo da enzima, sendo a composta por molibdênio (Mo), a mais comum delas, e responsável pela maior parcela da fixação biológica do nitrogênio (FBN), isoformas encontrada principalmente nas bactérias simbióticas. As nitrogenases compostas por vanádio no sitio ativo (V) e inteiramente por ferro (Fe) são mais comuns em microrganismos fixadores de vida livre e cianobactérias, correspondendo a uma menor parcela da FBN (CHRISTIANSEN; LÖSCHER, 2019)

A reação de redução do nitrogênio atmosférico é um processo complexo, que requer um elevado *input* energético para quebrar a ligação tripla da molécula que o compõe (POSTGATE, 1982). Em microrganismos fixadores, cada molécula de N_2 requer 16 moléculas de ATP para ser reduzida, sendo essa energia proveniente do substrato que o microrganismo se encontra, no caso de fixadores de vida livre não fotossintetizantes; do próprio metabolismo fotossintético no caso de autotróficos de vida livre; e da planta hospedeira no caso de simbióticas e associadas e simbióticas (FIGUEIREDO; MERGULHÃO; SOBRAL; LIRA JUNIOR *et al.*, 2013; NATIONAL-RESEARCH-COUNCIL, 1994).

Os microrganismos fixadores podem ser agrupados em: (1) Fixadores de vida livre; (2) Microrganismos fixadores associados e; (3) Microrganismos simbióticos. Os de vida livre são capazes de realizar a fixação sem qualquer interação com outros organismos, como por exemplo, bactérias dos gêneros *Azotobacter*, *Bacillus*, *Clostridium* e *Klebsiella* que obtêm energia a partir da oxidação de material orgânico disperso por outros microrganismos ou por decomposição (DAHAL; NANDAKAFLE; PERKINS; BRÖZEL, 2017). Bactérias do gênero *Azospirillum* podem formar associações não simbióticas com diversas espécies de interesse econômico como arroz e cana-de-açúcar, onde nesse caso, recebem compostos fotoassimilados pela planta na forma de exsudatos radiculares (FUKAMI; CERZINI; HUNGRIA, 2018). Muitos microrganismos como os dos gêneros *Anabaena*, *Frankia*, *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* formam relações simbióticas com a planta hospedeira em uma relação de mutualismo, onde a planta prove não só fonte de carbono para o metabolismo bacteriano, mas também aloja os microrganismos em estruturas especializadas protegidas da constante competição na rizosfera e da ação inibitória do oxigênio sobre a nitrogenase (MASSON-BOIVIN; SACHS, 2018)

Após a incorporação pela planta, o nitrogênio pode ser utilizado de diferentes formas, sendo: (1) Um dos principais componentes da clorofila, indispensável para a fotossíntese e, conseqüentemente, para a produtividade agrícola; (2) Principal componente de aminoácidos, indispensáveis à síntese proteica; (3) compõe moléculas como ATP e ácidos nucleicos, indispensáveis ao fluxo energético e manutenção estrutural, metabólica e reprodutiva da planta (MASSON-BOIVIN; SACHS, 2018)

Com a crescente demanda por uma agricultura de menor impacto ambiental e menos dependente de fontes não renováveis de energia, faz-se necessário a otimização de processos biológicos de incorporação do nitrogênio, diferentes da adição de amônia e nitrato provenientes do processo de Haber-Bosch (VANCE, 2001).

2.2.2.2 Produção de sideróforos

Derivado do termo grego que significa ‘carreador de ferro’, os sideróforos estão entre os compostos bacterianos com função bioativa que podem influenciar positivamente o crescimento vegetal. São provenientes do metabolismo secundário bacteriano e produzidos a partir da síntese de peptídeo-sintase não ribossômica (PSNR) e policetídeo-sintase (PCS) (NEILANDS, 1995). São quelantes orgânicos de baixo peso molecular (400 a 1000 Daltons) e elevada afinidade pelo substrato ($K_d 10^{-20}$ a 10^{-50}) que são produzidas e secretadas pelos microrganismos de solo em decorrência da baixa disponibilidade de ferro (Fe^{3+}) em solução.

Esses compostos atuam na parte externa da membrana plasmática do vegetal, se ligando a íons de ferro presentes na solução do solo, tornando-os disponíveis para o crescimento da planta (NEILANDS; LEONG, 1986).

Seu efeito como promotor de crescimento tem uma abordagem direta e indireta, uma vez que se dá, principalmente, pela prevenção da proliferação de patógenos (indireta) devido ao sequestro da maioria do ferro disponível, e também auxiliando o crescimento do vegetal, uma vez que as plantas são capazes de absorver o complexo ferro-sideróforo (direta) de origem bacteriana (KUMAR; THAKUR; DHINGRA; SINGH *et al.*, 2018)

Dentre os microrganismos promotores de crescimento em plantas capazes de produzir sideroforos, destacam-se as bactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Serratia*, *Streptomyces* e *Burkholderia* (RAJKUMAR; AE; PRASAD; FREITAS, 2010).

2.2.2.3 Produção de hormônios

Diretamente ligados à interação planta-solo-microrganismos, os hormônios vegetais produzidos por bactérias têm a capacidade de modular positivamente o crescimento e desenvolvimento das plantas. Diversos microrganismos, benéficos ou não, são capazes de produzir ácido indolacético ou outros compostos análogos de auxina por diversas vias biosintéticas (SPAEPEN; BOSSUYT; ENGELEN; MARCHAL *et al.*, 2013).

A produção de hormônios vegetais dá aos microrganismos a capacidade de controlar a frequência e intensidade dos eventos de alongamento, divisão e diferenciação celular. Sendo também indispensáveis na superação de estresses abióticos e bióticos. Desta forma, contribuindo para os níveis internos de hormônios, o microrganismo consegue moldar o crescimento vegetal em prol da sua própria sobrevivência, sendo a produção de auxina a mais abundante (NUMAN; BASHIR; KHAN; MUMTAZ *et al.*, 2018). Genericamente, espera-se maior crescimento radicular e, conseqüentemente, maior exploração do solo pelo sistema radicular à medida que ocorre aumento dos níveis de auxina (GLICK, 2012).

2.2.2.4 Solubilização de fosfato

Um dos elementos mais importantes para o crescimento e desenvolvimento vegetal é o fósforo, sendo um macronutriente primário essencial a todas as plantas. É indispensável em todos os processos metabólicos, uma vez que está relacionado à formação de enzimas e proteínas, fosfolipídios e ácidos nucleicos, além da própria molécula de ATP, que é sinônimo

de energia na célula. Também desempenha um papel regulador na formação e translocação de açúcares e amidos, promovendo maturidade e qualidade precoces, e tem importância fundamental no processo de amadurecimento e formação de sementes (WANG; DENG; XU; ZHU *et al.*, 2018)

Apesar dos níveis de fósforo nos solos serem elevados (400 a 1200 mg.kg⁻¹ de solo) o mesmo se encontra muitas vezes em formas insolúveis e indisponíveis para a utilização pelas plantas. Da mesma forma, mesmo fertilizantes inorgânicos altamente solúveis, podem sofrer imobilização assim que aplicados no solo (KHAN; LU; AYZ; ZHANG *et al.*, 2018)

A limitação da disponibilidade, aliado ao seu grau de importância no metabolismo vegetal, indica que a capacidade e eficiência na absorção e utilização do fósforo seja um fator limitante para o crescimento das plantas. Sendo assim, a solubilização e mineralização desse elemento por microrganismos é um mecanismo de elevada importância no estudo de promoção de crescimento. Geralmente, sua solubilização no solo ocorre a partir da reação desse fósforo indisponível com compostos orgânicos de origem microbiana como ácido glucônico e ácido cítrico, ambos produzidos por bactérias de solo dos gêneros *Bacillus*, *Pantoea*, *Enterobacter*, entre outras (FENG; LU; SHENG; WANG *et al.*, 2004; RICHARDSON, 2001; RODRÍGUEZ; FRAGA, 1999; RODRIGUEZ; GONZALEZ; GOIRE; BASHAN, 2004).

2.2.3 Mecanismos indiretos

Dentre os mecanismos descritos de promoção de crescimento, tem também, os mecanismos indiretos, que são resultado da reversão de fatores inibitórios ao crescimento como o estresse oxidativo, e a patogênese.

2.2.3.1 Controle de patógenos

Existem diversos mecanismos pelos quais microrganismos promotores de crescimento podem atuar no alívio da chamada pressão de patogênese, onde cada um deles pode apresentar um ou mais mecanismos, simultaneamente.

2.2.3.1.1 Indução de resistência sistêmica

Em alguns casos, a interação entre plantas e microrganismos promotores de crescimento pode desencadear uma resposta de resistência sistêmica induzida (RSI), que é fenotipicamente semelhante à resistência sistêmica adquirida (RSA), e que corresponde à ativação dos mecanismos de defesa da planta, em decorrência de um evento patogênico (JAIN; CHOUDHARY; SHARMA; AGGARWAL, 2018)

Plantas positivadas para RSI apresentam valores elevados de enzimas relacionadas a patogênese (ERP) e tendem a reagir mais rapidamente e mais agressivamente à presença de organismos patogênicos (JAIN; CHOUDHARY; SHARMA; AGGARWAL, 2018).

A resposta de RSI não é específica para cada patossistema, sendo mais generalista como mecanismo de controle, modulando a sinalização de etileno e jasmonatos dentro da planta, e estimulando a produção de ERP e, conseqüentemente, o mecanismo de defesa da planta, não sendo necessária interação entre o patógeno e o microrganismos promotores de crescimento (MHLONGO; PIATER; MADALA; LABUSCHAGNE *et al.*, 2018; TONELLI; MAGALLANES-NOGUERA; FABRA, 2017)

2.2.3.1.2 Antibiose e destruição de estruturas do patógeno

A fim de assegurar sua sobrevivência em ambientes hostis, com baixa disponibilidade de nutrientes e elevada competição com outros microrganismos, diversos compostos bioativos com características antibióticas podem vir a ser produzidos pelas bactérias do solo. A antibiose como ferramenta de sobrevivência por parte dos microrganismos, pode também ter impacto positivo no crescimento e desenvolvimento vegetal, quando tais compostos acabam por inibir o crescimento e proliferação de organismos patogênicos, principalmente fungos (VAN DER MEIJ; WORSLEY; HUTCHINGS; VAN WEZEL, 2017).

Existe uma preocupação inerente ao uso de compostos antibióticos, no que diz respeito ao aparecimento de populações resistentes ao patógeno, o que vem sendo contornado com uso de estirpes bacterianas capazes de produzir cianeto de hidrogênio, que apesar de sozinho, não ter muita atividade de controle biológico, apresenta efeito sinérgico com diversos antibióticos também de origem microbiana (CHEN; CUI; SU; PENUELAS *et al.*, 2019)

Alguns microrganismos, como bactérias do gênero *Bacillus* e grupos próximos, são capazes de produzir complexas misturas de substâncias anfipáticas conhecidas como biosurfactantes, compostas por ácidos graxos apolares ligados a um radical polar na

extremidade. Tais compostos anfipáticos podem ser empregados no controle biológico de patógenos devido à sua interação com os lipídeos da membrana plasmática, causando sua ruptura seguida de extravasamento do conteúdo celular e destruindo também estruturas de resistência e reprodução dos patógenos. Bactérias promotoras de crescimento em plantas também podem secretar compostos como enzimas proteolíticas, lipases, celulasas e quitinases que interferem na integridade da membrana e da parede celular de microrganismos patogênicos como *Botrytis cinerea*, *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora* spp., *Rhizoctonia solani* e *Pythium ultimum* (AGROFIT, 2019a; b; CZABAN; RASMUSSEN; LAURSEN; VIDKJÆR *et al.*, 2018; FRANKOWSKI; LORITO; SCALA; SCHMID *et al.*, 2001; SINGH; SHIN; PARK; CHUNG, 1999).

2.2.3.1.3 Competição direta por espaço e nutrientes

Embora seja dificilmente mensurável, a competição por espaço e nutrientes no solo e na superfície vegetal impõe grande barreira ao desenvolvimento de patógenos, uma vez que, quando em maior abundância, os microrganismos promotores de crescimento podem esgotar recursos necessários para a patogênese, impactando diretamente a incidência e severidade de algumas doenças (CZABAN; RASMUSSEN; LAURSEN; VIDKJÆR *et al.*, 2018; INNEREBNER; KNIEF; VORHOLT, 2011). A competição entre microrganismo benéfico e patogênico, já vem, inclusive, sendo enfatizada em produtos formulados à base de bactérias promotoras de crescimento com alvo em controle biológico como Serenade® e Sonata®(AGROFIT, 2019a; b).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no campus universitário da Universidade Federal de Lavras, Departamento de Agricultura, Laboratório de Cultivo de Microrganismos, Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais e casas de vegetação anexas e no Departamento de Biologia, setor de Microbiologia, Laboratório de Enzimas.

3.1 Obtenção e cultivo dos microrganismos e biosurfactantes

Os microrganismos (TABELA 1) foram fornecidos pela Coleção de Culturas de Microbiologia Agrícola (CCMA) da Universidade Federal de Lavras e pelo Laboratório de Biotecnologia e Biodiversidade para o Meio Ambiente da Universidade Federal de Viçosa, sendo:

Tabela 1 - Microrganismos pré-selecionados para avaliação do potencial de biocontrole

Código	Espécie
UFV-LPP155	<i>Bacillus subtilis</i>
CCMA-1347	<i>Bacillus subtilis</i>
CCMA-1233	<i>Bacillus licheniformis</i>
CCMA-0106	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

Fonte: Do autor (2021).

As bactérias foram pré-selecionadas com base na literatura disponível, atestando sua capacidade de produzir determinados compostos anfipáticos com potencial de utilização no controle de doenças em plantas, conhecidos como biosurfactantes.

Amostras de meio caldo nutriente contendo as bactérias supracitadas foram adicionadas em microtubos de 2 mL e acrescidos de solução de glicerol 40%(v/v) em proporção 1:1, alocadas em incubadora B.O.D a 30 °C por 24h e em seguida mantidas em freezer -20 °C para preservar a integridade do material.

Para a realização dos experimentos, meio de cultura caldo nutriente foi preparado e acondicionado em frascos de vidro de 810 mL com tampa adaptada para inserção de conexões metálicas de 8 mm para colocação de filtros de seringa 0,22 µm na cânula de entrada. A cânula de saída foi parcialmente bloqueada com algodão, permitindo saída da pressão. Após a inoculação, os frascos foram conectados a uma bomba de ar de capacidade para 30 L/minuto, dividida em 12 saídas de 2,5 L/minuto cada. Os frascos foram mantidos sob aeração constante a 27 °C ± 2 por 72h.

Para a separação das células bacterianas, o caldo fermentado foi centrifugado por 10 minutos a 5000 rpm, onde as mesmas foram suspensas em tampão fosfato-salino (PBS). Já para a separação dos biosurfactantes foi realizada uma precipitação ácida do sobrenadante previamente obtidos até valores de $\text{pH } 2,0 \pm 1$. Após decantado em geladeira, o excesso de meio de cultura foi retirado, o precipitado foi lavado com água destilada $\text{pH } 2,0$. Uma nova centrifugação seguida de descarte do sobrenadante foi realizada para a concentração dos biosurfactantes, que foram então, armazenados em freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para uso posterior (ALBAYRAK, 2019; SHAH; SIVAPRAGASAM; MONIRUZZAMAN; YUSUP, 2016).

3.2 Avaliação dos mecanismos de promoção de crescimento

Visando avaliar o potencial dos microrganismos para outros mecanismos de promoção de crescimento, testes específicos foram realizados para cada um deles nos microrganismos selecionados.

3.2.1 Fixação biológica de nitrogênio

Para avaliar a capacidade de fixação biológica de nitrogênio, as bactérias foram inoculadas em meio NFB em frascos de penicilina, que foram armazenados em incubadora do tipo B.O.D por 10 dias. Para confirmação do resultado positivo, observou-se a presença de um halo ou de uma membrana aerotóxica próximos à superfície do meio de cultura. Como controle positivo, foi utilizado a cepa Ab-V5 de *Azospirillum brasilense*, isolado clássico descrito em literatura para ensaios sobre fixação biológica de nitrogênio (DÖBEREINER, 1988).

3.2.2 Produção de sideróforos

Para avaliação dos microrganismos quanto à produção de sideróforos, foi realizado um teste qualitativo colorimétrico para detecção do íon ferro disperso em solução. Para realização do teste, primeiro foram preparadas 4 soluções: (1) 0,06g de cromo azulol S (CAS) em água destilada estéril (QSP 50 mL); (2) 0,0027 g de $\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ em solução de HCl a 10 mM (QSP 10 mL); (3) 0,073g de Brometo cetrimônio em água destilada estéril (QSP 50 mL); (4) solução de casaminoácido obtido a partir da dissolução de 3g de casaminoácido em 27 mL de água destilada acrescida de 3% de hidroxiquinolona em clorofórmio v/v, que foi filtrada em filtro de

membrana 0,22 μ m. As soluções 1, 2 e 3 foram então misturadas em um frasco e autoclavado a 121 °C durante 15 minutos.

Separadamente, foi preparado 100 mL do meio M9 5X que foi adicionado de 150 mL de água destilada e 32,24g de tampão PIPES. Logo em seguida, o pH foi ajustado para 6,8 e o meio foi autoclavado a 121 °C por 15 minutos. Após resfriar até temperaturas inferiores a 50 °C, adicionou-se 10 mL de solução de glicose 20%, 30 mL da solução de casaminoácido filtrada e 100 mL da solução corante (mistura das soluções 1,2 e 3). Verteu-se o meio em placas de petri, e após a inoculação das bactérias e encubação em B.O.D, considerou-se positivo para produção de sideróforos, as placas com presença de um halo amarelo ao redor da colônia (SCHWYN; NEILANDS, 1987)

3.2.3 Produção de hormônios (auxina)

Para detecção de ácido indolacético proveniente dos microrganismos, foi realizado um teste quantitativo que consistiu na inoculação dos microrganismos em meio caldo nutriente (CN) seguida de encubação em B.O.D a 28 °C durante 48h. Após crescimento bacteriano, a densidade óptica (OD₆₀₀) foi então ajustada para 0,5 ($10^7 - 10^8$ UFC mL⁻¹). Uma alíquota desta solução ajustada foi adicionada a um novo meio caldo nutriente suplementado com triptofano (100 μ g, numa proporção de 5% de solução ajustada e 95% caldo nutriente estéril, que foi seguida de nova encubação a 30 °C durante 72h no escuro. Após crescimento microbiano, uma centrifugação foi realizada a 12.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi recuperado.

A produção de auxina foi então medida a partir da combinação do sobrenadante obtido anteriormente e do reagente de Salkowski (1.875g FeCl₃.6H₂O, 100 mL de água destilada e 150 mL de solução de H₂SO₄ a 35%) em proporção 1:1. A solução foi encubada em B.O.D no escuro a 30 °C por 15 minutos e a absorbância de cada amostra foi medida no comprimento de onda 530 nm. A quantificação da auxina seguiu valores disponíveis na curva padrão elaborada para *Azospirillum brasilense* Ab-V5, que foi também controle positivo na ocasião (GORDON; WEBER, 1951; LOACES; FERRANDO L FAU - SCAVINO; SCAVINO, 2010; PEDRINHO; GALDIANO JÚNIOR; CAMPANHARO; ALVES *et al.*, 2010; SZILAGYI-ZECCHIN; IKEDA; HUNGRIA; ADAMOSKI *et al.*, 2014).

As análises estatísticas foram feitas com auxílio do software Sisvar (FERREIRA, 2011) para realizar a comparação das médias através do teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.2.4 Solubilização de fosfato

Para avaliar a competência dos microrganismos em teste quanto a solubilização de fosfatos, os mesmos foram inoculados em meio de cultura CN e encubados em B.O.D a 30 °C durante 48 horas. A densidade óptica foi então ajustada (OD_{600}) para 0,5 ($10^7 - 10^8$ UFC mL⁻¹) e a suspensão foi utilizada para inoculação em meio de cultura NBRIP (NAUTIYAL, 1999) vertido em placas de petri, onde 3 gotas de 10 µL da suspensão bacteriana foram depositadas em pontos equidistantes. A avaliação foi feita a cada 3 dias durante 12 dias, e o teste foi considerado positivo nas colônias circundadas por um halo translúcido característico. O diâmetro do halo e da colônia foi utilizado para cálculo do índice de solubilização (IS), expresso pela razão entre o diâmetro do halo (mm) e o diâmetro da colônia (mm) (AKINTOKUN; AKANDE; AKINTOKUN; POPOOLA *et al.*, 2007). O IS de cada bactéria pode ser classificado entre: (1) Baixo ($IS < 2,0$); (2) Médio ($2,0 < IS < 4,0$) e Alto ($IS > 4,0$), classificação diretamente ligada à maior ou menor capacidade e eficiência de solubilização (MARRA; SOARES; OLIVEIRA-LONGATTI; FERREIRA *et al.*, 2012).

As análises estatísticas foram feitas com auxílio do software Sisvar (FERREIRA, 2011) para realizar a comparação das médias através do teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.2.5 Inibição da germinação de uredósporos de *phakopsora pachyrhizi*

Com o objetivo de avaliar a capacidade dos microrganismos selecionados e/ou de seus metabólitos em inibir a germinação de uredósporos de *Phakopsora pachyrhizi*, foi então conduzido, sendo composto por 14 tratamentos, sendo:

Tabela 2 - Tratamentos envolvidos na avaliação da germinação de uredósporos de *P. pachyrhizi*

Código	Microrganismo	Composição
W1	Serenade (Controle Positivo)	Controle Positivo
W2	Controle (Água Destilada)	Água Destilada
T1	UFV LPP B155	Células Bacterianas
T2	UFV LPP B155	Filtrado
T3	UFV LPP B155	Células e Filtrado
T4	CCMA-1347	Células Bacterianas
T5	CCMA-1347	Células e Filtrado
T6	CCMA-1347	Filtrado
T7	CCMA-1233	Células Bacterianas
T8	CCMA-1234	Células e Filtrado
T9	CCMA-1235	Filtrado
T10	CCMA-0106	Células Bacterianas
T11	CCMA-0106	Células e Filtrado
T12	CCMA-0106	Filtrado

Fonte: Do autor (2021).

Os tratamentos contendo apenas células bacterianas, foram obtidos a partir da centrifugação de meio caldo nutriente fermentado como descrito no item 3.1, seguida de suspensão das células em tampão PBS até densidade óptica (OD_{562}) igual a 0,2 (HADDAD; SARAIVA; MIZUBUTI; ROMEIRO *et al.*, 2013).

Nos tratamentos compostos por caldo nutriente filtrado, o sobrenadante proveniente da centrifugação anterior foi passado por um filtro de membrana 0,22 μm , resultando em um filtrado transparente contendo apenas os compostos dissolvidos. Já nos tratamentos que correspondem às células e filtrado, as células foram suspensas no filtrado até densidade óptica (OD_{562}) igual a 0,2.

A suspensão de uredósporos recém-colhidos de *P. pachyrhizi* foi preparada em água destilada com sacarose (0,05 %) e a concentração foi ajustada para $3,5 \times 10^4$ uredósporos. mL^{-1} com auxílio de uma câmara de Neubauer.

Em placas do tipo ELISA com 96 poços, 125 μL da suspensão de uredósporos foram depositadas com auxílio de uma micropipeta e logo em seguida 125 μL da solução correspondente a cada tratamento foram também adicionados em esquema de quadruplicata (4 poços por tratamento).

Após 24 horas, cada tratamento foi observado em microscópio a fim de verificar a ocorrência ou ausência de germinação. Nos casos onde ocorreu germinação, a mesma foi classificada entre total (1,0) ou parcial (0,5), observando também a ausência ou presença (A/P)

de apressório ao fim do tubo germinativo. Foi considerado germinado o uredósforo cujo tubo germinativo apresentava, no mínimo, o dobro do comprimento do próprio uredósforo.

3.3 Avaliação do controle da ferrugem asiática

Para avaliação do controle da ferrugem asiática da soja, por parte dos microrganismos selecionados, foi conduzido um experimento em casa de vegetação simulando condições de temperatura e umidade ideais para a patogênese.

3.3.1 Origem e manutenção do material vegetal

As plantas foram obtidas a partir do plantio de 5 sementes em vasos de 1 L de capacidade contendo o substrato Tropstrato®. Após a semeadura, os vasos foram mantidos em casa de vegetação (25-28 °C) até a emergência das plântulas, quando foi feito o desbaste, deixando duas plântulas por vaso. Os tratamentos foram aplicados 40 dias após o plantio das sementes.

3.3.2 Tratamentos

Visando individualizar o efeito das células bacterianas, dos biosurfactantes de origem bacteriana e da combinação de ambos no controle da ferrugem asiática da soja, 14 tratamentos (TABELA 3) foram idealizados, sendo: 2 controles, um composto apenas por água destilada e outro feito a partir da aplicação de Serenade; 4 tratamentos contendo apenas as células bacterianas; 4 contendo apenas os biosurfactantes produzidos pelos isolados e 4 contendo a combinação de células e biosurfactantes.

Tabela 3 - Tratamentos envolvidos na avaliação da severidade da ferrugem asiática

Código	Microrganismo	Composição
W1	Serenade (Controle Positivo)	Controle Positivo
W2	Controle (Água Destilada)	Água Destilada
T1	UFV LPP B155	Células Bacterianas
T2	UFV LPP B155	Biosurfactantes
T3	UFV LPP B155	Células e Biosurfactantes
T4	CCMA-1347	Células Bacterianas
T5	CCMA-1347	Células e Biosurfactantes
T6	CCMA-1347	Biosurfactantes
T7	CCMA-1233	Células Bacterianas
T8	CCMA-1234	Células e Biosurfactantes
T9	CCMA-1235	Biosurfactantes
T10	CCMA-0106	Células Bacterianas
T11	CCMA-0106	Células e Biosurfactantes
T12	CCMA-0106	Biosurfactantes

Fonte: Do autor (2021).

Os tratamentos contendo apenas células bacterianas, foram obtidos a partir da centrifugação do caldo nutriente no qual foram cultivadas bactérias como descrito no item 3.1, seguido de suspensão das células em solução de sacarose (3g.L^{-1}) até a densidade óptica (OD_{600}) igual 1,0 ($10^8 - 10^9 \text{UFC.mL}^{-1}$). A adição de sacarose em todos os tratamentos visou a quebra da tensão superficial e promoção do espalhamento e aderência na aplicação, além da manutenção da viabilidade do inóculo.

Os tratamentos compostos apenas por biosurfactantes foram obtidos a partir da adição de solução concentrada de biosurfactantes obtido como descrito em 3.1 a uma solução de sacarose (3g.L^{-1}) na proporção de 10% (v/v). Os tratamentos compostos por células e biosurfactantes possuem simultaneamente a mesma concentração de células e proporção de biosurfactantes dos tratamentos isolados. O Tratamento contendo Serenade® foi conduzido seguindo as instruções de diluição da bula.

Foram feitas duas aplicações dos tratamentos, com cinco dias de intervalo entre as aplicações, realizadas com o auxílio de um borrifador de jardim até o ponto de escoamento do princípio ativo.

3.3.3 Inoculação do patógeno

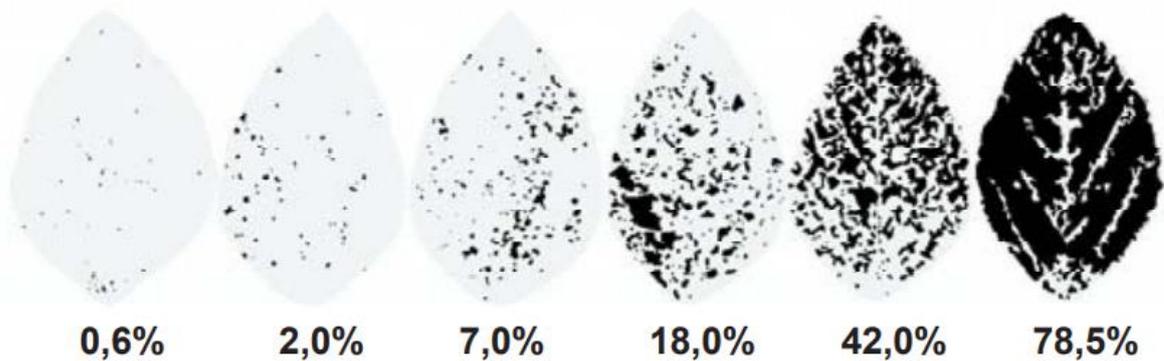
Dois dias após a segunda aplicação dos tratamentos, as plantas de soja seguiram para a inoculação do patógeno. Foi preparada uma suspensão com 2.9×10^4 uredósporos. mL^{-1} com o auxílio de uma câmara de Neubauer, utilizando água destilada e sacarose (0.05 %) como espalhante e adesivo.

A suspensão de uredósporos foi aspergida com o auxílio de um borrifador de jardim até o ponto de escorrimento, e após a aplicação, as plantas foram envoltas em sacos pretos para simular uma câmara úmida escura, onde permaneceram por 48 horas. Após esse período, as plantas foram descobertas e mantidas em casa de vegetação equipada com sistema de irrigação por aspersão.

3.3.4 Avaliação da severidade da ferrugem da soja

Como parâmetro para severidade da ferrugem da soja, foi utilizada a escala diagramática proposta por Godoy *et al.* (2006), com base na área foliar afetada.

Figura 1 - Escala diagramática proposta por Godoy *et al.* (2006) para a severidade da ferrugem asiática da soja.



Fonte: Do autor (2021).

Foram feitas 3 avaliações, sendo a primeira aos 14 dias após a inoculação do patógeno (DAI), seguida de uma aos 18 dias após a inoculação e finalizando com a última aos 21 dias após a inoculação. Todas as avaliações foram feitas sempre observando uma das folhas do primeiro par logo acima das folhas cotiledonares, em que uma delas foi aleatoriamente destacada da planta na primeira avaliação.

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software sisvar (FERREIRA, 2011), através do qual realizou-se o teste de Tukey a 5% de probabilidade para comparação das médias.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação dos mecanismos diretos de promoção de crescimento

Os resultados acerca dos mecanismos diretos de promoção de crescimento estão expressos na Tabela 4, para a fixação biológica de nitrogênio, foi considerado positivo os tratamentos onde houve formação de um filme na superfície do meio NFb. Para a solubilização de fosfato, foram expressos a partir da medida do diâmetro da colônia e do halo indicativo ao redor da colônia, sendo o índice de solubilidade (IS) obtido pela fórmula:

$$IS = \frac{\text{Diâmetro do halo (mm)}}{\text{Diâmetro da colônia (mm)}} \quad (1)$$

O valor do IS foi então classificado em: alto ($IS > 4,0$), médio ($2,0 < IS < 4,0$) e baixo ($IS < 2,0$).

Tabela 4 - Fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato, produção de auxina e sideróforos dos isolados selecionados

Microrganismo	Fixação de N	Solubilização de P (IS)				Produção de AIA ($\mu\text{g/mL}$)	Sideróforos
		D1	D6	D9	D12		
UFV LPP B155	+	3,8a	4,1a	5,0a	5,0a	3,28d	+
CCMA-1347	+	1,5b	2,0b	2,0b	2,0b	4,55c	+
CCMA-1233	+	1,2b	1,8b	2,0b	2,5b	2,38d	+
CCMA-0106	+	1,8b	2,2b	2,6b	2,6b	9,76a	+
Ab-V5	+	Ø	Ø	Ø	Ø	6,82b	Ø

Fixação de N: Positivo quando observada formação de filme de crescimento em meio NFb. **IS:** Índice de solubilização: baixo se menor que 2,0; médio entre 2,0 e 4,0; alto se acima de 4,0. **AIA:** Ácido Indolacético. **Sideróforos:** Positivo quando ocorre formação de halo ao redor da colônia. Números seguidos de mesma letra, não diferem estatisticamente entre si na coluna.

Fonte: Do autor (2021).

Os quatro isolados testados e comparados com a estirpe Ab-V5 de *Azospirillum brasilense* testaram positivo para fixação biológica de nitrogênio, corroborando com os dados prévios e com a literatura (HIREMATH, 2012; YOUSUF; THAJUDEEN; RAHIMAN; KRISHNANKUTTY *et al.*, 2017). Um estudo quantitativo acerca da atividade da enzima nitrogenase ainda é necessário, para ranquear os isolados de acordo com sua capacidade de fixar nitrogênio.

Os quatro isolados demonstraram capacidade de solubilizar fosfato, no entanto, o isolado UFV LPP155 se destacou com média estatisticamente superior, inclusive para outro

isolado da mesma espécie, evento bem descrito em literatura (AHMAD; AHMAD; HILGER; NADEEM *et al.*, 2018; SAEID; PROCHOWNIK; DOBROWOLSKA-IWANIEK, 2018). Não houve diferença estatística entre os índices de solubilização dos outros três isolados.

Todos os isolados foram capazes de sintetizar ácido indolacético em diferentes níveis, onde o isolado CCMA-0106 de *Pseudomonas aeruginosa* apresentou maior média entre todos os tratamentos. Em estudos de promoção de crescimento, os isolados de *Pseudomonas sp.* se destacam pela capacidade de produzir altas quantidades de análogos de auxina, onde um valor próximo a 10 µg/ml é, inclusive, abordado como valor mediano da quantidade de auxina produzida (GALDIANO JÚNIOR; PEDRINHO; CASTELLANE; LEMOS, 2011; SUSILOWATI; RIYANTI; SETYOWATI; MULYA, 2018).

Todos os isolados foram capazes de produzir sideróforos, onde todas as espécies as quais pertencem os isolados já foram descritas em literatura, possuindo capacidade de produzir compostos quelantes (GHAZY; EL-NAHRAWY, 2021). Testes analíticos quantitativos são necessários para determinar a quantidade de complexo ferro-sideróforo formado em solução.

Os testes de mecanismos diretos de promoção de crescimento tiveram como objetivo comprovar a ausência de discrepância entre a literatura disponível acerca de bactérias promotoras, seus mecanismos e os isolados selecionados. Em testes quantitativos futuros, será possível ranquear os microrganismos mais eficientes para cada mecanismo, para então averiguar a existência de uma relação de sinergismo na combinação de mais de um microrganismo.

4.2 Inibição da germinação de uredósporos de *phakopsora pachyrhizi*

A partir do teste de germinação pode-se observar quais microrganismos e qual fração (metabólitos, células ou ambos) é responsável pela inibição da germinação caso a mesma ocorra.

Tabela 5 - Germinação dos esporos de *Phakopsora pachyrhizi* nos diferentes tratamentos

Código	Germinação
W1	0,0
W2	1,0
T1	1,0
T2	0,0
T3	0,0
T4	0,5
T5	0,0
T6	0,0
T7	1,0
T8	0,0
T9	0,0
T10	1,0
T11	0,0
T12	0,0

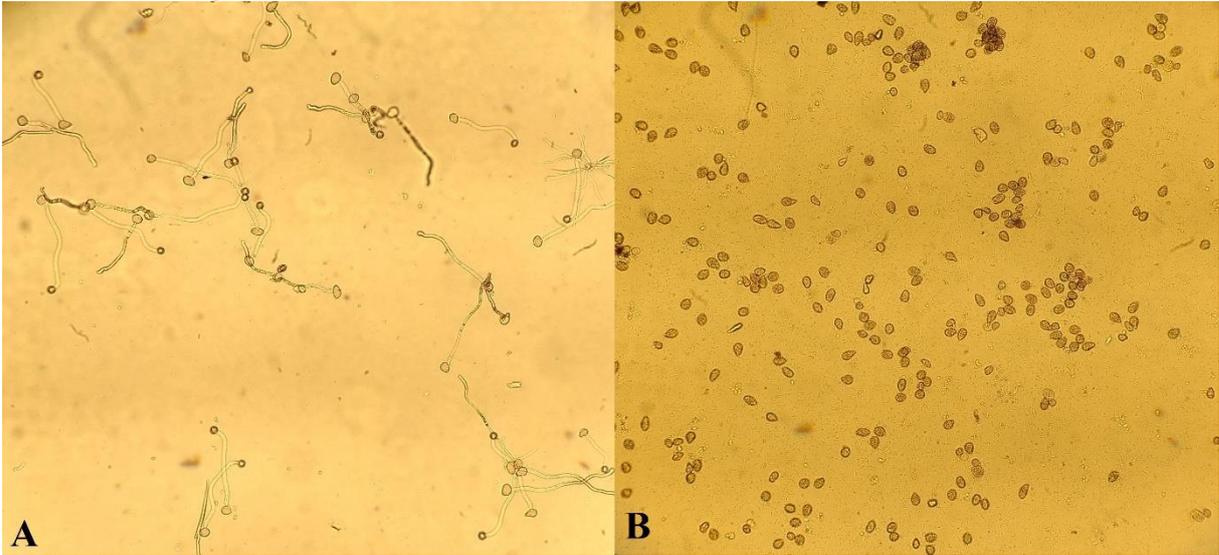
Germinação: Total = 1,0; parcial = 0,5; ausente = 0,0.

Fonte: Do autor (2021).

Nos tratamentos compostos apenas pelas células bacterianas, sem os metabólitos produzidos durante o crescimento, houve plena germinação dos uredósporos (T1, T4, T7 e T10) com tubo germinativo longo, e formação do apressório.

Já nos tratamentos onde estavam presentes os metabólitos produzidos ao longo do crescimento bacteriano, houve total inibição da germinação dos uredósporos, demonstrando que compostos secretados durante o crescimento bacteriano possuem propriedades antibióticas sobre o fungo *P. pachyrhizi* e afetam de alguma forma a germinação dos mesmos. Isolados de *Bacillus sp.* Já são conhecidos pela sua capacidade de inibir germinação de uredósporos da ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix*) (HADDAD; SARAIVA; MIZUBUTI; ROMEIRO *et al.*, 2013).

Figura 2 - (A) Uredóspero de *P. pachyrhizi* germinados (W2); (B) Uredóspero de *P. pachyrhizi* não germinados (T3)



Fonte: Do autor (2021).

A inibição da germinação dos uredósporos pode ser consequência de metabólitos antifúngicos secretados pela bactéria durante o crescimento em meio líquido e/ou pela ação de compostos tensoativos (biosurfactantes) que interagem com a membrana do uredóspero, comprometendo sua integridade e funcionalidade.

4.3 Avaliação do controle da ferrugem asiática

Na primeira avaliação, 14 dias após a inoculação, já foi possível observar que houve progressão da doença em todos os tratamentos, exceto aquele onde foi aplicado Serenade®, porém, a severidade da doença foi significativamente menor nos tratamentos compostos por biosurfactantes e por biosurfactantes e células, que não diferiram estatisticamente entre si.

Aos 18 dias após a introdução do patógeno, pode-se observar progressão mais tímida da doença nos tratamentos compostos por biosurfactantes. Aos 21 dias após a introdução do patógeno manteve-se o padrão de progressão anterior, com exceção do controle com Serenade®, que iniciou um processo de patogênese ainda que mínimo.

O experimento aponta que a inoculação dos isolados em plantas de soja previamente à chegada do patógeno, diminui consideravelmente a severidade da ferrugem asiática da soja, em diferentes intensidades, porém, todos apresentaram algum resultado positivo quando comparados a testemunha. Alguns valores de severidade obtidos se assemelham aos obtidos na

utilização de fungicida comercial (Serenade®) formulado a partir de microrganismos (*Bacillus subtilis*).

Tabela 6 - Severidade da ferrugem asiática 14, 18 e 21 dias após inoculação do patógeno

Tratamento	Média		
	14 DAI	18 DAI	21 DAI
W1	0,00 aA	0,00 aA	0,24 aB
T11	0,00 aA	0,42 aB	0,54 aC
T3	0,12 aA	0,36 aB	0,42 aC
T8	0,18 aA	0,30 aB	0,60 aC
T6	0,36 aA	0,62 aB	0,82 aC
T12	0,36 aA	0,56 aB	0,62 aC
T5	0,36 aA	0,30 aB	0,57 aC
T2	0,37 aA	0,34 aB	0,48 aC
T9	0,55 aA	0,59 aB	0,81 aC
T10	2,18 bA	4,00 bB	6,25 bC
T7	3,75 cA	6,00 bB	9,75 cC
T4	4,00 cA	5,75 bB	9,20 cC
T1	5,75 dA	9,20 cB	13,25 dC
W2	6,25 dA	14,40 dB	17,45 eC

Valores acompanhados da mesma letra minúscula, não diferem estatisticamente entre si na coluna e acompanhados da mesma letra maiúscula não se diferem na linha.

Fonte: Do autor (2021).

Vários estudos apontam a capacidade das bactérias do gênero *Bacillus* e *Pseudomonas*, principalmente no que diz respeito a seus metabólicos, principalmente biosurfactantes, no controle de doenças em plantas. Ambos os gêneros testados são capazes de produzir tais compostos, como por exemplo, a surfactina, tida como o biosurfactante mais potente já descoberto e outros lipopeptídeos como a iturina e a fengicina no caso das bactérias do gênero *Bacillus* e ramnolipídios no caso de *P. aeruginosa* (DESAI; BANAT, 1997; KARANTH; DEO; VEENANADIG, 1999; KOSARIC; VARDAR-SUKAN, 2015; LANG; WAGNER, 1993; LIU; ZHONG; YANG; LIU *et al.*, 2018).

Além dos biosurfactantes, outros compostos como a bacilomicina (MOYNE; SHELBY; CLEVELAND; TUZUN, 2001), a zwittermicina (SILO-SUH; STABB; RAFFEL; HANDELSMAN, 1998) também são descritos como fortes agentes antifúngicos, podendo também estar ligados a redução da severidade da ferrugem asiática da soja.

Figura 3 – (A) Planta tratada com isolado UFV LPP155 contendo biosurfactantes e células (T3);
(B) Primeiro par de folhas acima das cotiledonares de planta tratada apenas com células do isolado UFV LPP155 (T1)



Fonte: Do autor (2021).

5 CONCLUSÃO

A utilização de bactérias promotoras de crescimento do gênero *Bacillus* e *Pseudomonas* se mostrou eficiente no controle da ferrugem asiática da soja, quando aplicadas em conjunto com os metabólitos produzidos durante o crescimento bacteriano.

Estudos futuros para otimização da entrega do princípio ativo e aumento do efeito residual da aplicação, são necessários, a fim de aumentar o espaço entre as aplicações e, conseqüentemente, diminuir os custos com o manejo.

Combinações de duas ou mais bactérias buscando um possível efeito sinérgico entre elas, são necessárias, assim como a busca por substratos alternativos para crescimento bactéria, visando reduzir a dependência de meios de cultura e buscando aproveitamento de subprodutos de menor valor, como resíduos agroindustriais.

Avaliações quantitativas acerca da promoção de crescimento por parte dos microrganismos são necessárias, para identificar ganhos não apenas em fitossanidade, mas também nos caracteres agronômicos.

REFERÊNCIAS

- AGROFIT. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitário. Consulta de Produtos Formulados. **Serenade**. 2019a. Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/agrofit.ap_download_blob_agrofit?p_id_file=259647&p_nm_file=F411163021/Serenade_BULA_AGROFIT_altera%E7%E3o%20belford%20oroxo.pdf. Acesso em: 28 nov. 2021.
- AGROFIT. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitário. Consulta de Produtos Formulados. **Sonata**. 2019b. Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/ap_download_blob_agrofit?p_nm_file=F2057542257/Bula%20Sonata.pdf. Acesso em: 28 nov. 2021.
- AHMAD, M.; AHMAD, I.; HILGER, T. H.; NADEEM, S. M. *et al.* Preliminary study on phosphate solubilizing *Bacillus subtilis* strain Q3 and *Paenibacillus* sp. strain Q6 for improving cotton growth under alkaline conditions. **PeerJ**, [S.l.], v. 6, p. e5122-e5122, 2018.
- AKINTOKUN, A. K.; AKANDE, G. A.; AKINTOKUN, P. O.; POPOOLA, T. *et al.* Solubilization of Insoluble Phosphate by Organic Acid-Producing Fungi Isolated from Nigerian Soil. **International Journal of Soil Science**, 2, p. 301-307, 04/01 2007.
- ALBAYRAK, Ç. B. *Bacillus* Species as Biocontrol Agents for Fungal Plant Pathogens. In: ISLAM, M. T.; RAHMAN, M. M. *et al.* (Ed.). **Bacilli and Agrobiotechnology: Phytostimulation and Biocontrol**: Volume 2. Cham: Springer International Publishing, 2019. p. 239-265.
- ANDRADE, F. M. d.; PEREIRA, T. d. A.; SOUZA, T. P.; GUIMARÃES, P. H. S. *et al.* Beneficial effects of inoculation of growth-promoting bacteria in strawberry. **Microbiological Research**, [S.l.], v. 223/225, p. 120-128, June/Aug. 2019.
- BAREA, J. M. Future challenges and perspectives for applying microbial biotechnology in sustainable agriculture based on a better understanding of plant-microbiome interactions %J **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, [S.l.], v. 15, n. 2, jun. 2015.
- BATISTA, B. D.; LACAVA, P. T.; FERRARI, A.; TEIXEIRA-SILVA, N. S. *et al.* Screening of tropically derived, multi-trait plant growth- promoting rhizobacteria and evaluation of corn and soybean colonization ability. **Microbiological Research**, [S.l.], v. 206, p. 33-42, 2018.
- BHARTI, N.; BARNAWAL, D. Chapter Five - Amelioration of Salinity Stress by PGPR: ACC Deaminase and ROS Scavenging Enzymes Activity. In: SINGH, A. K.; KUMAR, A. *et al.* (Ed.). **PGPR Amelioration in Sustainable Agriculture**: Woodhead Publishing, 2019. p. 85-106.
- BROMFIELD, K. R. **Soybean Rust** St. Paul: American Phytopathological Society, 1984. 65 p. (Monograph, 11).
- CHEN, Q.-L.; CUI, H.-L.; SU, J.-Q.; PENUELAS, J. *et al.* Antibiotic Resistomes in Plant Microbiomes. **Trends in Plant Science**, [S.l.], v. 24, n. 6, p. 530-541, 2019.

CHRISTIANSEN, C. F.; LÖSCHER, C. R. Facets of diazotrophy in the OMZ off Peru revisited- what we couldn't see from a single marker gene approach. **bioRxiv**, p. 558072, 2019.

CLEMENTE, T. E.; CAHOON, E. B. Soybean Oil: Genetic Approaches for Modification of Functionality and Total Content. **Plant Physiology**, [S.l.], v. 151, n. 3, p. 1030, 2009.

CONSÓRCIO-ANTIFERRUGEM. **Parceria público-privada no combate à ferrugem asiática da soja**. 2019. Disponível em: http://acacia.cnpso.embrapa.br:8080/cferrugem_files//764411951/Tabela_resumo_ferrugem_atual.pdf. Acesso em: 12 mar. 2021.

COSTAMILAN, L. M.; CARRÃO-PANIZZI, M. C.; STRIEDER, M. L.; BERTAGNOLLI, P. F. **Reunião de Pesquisa de Soja da Região Sul**: Indicações técnicas para a cultura da soja no Rio Grande do Sul e em Santa Catarina. Passo Fundo, RS: Embrapa Trigo, Apassul, 2012. 142 p.

CZABAN, W.; RASMUSSEN, J.; LAURSEN, B. B.; VIDKJÆR, N. H. *et al.* Multiple effects of secondary metabolites on amino acid cycling in white clover rhizosphere. **Soil Biology and Biochemistry**, [S.l.], v. 123, p. 54-63, 2018.

DAHAL, B.; NANDAKAFLE, G.; PERKINS, L.; BRÖZEL, V. S. Diversity of free-Living nitrogen fixing Streptomyces in soils of the badlands of South Dakota. **Microbiological Research**, [S.l.], v. 195, p. 31-39, 2017.

DESAI, J. D.; BANAT, M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, [S.l.], v. 61, n. 1, p. 17, 1997.

DÖBEREINER, J. Isolation and identification of root associated diazotrophs. **Plant and Soil**, [S.l.], v. 110, n. 2, p. 207-212, 1988.

DUBEY, A.; KUMAR, A.; ABD_ALLAH, E. F.; HASHEM, A. *et al.* Growing more with less: Breeding and developing drought resilient soybean to improve food security. **Ecological Indicators**, [S.l.], v. 105, p. 425-437, 2019.

EDWARDS, S. G.; SEDDON, B. Mode of antagonism of *Brevibacillus brevis* against *Botrytis cinerea* in vitro. **Applied Microbiology**, [S.l.], v. 91, n. 1364-5072, p. 652-659, 2001.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária. **Tecnologias de Produção de Soja - Região Central do Brasil**. Londrina, PR: Embrapa, 2013. p. 1677-8499.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária. **Soja em Números**. Londrina, PR: Embrapa, 2020. Disponível em: <https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>. Acesso em: 12 mar. 2021.

FENG, K.; LU, H. M.; SHENG, H. J.; WANG, X. L. *et al.* Effect of Organic Ligands on Biological Availability of Inorganic Phosphorus in Soils. **Pedosphere**, [S.l.], v. 14, p. 85-92, 2004.

FERNANDES, M. do C. de A. Emprego de metodos alternativas de controle de pragas e doencas na olericultura. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.18, p.110-112, jul. 2000. (Suplemento).

FERREIRA, D. F. **Sisvar**: a computer statistical analysis system %J *Ciência e Agrotecnologia*, 2011.

FIGUEIREDO, M.; MERGULHÃO, A.; SOBRAL, J.; LIRA JUNIOR, M. *et al.* **Biological Nitrogen Fixation**: Importance, Associated Diversity, and Estimates. *Plant Microbe Symbiosis: Fundamentals and Advances*, 2013. p. 267-289.

FRANKOWSKI, J.; LORITO, M.; SCALA, F.; SCHMID, R. *et al.* Purification and properties of two chitinolytic enzymes of *Serratia plymuthica* HRO-C48. **Arch Microbiol**, [S.l.], v. 176, n. 6, p. 421-426, Dec. 2001.

FUKAMI, J.; CERZINI, P.; HUNGRIA, M. Azospirillum: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. **AMB Express**, [S.l.], v. 8, n. 1, p. 73, 2018.

GABY, J. C.; BUCKLEY, D. H. A global census of nitrogenase diversity. **Environmental Microbiology**, [S.l.], v. 13, n. 7, p. 1790-1799, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02488.x>. Acesso em: 14 mar. 2021.

GALDIANO JÚNIOR, R. F.; PEDRINHO, E. A. N.; CASTELLANE, T. C. L.; LEMOS, E. G. d. M. Auxin-producing bacteria isolated from the roots of *Cattleya walkeriana*, an endangered Brazilian orchid, and their role in acclimatization. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, [S.l.], v. 35, p. 729-737, 2011.

GHAZY, N.; EL-NAHRAWY, S. Siderophore production by *Bacillus subtilis* MF497446 and *Pseudomonas koreensis* MG209738 and their efficacy in controlling *Cephalosporium maydis* in maize plant. **Archives of Microbiology**, [S.l.], v. 203, n. 3, p. 1195-1209, 2021.

GLICK, B. R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, [S.l.], v. 41, n. 2, p. 109-117, 1995.

GLICK, B. R. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. **Scientifica**, [S.l.], p. 963401, 2012.

GODOY, C. V. **Manejo de doenças na cultura da soja**. In: WORKSHOP CTC AGRICULTURA, 16., 2017, Rio Verde. Agricultura - Resultados 2017. Rio Verde: Centro Tecnológico Comigo, 2017. Disponível em: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/1074366>. Acesso em: 10 mar. 2021.

GODOY, C. V.; SEIXAS, C. D. S.; SOARES, R. M.; MARCELINO-GUIMARÃES, F. C. *et al.* Asian soybean rust in Brazil: past, present, and future. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, [S.l.], v. 51, p. 407-421, 2016.

GORDON, S. A.; WEBER, R. P. COLORIMETRIC ESTIMATION OF INDOLEACETIC ACID. **Plant physiology**, [S.l.], v. 26, n. 1, p. 192-195, 1951.

- HADDAD, F.; SARAIVA, R.; MIZUBUTI, E.; ROMEIRO, R. *et al.* Antifungal compounds as a mechanism to control *Hemileia vastatrix* by antagonistic bacteria. **Tropical Plant Pathology**, [S.l.], v. 38, p. 398-405, 2013.
- HIREMATH, G. Isolation and Characterization of Nitrogen Fixing *Bacillus Subtilis* Strain As-4 From Agricultural Soil. **International Journal of Recent Scientific Research**, [S.l.], v. 3, p. 762-765, 09/01 2012.
- INNEREBNER, G.; KNIEF, C.; VORHOLT, J. A. Protection of *Arabidopsis thaliana* against leaf-pathogenic *Pseudomonas syringae* by *Sphingomonas* strains in a controlled model system. **Applied and Environmental Microbiology**, [S.l.], v. 77, n. 10, p. 3202-3210, 2011.
- IZUMI, M.; FUJIFURU, M.; OKADA, A.; TAKAI, K. *et al.* Evaluation of a Biological Indicator for Terminal Sterilization of Large-Volume Parenterals. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, [S.l.], v. 70, n. 1, p. 30, 2016.
- JAIN, S.; CHOUDHARY, D. K.; SHARMA, K. P.; AGGARWAL, R. Bacterial Mediated Plant Protection: Induced Systemic Resistance in Soybean. *In*: PATRA, J.; DAS, G. *et al.* (Ed.). **Microbial Biotechnology**. Singapore: Springer, 2018. p. 193-206.
- KARANTH, N. G. K.; DEO, P. G.; VEENANADIG, N. K. Microbial production of biosurfactants and their importance. **Current Science**, [S.l.], v. 77, n. 1, p. 116-126, 1999.
- KHAN, A.; LU, G.; AYZAZ, M.; ZHANG, H. *et al.* Phosphorus efficiency, soil phosphorus dynamics and critical phosphorus level under long-term fertilization for single and double cropping systems. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, [S.l.], v. 256, p. 1-11, 2018.
- KOSARIC, N.; VARDAR-SUKAN, F. **Biosurfactants Production and Utilization. Processes, Technologies, and Economics**. CRC Press, 2015. 389 p.
- KUMAR, P.; THAKUR, S.; DHINGRA, G. K.; SINGH, A. *et al.* Inoculation of siderophore producing rhizobacteria and their consortium for growth enhancement of wheat plant. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [S.l.], v. 15, p. 264-269, 2018.
- LANG, S.; WAGNER, F. **Biosurfactants: production, properties, applications**. New York: Marcel Decker, 1993. cap. 8.
- LEE, S.-K.; LUR, H.-S.; LO, K.-J.; CHENG, K.-C. *et al.* Evaluation of the effects of different liquid inoculant formulations on the survival and plant-growth-promoting efficiency of *Rhodospseudomonas palustris* strain PS3. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S.l.], v. 100, n. 18, p. 7977-7987, 2016.
- LIU, G.; ZHONG, H.; YANG, X.; LIU, Y. *et al.* Advances in applications of rhamnolipids biosurfactant in environmental remediation: **A Review.**, [S.l.], v. 115, n. 4, p. 796-814, 2018.
- LOACES, I.; FERRANDO L FAU - SCAVINO, A. F.; SCAVINO, A. F. Dynamics, Diversity and Function of Endophytic Siderophore-Producing Bacteria in Rice. **Microb Ecol.**, [S.l.], v. 61, n. 3, p. 606-618, 2011

- LOBO, C. B.; JUÁREZ TOMÁS, M. S.; VIRUEL, E.; FERRERO, M. A. *et al.* Development of low-cost formulations of plant growth-promoting bacteria to be used as inoculants in beneficial agricultural technologies. **Microbiological Research**, [S.l.], v. 219, p. 12-25, 2019.
- MARRA, L.; SOARES, C.; OLIVEIRA-LONGATTI, S.; FERREIRA, P. *et al.* Biological nitrogen fixation and phosphate solubilization by bacteria isolated from tropical soils. **Plant and Soil**, [S.l.], v. 357, 2012.
- MARTÍNEZ-VIVEROS, O.; JORQUERA, M. A.; CROWLEY, D. E.; GAJARDO, G. *et al.* Mechanisms and Practical Considerations Involved in Plant Growth Promotion by Rhizobacteria. **J Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, [S.l.], v. 10, p. 293-319, 2010.
- MASSON-BOIVIN, C.; SACHS, J. L. Symbiotic nitrogen fixation by rhizobia—the roots of a success story. **Current Opinion in Plant Biology**, [S.l.], v. 44, p. 7-15, 2018.
- MELCHING, J. S.; DOWLER, W. M.; KOOGLE, D. L.; ROYER, M. H. Effects of duration, frequency, and temperature of leaf wetness periods on soybean rust. **Plant Disease**, [S.l.], v. 73, n. 2, p. 117-122, 1989.
- MHLONGO, M. I.; PIATER, L. A.; MADALA, N. E.; LABUSCHAGNE, N. *et al.* The Chemistry of Plant–Microbe Interactions in the Rhizosphere and the Potential for Metabolomics to Reveal Signaling Related to Defense Priming and Induced Systemic Resistance. **Frontiers in Plant Science**, [S.l.], v. 9, p. 112, 2018.
- MOYNE, A. L.; SHELBY, R.; CLEVELAND, T. E.; TUZUN, S. Bacillomycin D: an iturin with antifungal activity against *Aspergillus flavus*. **Journal of Applied Microbiology**, [S.l.], v. 90, n. 4, p. 622-629, 2001.
- NATIONAL_RESEARCH_COUNCIL. **Biological Nitrogen Fixation: Research Challenges - A Review of Research Grants Funded by the U.S. Agency for International Development**. Washington, DC: The National Academies Press, 1994.
- NAUTIYAL, C. S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, [S.l.], v. 170, Issue 1, Pages 265–270, January, 1999.
- NEILANDS, J. B. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. **J Biol Chem**, [S.l.], v. 270, n. 45, p. 26723-26726, 1995.
- NEILANDS, J. B.; LEONG, S. A. Siderophores in Relation to Plant Growth and Disease. **Annual Review of Plant Physiology**, [S.l.], v. 37, n. 1, p. 187-208, 1986.
- NUMAN, M.; BASHIR, S.; KHAN, Y.; MUMTAZ, R. *et al.* Plant growth promoting bacteria as an alternative strategy for salt tolerance in plants: A review. **Microbiological Research**, [S.l.], v. 209, p. 21-32, 2018.
- OLANREWAJU, O. S.; GLICK, B. R.; BABALOLA, O. O. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [S.l.], v. 33, n. 11, p. 197, 2017.

- PANDA, A.; BISHT, S.; DE MANDAL, s.; SENTHIL KUMAR, N. *et al.* Brevibacillus as a biological tool: A short review. **Antonie Van Leeuwenhoek**, [S.l.], v. 105, n. 4, p. 623-39, 2014.
- PEDRINHO, E. A. N.; GALDIANO JÚNIOR, R. F.; CAMPANHARO, J. C.; ALVES, L. M. C. *et al.* Identificação e avaliação de rizobactérias isoladas de raízes de milho %. **J Bragantia**, [S.l.], v. 69, p. 905-911, 2010.
- POSTGATE, J. R. Biology Nitrogen Fixation: Fundamentals. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B. **Biological Sciences**, [S.l.], v. 296, n. 1082, p. 375-385, 1982.
- RAJKUMAR, M.; AE, N.; PRASAD, M. N. V.; FREITAS, H. Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. **Trends in Biotechnology**, [S.l.], v. 28, n. 3, p. 142-149, 2010.
- RAMAKRISHNA, W.; YADAV, R.; LI, K. Plant growth promoting bacteria in agriculture: Two sides of a coin. **Applied Soil Ecology**, [S.l.], v. 138, p. 10-18, 2019.
- RICHARDSON, A. Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. **Functional Plant Biology**, 28, p. 897-906, 09/21 2001.
- RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnol Adv**, [S.l.], v. 17, n. 4-5, p. 319-339, 1999.
- RODRIGUEZ, H.; GONZALEZ, T.; GOIRE, I.; BASHAN, Y. Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium Azospirillum spp. **Naturwissenschaften**, [S.l.], v. 91, n. 11, p. 552-555, 2004.
- RUPE, J.; SCONYERS, L. **Soybean Rust**. The Plant Health Instructor Index. 2008. Disponível em: <https://www.apsnet.org/edcenter/Pages/phi.aspx>. Acesso em: 13 mar. 2021.
- SAEID, A.; PROCHOWNIK, E.; DOBROWOLSKA-IWANIEK, J. Phosphorus Solubilization by Bacillus Species. **Molecules (Basel, Switzerland)**, [S.l.], v. 23, n. 11, p. 2897, 2018.
- SCHIRAWSKI, J.; PERLIN, M. H. Plant–Microbe Interaction 2017—The Good, the Bad and the Diverse. **International Journal of Molecular Sciences**, [S.l.], v. 19, n. 5, 2018.
- SCHOENBORN, L.; YATES, P. S.; GRINTON, B. E.; HUGENHOLTZ, P. *et al.* Liquid serial dilution is inferior to solid media for isolation of cultures representative of the phylum-level diversity of soil bacteria. **Appl Environ Microbiol**, [S.l.], v. 70, n. 7, p. 4363-4366, 2004.
- SCHWYN, B.; NEILANDS, J. B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Anal Biochem**, [S.l.], v. 160, n. 1, p. 47-56, 1987.
- SHABANAMOL, S.; DIVYA, K.; GEORGE, T. K.; RISHAD, K. S. *et al.* Characterization and in planta nitrogen fixation of plant growth promoting endophytic diazotrophic

Lysinibacillus sphaericus isolated from rice (*Oryza sativa*). **Physiological and Molecular Plant Pathology**, [S.l.], v. 102, p. 46-54, 2018.

SHAH, M. U. H.; SIVAPRAGASAM, M.; MONIRUZZAMAN, M.; YUSUP, S. B. A comparison of Recovery Methods of Rhamnolipids Produced by *Pseudomonas Aeruginosa*. **Procedia Engineering**, [S.l.], v. 148, p. 494-500, 2016.

SILO-SUH, L. A.; STABB, E. V.; RAFFEL, S. J.; HANDELSMAN, J. Target range of zwittermicin A, an aminopolyol antibiotic from *Bacillus cereus*. **Curr Microbiol**, [S.l.], v. 37, n. 1, p. 6-11, 1998.

SINGH, P. P.; SHIN, Y. C.; PARK, C. S.; CHUNG, Y. R. Biological Control of Fusarium Wilt of Cucumber by Chitinolytic Bacteria. **Phytopathology**®, [S.l.], v. 89, n. 1, p. 92-99, 1999.

SOUZA, R. de.; AMBROSINI, A.; PASSAGLIA, L. M. P. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. **Genetics and Molecular Biology**., [S.l.], v. 38, p. 401-419, 2015.

SPAEPEN, S.; BOSSUYT, S.; ENGELEN, K.; MARCHAL, K. *et al.* Phenotypical and molecular responses of *Arabidopsis thaliana* roots as a result of inoculation with the auxin-producing bacterium *Azospirillum brasilense*. **The New phytologist**, [S.l.], v. 201, 2013.

SUSILOWATI, D. N.; RIYANTI, E. I.; SETYOWATI, M.; MULYA, K. Indole-3-acetic acid producing bacteria and its application on the growth of rice. **AIP Conference Proceedings**, [S.l.], n. 1, p. 020016, 2018.

SZILAGYI-ZECCHIN, V. J.; IKEDA, A. C.; HUNGRIA, M.; ADAMOSKI, D. *et al.* Identification and characterization of endophytic bacteria from corn (*Zea mays* L.) roots with biotechnological potential in agriculture. **AMB Express**, Heidelberg, v. 4, n. 26, p. 1-9, May, 2014.

TONELLI, M. L.; MAGALLANES-NOGUERA, C.; FABRA, A. Symbiotic performance and induction of systemic resistance against *Cercospora sojina* in soybean plants co-inoculated with *Bacillus* sp. CHEP5 and *Bradyrhizobium japonicum* E109. **Archives of Microbiology**, [S.l.], v. 199, n. 9, p. 1283-1291, 2017.

VAN DER MEIJ, A.; WORSLEY, S. F.; HUTCHINGS, M. I.; VAN WEZEL, G. P. Chemical ecology of antibiotic production by actinomycetes. **FEMS Microbiology Reviews**, [S.l.], v. 41, n. 3, p. 392-416, 2017.

VANCE, C. P. Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition. Plant nutrition in a world of declining renewable resources. **Plant Physiol**, [S.l.], v. 127, n. 2, p. 390-397, 2001.

WANG, F.; DENG, M.; XU, J.; ZHU, X. *et al.* Molecular mechanisms of phosphate transport and signaling in higher plants. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, [S.l.], v. 74, p. 114-122, 2018.

WANG, Y. P.; LAW, R. M.; PAK, B. A global model of carbon, nitrogen and phosphorus cycles for the terrestrial biosphere. **Biogeosciences**, [S.l.], v. 7, n. 7, p. 2261-2282, 2010.

WRATHER, A.; SHANNON, G.; BALARDIN, R.; CARREGAL, L. *et al.* Effect of Diseases on Soybean Yield in the Top Eight Producing Countries in 2006. **Plant Health Progress**, [S.l.], v. 11, n. 1, p. 29, 2010.

YORINORI, J. T.; PAIVA, W. M. **Ferrugem da soja: *Phakopsora pachyrhizi* Sydow.** Londrina, PR: Embrapa Soja, 2002.

YOUSUF, J.; THAJUDEEN, J.; RAHIMAN, M.; KRISHNANKUTTY, S. *et al.* Nitrogen fixing potential of various heterotrophic Bacillus strains from a tropical estuary and adjacent coastal regions. **J Basic Microbiol**, [S.l.], v. 57, n. 11, p. 922-932, 2017.

ZOUARI, I.; MASMOUDI, F.; MEDHIOUB, K.; TOUNSI, S. *et al.* Biocontrol and plant growth-promoting potentiality of bacteria isolated from compost extract. **Antonie van Leeuwenhoek**, [S.l.], v. 113, n. 12, p. 2107-2122, 2020.