



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE DO PARANÁ
CAMPUS LUIZ MENEGHEL
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

ÉVERSON PEDRO ZENY

**POTENCIAL DE USO DE CONTROLE BIOLÓGICO PARA
FERRUGEM-ASIÁTICA DA SOJA**

BANDEIRANTES, PR, BRASIL
2020

ÉVERSON PEDRO ZENY

**POTENCIAL DE USO DE CONTROLE BIOLÓGICO PARA
FERRUGEM-ASIÁTICA DA SOJA**

Dissertação apresentada ao Programa de
Mestrado em Agronomia, da Universidade
Estadual do Norte do Paraná, *Campus* Luiz
Meneghel.

Orientadora: Prof.^a Dra. Mayra Costa da Cruz
Gallo de Carvalho

BANDEIRANTES, PR, BRASIL
2020

Ficha catalográfica elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UENP

PZ56pp Pedro Zeny, Éverson
POTENCIAL DE USO DE CONTROLE BIOLÓGICO PARA
FERRUGEM-ASIÁTICA DA SOJA / Éverson Pedro Zeny;
orientadora Mayra Costa da Cruz Gallo de Carvalho -
Bandeirantes, 2020.
75 p. :il.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade
Estadual do Norte do Paraná, Centro de Ciências
Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2020.

1. Penicillium sp.. 2. Phakopsora pachyrhizi. 3.
Biocontrole. 4. Resistência. 5. Suspensão de esporos.
I. Costa da Cruz Gallo de Carvalho, Mayra, orient.
II. Título.

ÉVERSON PEDRO ZENY

**POTENCIAL DE USO DE CONTROLE BIOLÓGICO PARA
FERRUGEM-ASIÁTICA DA SOJA**

Dissertação apresentada ao Programa de
Mestrado em Agronomia, da Universidade
Estadual do Norte do Paraná, *Campus Luiz
Meneghel*.

Aprovado em: 28 / 02 / 2020

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. ^a Dra. Mayra Costa da Cruz Gallo de Carvalho	UENP
Prof. Dr. Leopoldo Sussumu Matsumoto	UENP
Prof. Dr. Wilson Story Venancio	UEPG
Dr. Maurício Conrado Meyer	EMBRAPA
Prof. Dr. João Torres	UENP

Prof.^a Dra. Mayra C. da C. Gallo de Carvalho
Orientadora
Universidade Estadual Norte do Paraná,
Campus Luiz Meneghel

ZENY, Éverson Pedro. **Potencial de Uso de Controle Biológico para Ferrugem-asiática da Soja**. 2019. Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Agronomia - Universidade Estadual do Norte do Paraná, Campus Luiz Meneghel, Bandeirantes, 2020.

RESUMO

Atualmente a ferrugem-asiática da soja (FAS), agente causal *Phakopsora pachyrhizi*, é a doença mais destrutiva para a cultura. Como estratégias de controle destacam-se o controle: químico, mais utilizado, porém com eficiência cada vez mais reduzida devido à seleção de mutantes adaptados; genético, sem nenhum genótipo capaz de conferir resistência ampla a doença; e o vazio sanitário, determinado por meio de Normativas legais para estabelecer um período mínimo de 60 dias sem a presença de plantas de soja no campo. Nesse cenário o uso de controle biológico se apresenta como uma alternativa, como já empregado em outras culturas e doenças. Dentre as possibilidades existentes, os resultados alcançados nesse estudo indicam uma espécie do gênero *Penicillium* para biocontrole da FAS. Os objetivos do presente estudo foram a avaliação do uso de *Penicillium* sp. como agente de controle biológico para FAS e a definição do melhor método de preparo do mesmo. Nesse sentido foram conduzidos experimentos de teste de germinação em placas de Petri e 48 poços; ensaios em folhas destacadas de soja cultivadas em placas de Petri; ensaio em casa de vegetação em plantas de soja; e por fim, um ensaio a campo. As formas de preparo do *Penicillium* sp. foram suspensão de esporos; uso do sobrenadante *in natura* (oriundo do meio de cultivo); sobrenadante filtrado (livre de estruturas do fungo); e sobrenadante filtrado e autoclavado. Os parâmetros avaliados foram a % de esporos germinados, AACPD e % de controle em relação a testemunha. Os testes de germinação de esporos de *P. pachyrhizi* sob inoculação de *Penicillium* sp. mostraram resultados significativos de controle da germinação. Foi possível observar que embora os ensaios em placa de Petri e os conduzidos em plantas inteiras tenham apontado diferentes formas de preparo como mais eficientes, todos os ensaios evidenciaram o potencial de uso do *Penicillium* sp. no controle biológico da FAS. Futuros ensaios serão fundamentais, principalmente conduzidos a campo, para determinar o potencial de uso do biocontrole, sua forma de aplicação e associação ao manejo da cultura.

Palavras-chave: *Penicillium* sp., *Phakopsora pachyrhizi*, biocontrole, resistência, suspensão de esporos, diluição, inoculação.

ZENY, Éverson Pedro. **Potential Use of Biological Control for Asian Soybean Rust**. 2019. Master's dissertation presented to the obtention of master's degree in Agronomy - Universidade Estadual do Norte do Paraná, Campus Luiz Meneghel, Bandeirantes, 2020.

ABSTRACT

Currently Asian soybean rust (ASR), causative agent *Phakopsora pachyrhizi*, is the most destructive disease to the crop. Control strategies are: chemical, more widely used, but with increasingly reduced efficiency due to the selection of adapted mutants; genetic, without any genotype capable of conferring broad rust resistance; and the void sanitary periods with are determined by legal regulations with the aim of establish a minimum period of 60 days without the presence of soybean plants in the field. In this scenario the use of biological control is presented as an alternative, as already used in other cultures and diseases. Among the existing possibilities, the results achieved in this study indicate a species of the genus *Penicillium* for ASR biocontrol. Thus, our objectives were evaluate the use of *Penicillium* sp. as a biological control agent for ASR and the definition of the best preparation method for its use. In this sense we conducted germination tests in Petri dishes and 48-well plate; experiments on detached soybean leaves grown in Petri dishes; greenhouse tests on soybean plants; and finally, a field trial. The forms of use of *Penicillium* sp. tested were spore suspension; use of the supernatant *in natura* (from the culture medium); filtered supernatant (free of fungus structures); and filtered and autoclaved supernatant. Parameters evaluated were % of germinated spores, AUDPC and % of control in comparing with the check. *Phakopsora pachyrhizi* spore germination tests under inoculation of the *Penicillium* sp. showed significant control results. It was possible to observe that although the tests in Petri dishes and those carried out on whole plants have indicated different forms of preparation as more efficient, all the tests showed the potential use of *Penicillium* sp. in the biological control of ASR. Future trials will be fundamental, mainly conducted in the field, to determine the potential of the use of biocontrol for ASR, its application and association with crop management.

Keywords: *Penicillium* sp., *Phakopsora pachyrhizi*, biocontrol, resistance, spore suspension, dilution, inoculation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ilustração do ciclo biológico da ferrugem-asiática da soja causada por <i>Phakopsora pachyrhizi</i> . Fonte: Reis e Carmona (2005) citado por Reis et al. (2006).....	8
Figura 2: Porcentagem do controle da ferrugem-asiática da soja em ensaios de campo uniformes em diferentes regiões produtoras de soja no Brasil. Ensaio com DMI + QoI, ciproconazol + azoxistrobina; QoI, azoxistrobina; e DMI, tebuconazol. Fonte: Godoy et al., (2016).	8
Figura 3: Períodos de Vazio Sanitário. Fonte: Embrapa Soja (2019).	12
Figura 4: Imagens do isolado de <i>Penicillium</i> sp. no microscópio óptico binocular com aumento aproximado de 400x (Fonte: CARRETS, L. de A., 2018).	19
Figura 5: Representação esquemática dos procedimentos para obtenção de inóculo dos tratamentos.....	21
Figura 6: Porcentagem de controle de <i>P. pachyrhizi</i> nos ensaios em placa.	33
Figura 7: Porcentagem de controle de <i>P. pachyrhizi</i> em folhas destacadas de plantas de soja (<i>Glycine max</i>) da cultivar M 5917 Ipro.	37
Figura 8: Lesões de <i>P. pachyrhizi</i> micoparasitadas por <i>Penicillium</i> sp. encontradas no ensaio com folhas destacadas (1) (Fonte: Zeny, E.P., 2019).	38
Figura 9: Porcentagem de controle de <i>P. pachyrhizi</i> em folhas de soja (<i>Glycine max</i>) da cultivar M 5917 Ipro, cultivadas em casa de vegetação.	41
Figura 10: Porcentagem de controle de <i>P. pachyrhizi</i> em plantas de soja (<i>Glycine max</i>) da cultivar BS 2606 Ipro, cultivadas à campo.	43
Figura 11: Porcentagem de controle de <i>P. pachyrhizi</i> pela aplicação das diluições do <i>Penicillium</i> sp., média de 4 ensaios.	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Descrição dos tratamentos e diluições de <i>Penicillium</i> sp. utilizados nos ensaios...	22
Tabela 2: Tratamentos utilizados nos ensaios de placa.....	24
Tabela 3: Tratamentos utilizados nos ensaios de folhas destacadas.....	26
Tabela 4: Tratamentos utilizados no ensaio em casa de vegetação.	27
Tabela 5: Tratamentos utilizados no ensaio à campo.	29
Tabela 6: Dados climáticos coletados no momento das aplicações do ensaio à campo.....	30
Tabela 7: Tratos culturais utilizados no ensaio à campo.	30
Tabela 8: Porcentagem de esporos de <i>P. pachyrhizi</i> germinados nos testes de germinação em placa de Petri e em placa de 48 poços sob diferentes métodos de preparo do <i>Penicillium</i> sp.	32
Tabela 9: AACPD de <i>P. pachyrhizi</i> em folhas destacadas de plantas de soja (<i>Glycine max</i>) da cultivar M 5917 Ipro, cultivadas em placas de Petri.....	36
Tabela 10: AACPD de <i>P. pachyrhizi</i> em folhas de soja (<i>Glycine max</i>) da cultivar M 5917 Ipro, cultivadas em casa de vegetação.....	39
Tabela 11: AACPD de <i>P. pachyrhizi</i> em de plantas de soja (<i>Glycine max</i>) da cultivar BS 2606 Ipro, cultivadas à campo.	42

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. CULTURA DA SOJA	3
2.2. FERRUGEM-ASIÁTICA DA SOJA (FAS)	4
2.2.1. Controle Químico.....	6
2.2.2. Controle Genético	10
2.2.3. Manejo Cultural (Vazio Sanitário)	11
2.3. CONTROLE BIOLÓGICO	12
2.3.1. Uso de <i>Penicillium</i> spp. no Controle Biológico de Fitopatógenos	15
2.3.2. Controle Biológico da FAS	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1. TESTE DE GERMINÇÃO EM PLACA.....	23
3.2. ENSAIO EM FOLHAS DESTACADAS CULTIVADAS EM PLACA DE PETRI .	24
3.3. ENSAIO EM CASA DE VEGETAÇÃO	26
3.4. ENSAIO À CAMPO.....	28
4. RESULTADO E DISCUSSÕES	32
4.1. TESTE DE GERMINÇÃO EM PLACA.....	32
4.2. ENSAIO EM FOLHAS DESTACADAS CULTIVADAS EM PLACA DE PETRI .	35
4.3. ENSAIO EM CASA DE VEGETAÇÃO	39
4.4. ENSAIO À CAMPO.....	42
4.5. ANÁLISE DAS DILUIÇÕES DOS SOBRENADANTES	44
4.6. CONSIDERAÇÕES GERAIS DOS ENSAIOS	45

5. CONCLUSÕES.....	47
---------------------------	-----------

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
--	-----------

APÊNDICES

APÊNDICE (A): TESTE DE GERMINAÇÃO EM PLACA 48 POÇOS (2).....	58
---	-----------

APÊNDICE (B): ENSAIO EM FOLHAS DESTACADAS CULTIVADAS EM PLACAS DE PETRI (2)	60
--	-----------

APÊNDICE (C): ENSAIO EM CASA DE VEGETAÇÃO	66
--	-----------

ANEXO

ANEXO (A): ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	70
--	-----------



Universidade Estadual do Norte do Paraná - UENP

Criada pela Lei Estadual nº 15.300/06 – Autorizada pelo Decreto Estadual nº 3909/08

CAMPUS LUIZ MENEGHEL
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE MESTRADO EM AGRONOMIA
BR 369 KM 54 (43) 3542-8053

1. INTRODUÇÃO

A ferrugem-asiática da soja (FAS), agente causal *Phakopsora pachyrhizi*, é atualmente a doença mais destrutiva e responsável por grandes prejuízos econômicos na cultura da soja (*Glycine max*). Somente no Brasil, houve uma perda estimada em mais de US\$ 10 bilhões nas lavouras desde o surto epidêmico da doença em 2001 (YORINORI et al., 2005). Atualmente se estima um custo médio de US\$ 2,8 bilhões por safra no Brasil (Embrapa, 2019).

Para manejo deste patógeno, destacam-se três estratégias principais: controle químico, controle genético por meio do uso de cultivares de soja resistentes à doença e manejo cultural por redução do inóculo inicial através do estabelecimento do vazio sanitário (período mínimo de 60 dias sem presença de plantas de soja).

Apesar do controle químico ser o mais utilizado e prático para o agricultor, o uso isolado e indiscriminado nos últimos anos comprometeu diretamente a eficiência dos fungicidas dos grupos DMI (inibidores da desmetilação), Qol (inibidores da quinona extracelular) e SDHI (inibidores da succinato desidrogenase) para controle da FAS devido a seleção de indivíduos mutantes do fungo adaptados a esses mecanismos de ação.

O controle biológico da FAS representa nesse sentido uma alternativa potencial para rotação ou associação com produtos químicos, embora não haja relatos de seu uso em *P. pachyrhizi*. Sistemas de controle biológico de pragas e fitopatógenos em diferentes culturas vem sendo pesquisados há mais de 30 anos. As possibilidades vão desde óleos essenciais, substâncias voláteis de plantas, nutrientes ou compostos com aplicações via solo, uso de fungos entomopatogênicos e bactérias ou de seus metabólitos ativos secundários, como micotoxinas e substâncias antibacterianas.

Microrganismos benéficos (fungos e bactérias) têm recebido atenção especial por aumentarem a produtividade das plantas, além de suprimirem doenças. Nos últimos anos, devido aos efeitos sobre as plantas usando diferentes formas de inóculos, espécies do gênero *Penicillium* vem ganhando destaque. O fungo produz ácido giberélico com capacidade de modular a produção de ácido jasmônico e ácido salicílico, fitohormônios diretamente ligados



Universidade Estadual do Norte do Paraná - UENP

Criada pela Lei Estadual nº 15.300/06 – Autorizada pelo Decreto Estadual nº 3909/08

CAMPUS LUIZ MENEGHEL
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE MESTRADO EM AGRONOMIA
BR 369 KM 54 (43) 3542-8053

com o aumento da expressão de vias de defesa vegetal. Esse conjunto pode diminuir a severidade de algumas patologias como já relatado na literatura.

O gênero *Penicillium* faz parte do grupo dos fungos promotores de crescimento de plantas, que têm como uma de suas atribuições, a indução de resistência sistêmica de plantas. Com isso, tem se destacado para o uso como agente de biocontrole. Assim como, *Fusarium*, *Trichoderma* e *Bacillus*, os quais são usados para essa finalidade, alguns autores relatam que o *Penicillium* tem alta capacidade em inibir patógenos devido à produção de algumas enzimas hidrolíticas, como pectinases e celulasas, as quais poderiam degradar a parede celular do patógeno, ocorrendo assim a inibição de seu crescimento.

Não há relatos de seu uso para controle biológico da FAS. No entanto, em ensaios de folhas destacadas de soja cultivadas em placa de Petri sob inoculação com *P. pachyrhizi*, é facilmente observável o crescimento voluntário de *Penicillium* sp. sobre as urédias em esporulação (dados não publicados) de forma a sugerir que possivelmente o *Penicillium* sp. possa manter naturalmente alguma relação biológica com *P. pachyrhizi*. Ainda, observa-se em tais situações que o crescimento do *Penicillium* sp. sobre as lesões prejudica a dispersão dos esporos de ferrugem na mesma folha, prejudicando a multiplicação do mesmo em condições de ensaio *in vitro*.

Considerando as observações sobre a ocorrência de *Penicillium* sp. nas lesões de *P. pachyrhizi* e o biocontrole como uma alternativa potencial a ser somada ao manejo da FAS, o presente trabalho teve como objetivo principal a avaliação do potencial de uso de *Penicillium* sp. como agente de controle biológico para ferrugem-asiática da soja, em aplicações preventivas, assim como, propôs-se avaliar de forma comparativa o potencial preventivo de *Penicillium* sp. em ensaios conduzidos em placas de Petri, folhas destacadas, casa de vegetação e à campo, bem como o melhor método de preparo e diluição do *Penicillium* sp. para uso nos sistemas avaliados.



Universidade Estadual do Norte do Paraná - UENP

Criada pela Lei Estadual nº 15.300/06 – Autorizada pelo Decreto Estadual nº 3909/08

CAMPUS LUIZ MENEGHEL
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE MESTRADO EM AGRONOMIA
BR 369 KM 54 (43) 3542-8053

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. CULTURA DA SOJA

A soja é uma planta originária do nordeste da China de importância econômica mundial. Chegou a Europa no século XVII, sendo inicialmente apenas mantida por curiosidade botânica, nos jardins botânicos das cortes europeias. Chegou a ser cultivada como planta forrageira nos Estados Unidos da América por volta do ano 1890. Na década de 1940 a soja chegou ao Paraguai e na década de 1950 ao México e Argentina (MANDARINO, 2017). A mesma foi trazida ao Brasil via Estados Unidos, em 1882. É uma planta que pertence ao reino Plantae, divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, ordem Fabales, família Fabaceae (Leguminosae), Subfamília Faboideae (Papilionoideae), gênero *Glycine*, espécie *Glycine max* e forma cultivada *Glycine max* (L.) Merrill. Algumas dessas espécies são originárias de regiões africanas, australianas e da Ásia oriental (SEDIYAMA, 2009).

Os primeiros estudos no Brasil foram conduzidos na Bahia, mas o desenvolvimento da cultura deu-se no Rio Grande do Sul, onde os materiais cultivados responderam melhor as condições climáticas. Considerando as grandes culturas produtoras de grãos, a soja destacou-se apresentando o maior crescimento em termos percentuais desde a década de 1970, no Brasil e no mundo. De 1970 a 2007, o crescimento da produção global de soja foi da ordem de 500% (de 44 para 220 milhões de toneladas), enquanto as produções de culturas como trigo, arroz, milho, feijão, cevada e girassol cresceram, no máximo, uma terça parte desse montante (DALL'AGNOL et al., 2010).

Atualmente como uma das principais fontes produtoras de óleo e proteína no mundo, a soja vem conquistando espaço a cada ano. A cultura alcançou na safra 2018/2019 a produção mundial de 362,070 milhões de toneladas com área plantada de 124,953 milhões de hectares (USDA, 2019). No Brasil, segundo maior produtor, a produção de soja da safra 2018/2019, foi de 115,030 milhões de toneladas em 35,874 milhões de hectares (CONAB, 2019). Para a safra 2019/2020, a DERAL (2019) estima a área plantada no Paraná de 6,003 milhões hectares e a produção de 23,403 milhões de toneladas do grão. Observa-se que a área



Universidade Estadual do Norte do Paraná - UENP

Criada pela Lei Estadual nº 15.300/06 – Autorizada pelo Decreto Estadual nº 3909/08

CAMPUS LUIZ MENEGHEL
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE MESTRADO EM AGRONOMIA
BR 369 KM 54 (43) 3542-8053

plantada tem aumentado anualmente, principalmente devido à abertura de novas fronteiras agrícolas, disponibilidade de novas tecnologias e ao retorno econômico interessante da cultura.

Apesar de todos os esforços para maximizar a produção, alguns entraves importantes têm estado presentes na cultura da soja, com atenção às doenças foliares, principalmente ferrugem-asiática da soja e doenças de final de ciclo, onerando ainda mais o cultivo e em algumas regiões, podendo torná-lo inviável (KANTOLIC; CARMONA, 2012).

2.2. FERRUGEM-ASIÁTICA DA SOJA (FAS)

A doença de maior potencial destrutivo nas lavouras de soja nos últimos anos vem sendo a ferrugem-asiática, causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* Sydow e Sydow, podendo gerar perdas de até 80% no rendimento (ROSA et al. 2015), embora HARTMAN et al. (2015) relatem que tais perdas possam chegar até 100%. Além da ferrugem-asiática, a soja pode ser atacada pela ferrugem americana causada por *Phakopsora meibomie*, sendo essa sem importância econômica (AGROLINK, 2019).

A ferrugem-asiática tem origem na Ásia, onde foi relatada pela primeira vez no Japão em 1903. Seguido da Austrália em 1934, na Índia em 1951 e no Havaí em 1994. Na sequência, a doença passou a ser descrita no Continente Africano em 1996. No Paraguai foram encontradas as primeiras áreas infectadas na América do Sul no ano de 2001. No Brasil, a doença passou a ser descrita no final da safra de 2000/2001, no estado do Paraná se disseminando para outras áreas produtoras do país (NUNES, 2016). O mesmo autor relata que a ferrugem-asiática, em novembro de 2004, foi encontrada infectando campos de soja nos Estados Unidos, relevante produtor mundial.

O fungo *Phakopsora pachyrhizi*, é um basidiomiceto, pertencente ao reino Fungi, filo Basidiomycota, classe Urediniomycetes, sub-classe Teliomycetidae, ordem Uredinales, família Phakopsoraceae e gênero *Phakopsora* (MUSSURY et al. 2012). Segundo Rupe e Sconvers (2008); Goellner, (2010), citados por Nascimento et al. (2015), o ciclo de vida da ferrugem ocorre com temperaturas ideais de 18 °C a 26,5 °C, onde uredíniosporos são



Universidade Estadual do Norte do Paraná - UENP

Criada pela Lei Estadual nº 15.300/06 – Autorizada pelo Decreto Estadual nº 3909/08

CAMPUS LUIZ MENEGHEL
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE MESTRADO EM AGRONOMIA
BR 369 KM 54 (43) 3542-8053

formados assexualmente, permanecendo num período de 5 a 8 dias na urédia, após esse tempo, por meio de um ostíolo, estes são liberados e dispersados pelo vento. Na **Figura 1** se encontra de forma ilustrativa o ciclo biológico da doença.

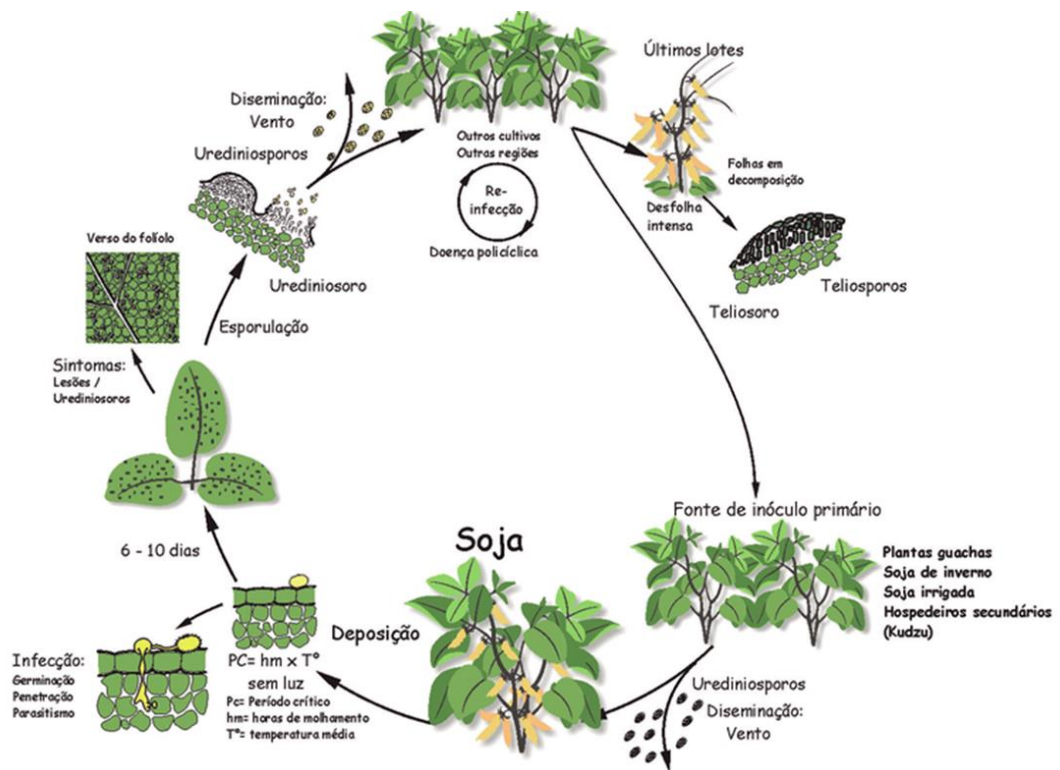


Figura 1: Ilustração do ciclo biológico da ferrugem-asiática da soja causada por *Phakopsora pachyrhizi*. Fonte: Reis e Carmona (2005) citado por Reis et al. (2006).

Os sintomas da FAS apresentam-se inicialmente como pontuações cloróticas, evoluindo para pequenas lesões de coloração variada entre o castanho e o marrom, tendendo a forma angular devido à delimitação pelas nervuras, sendo possível observar, principalmente na face abaxial das folhas, os corpos de frutificação do fungo, denominados de urédias (REIS et al., 2012; ROSA et al., 2015). As urédias, por sua vez, produzem uredósporos, esporos assexuais do fungo, caracterizados por serem leves, sendo facilmente disseminados pelo vento quando as lesões estão secas (REIS et al., 2012; ROSA et al., 2015).

Os danos podem atingir todos os órgãos verdes da planta, predominantemente as folhas, contudo observa-se que as folhas mais baixas da planta são as primeiras a serem



Universidade Estadual do Norte do Paraná - UENP

Criada pela Lei Estadual nº 15.300/06 – Autorizada pelo Decreto Estadual nº 3909/08

CAMPUS LUIZ MENEGHEL
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE MESTRADO EM AGRONOMIA
BR 369 KM 54 (43) 3542-8053

atacadas e o período do florescimento ou próximo dele consiste no mais suscetível para a infecção (REIS et al., 2012). Em estado avançado da doença, verifica-se intensa desfolha na cultura, acarretando redução na qualidade e peso dos grãos colhidos (REIS et al., 2012; ROSA et al., 2015; GODOY et al., 2018).

A presença de alta umidade e temperaturas entre 21 °C e 25 °C são ideais para a infecção pelo patógeno. Assim como as demais ferrugens, consiste em um fungo biotrófico que necessita obrigatoriamente de um hospedeiro vivo para sua sobrevivência (ROSA et al., 2015).

As condições de cultivo brasileiras contribuem diretamente para a alta incidência da patologia nos campos de soja, principalmente devido ao alto volume de precipitação na época da produção, clima tropical com altas temperaturas, sobrevivência do agente causal em diversos hospedeiros e em plantas guaxas. Como agravante a isto, a resistência ou diminuição de sensibilidade aos fungicidas disponíveis tem estado presente nas últimas safras exigindo que novas soluções sejam buscadas a fim de aumentar as ferramentas disponíveis para controle da doença (ROSA et al., 2015).

As plantas de soja respondem a infecção como suscetíveis, sobre as quais o patógeno esporula intensamente a cada ciclo, atingindo mais rapidamente elevados níveis de severidade; tolerantes, esporulam menos intensamente e consequentemente sofrem menos danos; resistentes, apresentam lesões de ferrugem escuras (*Redish brown* ou RB) resultantes da resposta de resistência de hipersensibilidade e que esporulam muito pouco; ou ainda imunes, as quais não se observam lesões (YAMANAKA et al., 2010). No campo as cultivares atualmente disponíveis comportam-se como suscetíveis, com ciclos de esporulação a cada 7-8 dias após a chegada do esporo ou tolerantes, com ciclos de esporulação a cada 8-10 dias após a infecção.

2.2.1. Controle Químico

Dentre as possibilidades de manejo da FAS, o controle químico é o de maior utilização e amplamente recomendado atualmente (REIS et al., 2012). Nesse sentido, são recomendados pelo FRAC (2019), produtos de diferentes mecanismos de ação como:



Universidade Estadual do Norte do Paraná - UENP

Criada pela Lei Estadual nº 15.300/06 – Autorizada pelo Decreto Estadual nº 3909/08

CAMPUS LUIZ MENEGHEL
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE MESTRADO EM AGRONOMIA
BR 369 KM 54 (43) 3542-8053

estrobilurinas - inibidores de respiração no complexo 3, citocromo bc1 (fungicidas QoI, código FRAC 11), ex: azoxistrobina, cresoxim-metílico, picoxistrobina, piraclostrobina, trifloxistrobina; triazóis e triazolintiona - inibidores da síntese de ergosterol (fungicidas DMI, código FRAC 03), ex: ciproconazol, difenoconazol, epoxiconazol, flutriafol, metconazol, propiconazol, protioconazol, tebuconazol, tetraconazol; e carboxamidas - inibidores de respiração no complexo 2, dehydrogenase succinato (fungicidas SDHI, código FRAC 07), ex: benzovindiflupir e fluxapirroxade.

Devido ao rápido desenvolvimento da FAS, por conta de condições favoráveis de temperatura e umidade, além de molhamento foliar contínuo pela presença de chuvas e orvalho, o uso do controle químico através de fungicidas, se tornou primordial, pois infecções fúngicas levam a redução de produtividade. Pode-se acrescentar junto ao controle químico outros manejos como nutrição, época de semeadura, espaçamento e vazio sanitário (STEFANELLO et al., 2016).

A ferrugem-asiática é muito desafiadora por ser capaz de sobreviver o ano todo na presença de um hospedeiro, ou seja, se houver condições de desenvolvimento da cultura da soja, o mesmo ocorrerá com o patógeno. Sua capacidade de resistência genética em relação aos fungicidas, revelam o quão difícil será a sustentabilidade da cultura sem a utilização de outras estratégias associadas ao controle químico (GODOY et al., 2016).

Segundo a FAOSTAT (2016), o Brasil alcançou o uso de 59.124 toneladas de ingrediente ativo (i.a.) com fungicidas, aproximadamente 18% de um total de 337.176 toneladas de i.a. de pesticidas (herbicida, inseticida, fungicida, tratamento de sementes, etc), grande quantidade em respeito ao cultivo da soja. No ano de 2015, devido ao clima favorável para ferrugem da soja, esse número chegou a 66.051 ton de i.a. de fungicidas de 395.646 ton de i.a. totais de pesticidas.

Os DMIs (grupo inibidor da desmetilação) eram amplamente usados de forma isolada em aplicações sequenciais e curativas para controlar a FAS. Essa utilização ocasionou a menor eficácia dos DMIs seis anos após a primeira detecção da ferrugem no Brasil na safra 2007/2008, associada à seleção de populações menos sensíveis do fungo, tornando-se uma tendência também para associação de DMI + QoI a partir da safra 2010/2011, como pode ser observado na **Figura 2**. Nesse mesmo período, o número de aplicações tornou-se maior devido



Universidade Estadual do Norte do Paraná - UENP

Criada pela Lei Estadual nº 15.300/06 – Autorizada pelo Decreto Estadual nº 3909/08

CAMPUS LUIZ MENEGHEL
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE MESTRADO EM AGRONOMIA
BR 369 KM 54 (43) 3542-8053

à grande quantidade de inóculo produzida nas lavouras de soja de início da estação. Os cultivos nas safras seguintes tiveram um intervalo entre aplicações reduzido com um aumento no número de aplicações, sendo duas para soja plantada precocemente, quatro para soja plantada tardia e seis para uma segunda safra de soja (GODOY et al., 2016)

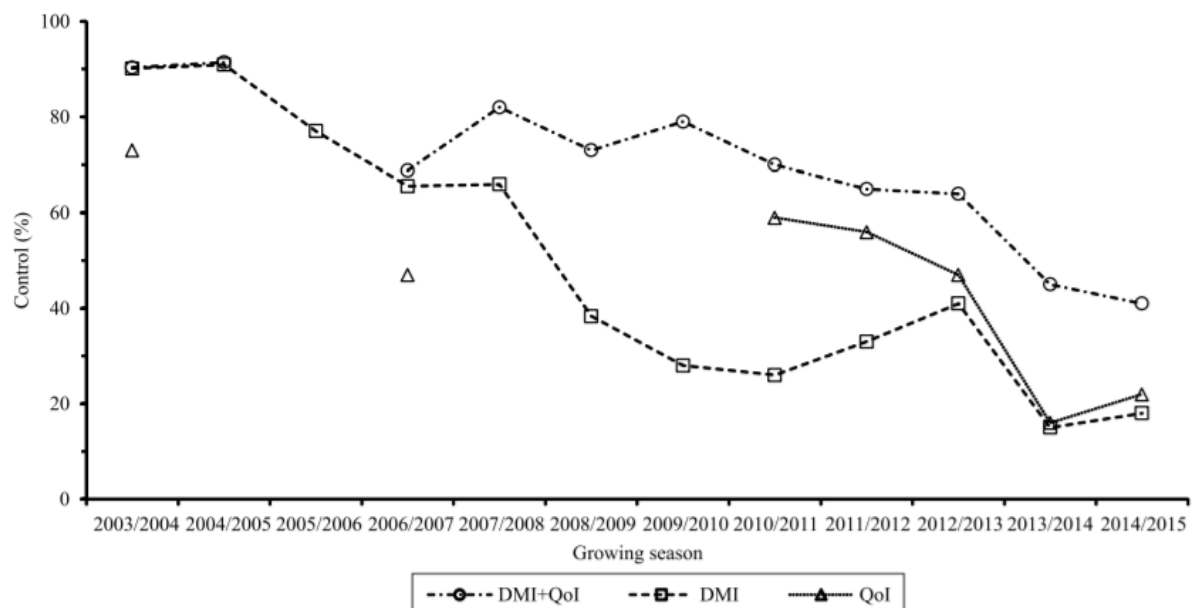


Figura 2: Porcentagem do controle da ferrugem-asiática da soja em ensaios de campo uniformes em diferentes regiões produtoras de soja no Brasil. Ensaios com DMI + QoI, ciproconazol + azoxistrobina; QoI, azoxistrobina; e DMI, tebuconazol. Fonte: Godoy et al., (2016).

Em experimentos realizados pelo Consórcio Antiferrugem, na rede nacional de ensaios padronizados e uniformes de campo (UFTs), coordenados pela Embrapa Soja e demais parceiros, no ano de 2015 esperava-se que o período sem soja reduzisse a quantidade da população de fungos menos sensíveis ao tratamento químico, mas isso não ocorreu. Constatou-se que esta população estava adaptada e continuaria a sobreviver, o que se confirmou com o resultado de eficácia de tebuconazol atingindo 18%, com três aplicações (GODOY et al., 2016).

Em ensaios conduzidos por Juliatti et al. (2017), observou-se uma redução na eficácia do controle da ferrugem-asiática com benzovindiflupir, fluxapiroxade, ciproconazol e tebuconazol em relação a gravidade da doença. Segundo os mesmos autores, fungicidas



Universidade Estadual do Norte do Paraná - UENP

Criada pela Lei Estadual nº 15.300/06 – Autorizada pelo Decreto Estadual nº 3909/08

CAMPUS LUIZ MENEGHEL
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE MESTRADO EM AGRONOMIA
BR 369 KM 54 (43) 3542-8053

multissítios (clorotalonil, oxicloreto de cobre e mancozeb) associados a estrobilurinas, triazóis e carboxamidas, podem ser utilizados no manejo da resistência da FAS.

Nas safras de 2016/2017 e 2017/2018, ensaios realizados em diversas regiões do Brasil verificaram queda na eficiência de fungicidas dos grupos DMI (inibidores da desmetilação), QoI (inibidores da quinona externa) e SDHI (inibidores da succinato desidrogenase) para controle da FAS, com atenção especial para este último, onde a maior tolerância foi atribuída à mutação do gene *sdh* (subunidade C) do fungo, não se recomendando a sua utilização mais de duas vezes na mesma safra (GODOY et al., 2017; GODOY et al., 2018). O grupo dos fungicidas SDHI foi disponibilizado no Brasil na safra de 2013/2014, apresentando resistência em pouco tempo, já na safra 2016/2017, principalmente pelo uso frequente do produto em aplicações curativas quando se verificou que possuía alto controle inicial da ferrugem-asiática (LAGENBACH et al., 2016). Isso também se deve à pressão de isolados de *P. pachyrhizi* selecionados pelo uso indiscriminado no Paraguai, país que teve a permissão de uso da carboxamida benzovindiflupir pelos produtores, quatro anos antes que o Brasil.

Godoy et al. (2018) em trabalhos com fungicidas tebuconazol (DMI), ciproconazol (DMI) e azoxistrobina (QoI), incluídos para monitorar a sensibilidade do fungo *P. pachyrhizi* em diferentes localidades, mostraram uma baixa eficiência no controle, com severidade de 78,6% na testemunha, 65,1% na azoxistrobina, 59,2% no ciproconazol e 58,7% na utilização de tebuconazol. Os dados de severidade foram utilizados na estimativa da porcentagem de controle em relação à testemunha, a mesma baixa eficiência de controle foi semelhante a safras anteriores.

Mais recentemente em junho de 2019, o FRAC (2019) fez um comunicado alertando sobre a presença de isolados de *P. pachyrhizi* coletados na safra 2018/2019 com sensibilidade reduzida a triazolintione, citando a caracterização genética de seis mutações pontuais (F120L, Y131H, Y131F, I145F, K142R, I475T) e possibilidade de outros mecanismos de resistência também estarem associados.

Além disso, a utilização excessiva de agrotóxicos no controle de doenças de plantas tem provocado muitos problemas de ordem ambiental, ocasionando um grande desequilíbrio biológico, com contaminação de alimentos, do solo, água, agricultores, além de favorecer o desenvolvimento de resistência de patógenos (BETTIOL; MORANDI, 2009). O



controle químico, apesar de ser o mais utilizado e o mais prático para o produtor, apresenta desvantagens significativas como o aumento dos custos de produção e a possibilidade de contaminação ambiental e humana (KANTOLIC; CARMONA, 2012).

2.2.2. Controle Genético

O domínio da epidemiologia das doenças, também se faz necessário para o estabelecimento das estratégias de controle, sendo que o uso de genótipos resistentes seria o ideal (VENTURA; COSTA, 2008). Langenbach et al. (2016), cita o uso de cultivares resistentes à *P. pachyrhizi* como sendo o método mais sustentável para o controle da FAS. Outro ponto relevante seria que o aumento de genótipos resistentes está diretamente associado ao menor uso de fungicidas, diminuição do custo de produção, redução da emissão de carbono e menores riscos ambientais (MALTBY et al., 2009; WIGHTWICK et al., 2010).

Contudo, com relação à FAS, essa resistência genética é de difícil alcance, devido ao aparecimento de novas raças e variabilidade genética do fungo (STEFANELLO et al., 2016). Dessa maneira, mesmo com o mapeamento dos seis genes dominantes de resistência à efetores da FAS (Rpp1-Rpp6), nenhum genótipo introgridido foi capaz, até o momento, de conferir resistência satisfatória a todos os isolados do fungo (GOELLNER et al., 2010). Isso se deve justamente a especificidade da relação gene R-avr que pode ser facilmente quebrada pela seleção a campo de mutantes virulentos principalmente quando se considera a diferença de tempo de ciclo entre a planta de soja e seu patógeno e a imensa pressão de seleção que as extensas áreas de monocultivo exercem sobre a evolução da virulência.

Outras alternativas baseadas principalmente na resistência não hospedeira e transgenia provavelmente chegarão em breve ao mercado como possibilidade mais duradoura de manutenção da resistência a ferrugem a campo, conforme texto descrito pela Embrapa Soja em junho de 2018.



Universidade Estadual do Norte do Paraná - UENP

Criada pela Lei Estadual nº 15.300/06 – Autorizada pelo Decreto Estadual nº 3909/08

CAMPUS LUIZ MENEGHEL
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE MESTRADO EM AGRONOMIA
BR 369 KM 54 (43) 3542-8053

2.2.3. Manejo Cultural

Para se desenvolver e multiplicar sem a quebra de seu ciclo de vida, o fungo causador da ferrugem-asiática necessita ter sempre um hospedeiro vivo como fonte de sobrevivência, por esta razão dizemos que ele é biotrófico. Sendo assim, entre os diferentes métodos de manejo se destaca o vazio sanitário e a calendarização da semeadura de soja são duas formas complementares de manejo da doença, que possibilitam a quebra do seu ciclo, pois sem plantas hospedeiras na entressafra, reduz-se a quantidade de uredosporos do fungo no ambiente (Embrapa Soja, 2019).

Em 2007, foi publicada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), a Instrução Normativa Número 2, de 29 de janeiro de 2007, instituindo o Programa Nacional de Controle da Ferrugem-asiática da Soja (PNCFS). Entre outras diretrizes, estabeleceu que os Estados deveriam criar seus Comitês Estaduais de Controle da FAS e as instâncias intermediárias do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária (SUASA), devendo estabelecer um calendário de semeadura de soja, com um período de, pelo menos 60 dias sem a presença de plantas cultivadas de soja ou voluntárias no campo. Atualmente treze Estados e o Distrito federal adotaram essa medida, estabelecidas por meio de Normativas, o mesmo ocorrendo no Paraguai (lá denominado de “pausa fitossanitária”), como demonstrado na **Figura 3** (Embrapa Soja, 2019).

O objetivo do vazio sanitário é reduzir a sobrevivência do fungo causador da ferrugem-asiática durante a entressafra e assim atrasar a ocorrência da doença na cultura, sendo os resultados esperados a diminuição do número de aplicações de fungicidas e a redução da pressão de seleção de resistência do fungo *P. pachyrhizi* aos fungicidas.



Universidade Estadual do Norte do Paraná - UENP

Criada pela Lei Estadual nº 15.300/06 – Autorizada pelo Decreto Estadual nº 3909/08

CAMPUS LUIZ MENEGHEL
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE MESTRADO EM AGRONOMIA
BR 369 KM 54 (43) 3542-8053

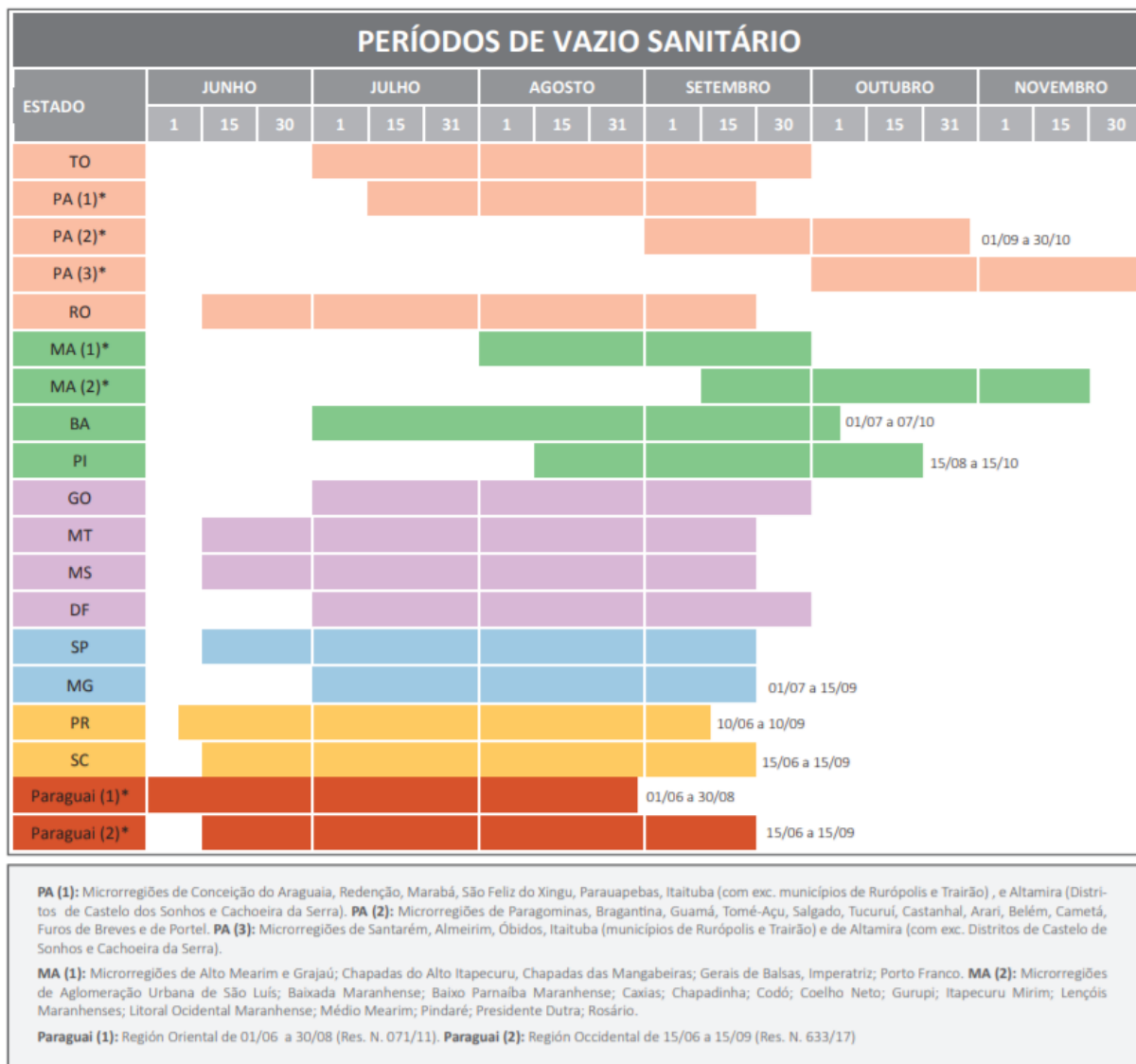


Figura 3: Períodos de Vazio Sanitário. Fonte: Embrapa Soja (2019).

2.3. CONTROLE BIOLÓGICO

Segundo Cook e Baker (1983); Bettiol, (1991), citados por Bettiol e Morandi (2009), controle biológico é a redução da soma de inóculo ou das atividades determinantes da doença, provocada por um patógeno, realizada por um ou mais organismos que não o homem,



Universidade Estadual do Norte do Paraná - UENP

Criada pela Lei Estadual nº 15.300/06 – Autorizada pelo Decreto Estadual nº 3909/08

CAMPUS LUIZ MENEGHEL
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE MESTRADO EM AGRONOMIA
BR 369 KM 54 (43) 3542-8053

podendo ser conceituado também como controle de um micro-organismo por meio de outro micro-organismo chamado de antagonista. O antagonismo pode envolver um ou mais mecanismos de ação como: antibiose, competição, parasitismo, predação, hipovirulência e indução de defesa do hospedeiro (BETTIOL, 1991).

Jaber e Ownley (2018) caracterizaram fungos entomopatogênicos com potencial endófitos que colonizam tecidos internos da planta sem causar sintomas aparentes ou danos aos tecidos do hospedeiro, podendo atuar como promotores de crescimento.

O uso de biofungicidas tem sido crescente a fim de suportar o novo sistema de produção agrícola e hortícola (LARENA et al., 2018), e para isso, diversos estudos foram realizados a fim de caracterizar os microrganismos potenciais e seus mecanismos de interação. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPR), têm sido investigadas como possíveis agentes de biocontrole para aumentar a produtividade das plantas e suprimir doenças (HANUDIN et al., 2017).

Vários mecanismos foram postulados para explicar como esses microrganismos estimulam a produtividade das plantas, podendo ser classificados como efeitos diretos ou indiretos. Os efeitos diretos no crescimento das plantas se dão pelo fornecimento de alguns compostos produzidos pelos microrganismos e que são necessários para a planta, como fitohormônios. Também promovem a absorção de alguns nutrientes. Como efeitos indiretos no crescimento das plantas inclui-se o mecanismo de defesa contra um ou mais organismos fitopatogênicos pela produção de substâncias antagonicas e/ou induzindo resistência à agentes patogênicos.

Bettiol e Morandi (2009) descrevem que os indutores de resistência em plantas a patógenos podem ser bióticos ou abióticos, podendo ser apresentados na forma de compostos químicos, extratos de células de microrganismos, filtrados de culturas ou microrganismos vivos.

O trabalho pioneiro com fungos entomopatogênicos endófitos foi conduzido com *Beauveria bassiana*, um fungo onipresente no solo que infecta uma ampla gama de diferentes insetos (>700 espécies), e é um dos bioinseticidas fúngicos mais comercializados mundialmente (JABER; OWNLEY, 2018). Em 1835, o entomologista italiano Agostino Bassi,



Universidade Estadual do Norte do Paraná - UENP

Criada pela Lei Estadual nº 15.300/06 – Autorizada pelo Decreto Estadual nº 3909/08

CAMPUS LUIZ MENEGHEL
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE MESTRADO EM AGRONOMIA
BR 369 KM 54 (43) 3542-8053

descobriu que esse fungo agia como um parasita, causando a doença muscardina que atacava e matava o domesticado bicho-da-seda (BEAUVERIA, 2019).

Os fungos promotores de crescimento de plantas endófitos possuem mecanismos que afetam diretamente patógenos de plantas por exemplo, micoparasitismo, competição, antibiose por meio da produção de metabólitos secundários fungicidas, até as interações indiretas mais complexas entre microorganismos e patógenos causadores de doenças mediadas por sua planta hospedeira mútua (por exemplo, estimulação de metabólitos secundários de plantas, promoção de crescimento das plantas e indução de resistência sistêmica). Estudos sugerem que a combinação desses mecanismos pode ser empregada pelos fungos fitopatogênicos endófitos contra patógenos (HOSSAIN et al., 2017).

Fungos promotores de crescimento em plantas dos gêneros *Fusarium*, *Penicillium*, *Phoma*, *Trichoderma* e fungos estéreis têm sido objeto de múltiplos estudos devido às suas habilidades de proteção contra uma variedade de patógenos. Nos últimos anos, *Penicillium* spp. vem sendo extensivamente testado em função de sua capacidade de exercer efeitos benéficos sobre as plantas usando diferentes formas de inóculos (HOSSAIN et al., 2017).

Existem disponíveis no mercado mundial 40 antagonistas utilizados para o controle biológico (SARGS, 2019). O primeiro relato de fitopatógeno registrado, na U. S. Environmental Protection Agency (USEPA) é de uma *Agrobacterium radiobacter* isolado K84 para o controle da galha-da-coroa no ano de 1979, Fravel (2005) citado por Lanna Filho et al. (2010).

O gênero *Trichoderma* é o fungo mais comercializado, sendo quase metade do volume de antagonistas. Deste, a espécie *Trichoderma harzianum* representa 38% dos produtos. Tem-se também produtos formulados com bactérias do gênero *Bacillus*, sendo a espécie *Bacillus subtilis* a mais comercializada com 62% do mercado. Gênero *Pseudomonas*, as espécies *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas chlororaphis* representam metade dos produtos comerciais. Para *Paecilomyces*, espécie *Paecilomyces lilacinus* é a de maior relevância (SARGS, 2019).



2.3.1. Uso de *Penicillium* spp. no Controle Biológico de Fitopatógenos

Kimati et al, (1978) descrevem *Penicillium* como sendo um gênero de fungos conidiais, saprófitas, causadores de mofos ou bolores em citrus, podridões de fruto, comum em pós-colheita. Pertence ao reino Fungi, filo Ascomycota, classe Eurotiomycetes, sub-classe Eurotiomycetidae, ordem Eurotiales, família Trichocomaceae, gênero *Penicillium* (PENICILLIUM, 2019).

O fungo *Penicillium* pode causar danos em diversas culturas tais como cítrus (BENATO et al. 2018), milho (BRITO Jr. et al. 2018), macieira (OSÓRIO et al., 2013), abacaxi (VERGIGNASSI et al. 2009) e soja (MEDEIROS et al. 2019).

Silva (2013), descreveu baseado em Raper e Thom (1949); Pitt (1979); Pitt et al. (2000) que com relação as características macroscópicas, microscópicas e fisiológicas, primeiramente foi realizada a identificação de cerca de 137 espécies de *Penicillium*, descritas no Manual of the Penicillia. Após alguns anos, foram descritas 150 espécies, acreditando-se haverem cerca de 300 espécies para o gênero e que cerca de 1.000 fenótipos diferentes ainda seriam catalogados. Em 1991, Pitt catalogou um conjunto de espécies de *Penicillium* e concluiu que cerca de 30 a 40 dessas espécies eram comuns na natureza. Por fim listou-se 225 espécies aceitas para o gênero *Penicillium*, com seus respectivos sinônimos.

Para o controle de *Penicillium* em culturas agrícolas são utilizados defensivos químicos em sementes de soja (FERREIRA et al. 2019), porém há estudos para o seu controle através de extratos vegetais em sementes de *Enterolobium contortisiliquium* (MEDEIROS et al. 2016) e ozonização para desinfecção microbiológica em grãos de milho (BRITO Jr. et al, 2018).

O gênero *Penicillium* tem grande relevância na produção de alimentos e medicamentos. Alguns autores relatam que as espécies de *Penicillium* também têm suprimido o crescimento bacteriano em vários estudos. Um conjunto muito diversificado de metabólitos ativos secundários, incluindo micotoxinas potentes (FRISVAD; SAMSON, 2004), substâncias antibacterianas (RANCIC et al., 2006; LUCAS et al., 2007) e antifúngicas (NICOLETTI et al., 2007) produzidos a partir de espécies de *Penicillium* foram identificados e tiveram suas atividades biológicas no controle de patógenos comprovada.



Universidade Estadual do Norte do Paraná - UENP

Criada pela Lei Estadual nº 15.300/06 – Autorizada pelo Decreto Estadual nº 3909/08

CAMPUS LUIZ MENEGHEL
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE MESTRADO EM AGRONOMIA
BR 369 KM 54 (43) 3542-8053

Penicillium spp., assim como *Aspergillus* spp., são fungos produtores de ácido giberélico com capacidade de modular a produção de ácido jasmônico e ácido salicílico, fitohormônios diretamente ligados com o aumento da expressão de vias de defesa vegetal, que consequentemente podem diminuir a severidade de algumas patologias (WAQAS et al., 2015). Além disso, a alta capacidade desses isolados em inibir os patógenos deve-se também à produção de algumas substâncias tóxicas e enzimas hidrolíticas, como pectinases e celulases, que podem degradar a parede celular do patógeno. A enzima celulase tem a capacidade de degradar a parede celular fúngica, que é um mecanismo importante de inibição (REETHA et al., 2014).

Os produtos à base de antibióticos são um dos mecanismos bioquímicos que regulam o antagonismo entre fungos do solo que também podem influenciar a impotência dos fungos e as propriedades supressoras de alguns solos contra patógenos de plantas (FRISVAD; SAMSON, 2004).

Hossan et al. (2017) observaram redução de mais de 40% de severidade de *Pseudomonas syringae* pv. tomato nas folhas de *Arabidopsis thaliana* quando as sementes foram inoculadas com *Penicillium viridicatum* GP15-1, demonstrando que houve indução de resistência, além de promoção ao crescimento vegetal com o aumento de massa seca e fresca.

Na cultura do feijoeiro, a utilização de preparos homeopáticos com *Penicillium* em sementes velhas de feijão, em pré-germinação, demonstraram bons resultados com relação à melhora na germinação e ao vigor das sementes (PINHEIRO et al. 2019).

O *Penicillium frequentans* W. é relatado como um agente de controle biológico (DE CAL et al., 1990) e revelou um bom potencial para o desenvolvimento como produto comercial de biocontrole contra a podridão parda do fruto de pessegueiro (GUIJARRO et al., 2006; GUIJARRO et al., 2007). Os antibióticos produzidos por *P. frequentans* são ativos contra a germinação de esporos de *Monilinia laxa*, atuando no crescimento do tubo germinativo e podem estar relacionados ao controle do patógeno (DE CAL et al., 1988). Além disso, foi demonstrado por outros autores que o fungo produz altos níveis de pectinases extracelulares após 24 h de incubação em cultura submersa (KAWANO et al., 1999).

El-Fawy et al. (2018) avaliaram a eficiência de diferentes isolados de *P. frequentans* no controle da doença da mancha de *Cercospora beticola* em beterraba



Universidade Estadual do Norte do Paraná - UENP

Criada pela Lei Estadual nº 15.300/06 – Autorizada pelo Decreto Estadual nº 3909/08

CAMPUS LUIZ MENEGHEL
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE MESTRADO EM AGRONOMIA
BR 369 KM 54 (43) 3542-8053

açucareira. Os isolados testados de *P. frequentans* foram capazes de inibir o crescimento micelial de *C. beticola*, mas variaram em sua capacidade de efeito antagônico. Os isolados com alta capacidade antagônica foram os que apresentaram maior atividade enzimática.

2.3.2. Controle Biológico da FAS

Há um grande potencial para o controle biológico da ferrugem-asiática. Resultados favoráveis de pesquisa para o controle biológico da FAS são encontrados desde à aplicação com óleos essenciais (SILVA et al., 2014; DORIGHELLO et al. 2015), substâncias voláteis de plantas (MENDGEN et al., 2006), aplicação, via solo, de silício (CRUZ et al., 2013), sacarina com água de xisto (SRIVASTAVA et al., 2011; MEHTA et al., 2015), assim como o controle por fungos, como *Verticillium psalliotae* (SAKSIRIRAT e HOPPE, 1990; ZARE e GAMS, 2001), *Sphaerellopsis filum* (YUAN et al., 1999), *Simplicillium lanosoniveum* (WARD et al., 2011; WARD et al., 2012), *Trichothecium rosae* (KUMAR; JHA, 2002) e bactérias, como *Bacillus* spp. (MENDGEN et al., 2006; DORIGHELLO et al., 2015).

Substâncias naturais, voláteis de plantas, como o farnesil-acetato, têm apresentado resultados positivos para o biocontrole da ferrugem-asiática da soja (MENDGEN et al., 2006). O mesmo é válido para o óleo de café e óleos essenciais de *Hyptis marrubioides*, *Aloysia gratissima* e *Cordia verbenacea*, que reduziram a severidade da doença sob condições de estufa e/ou campo ao suprimir a germinação de esporos *in vitro* do fungo (SILVA et al., 2014; DORIGHELLO et al., 2015). Cruz et al. (2013) verificaram que o tratamento com o indutor de resistência de plantas Acibenzolar-S-Metil ou a aplicação de silício via solo reduziu a severidade de *P. pachyrhizi* nas folhas de soja. O silício, além de criar uma barreira de penetração física quando depositada na camada subcuticular, reforça a defesa da planta (MA e YAMAJI, 2006; CRUZ et al., 2013). De forma semelhante, a aplicação de sacarina e água de xisto no solo induziram resistência à ferrugem-asiática em soja (SRIVASTAVA et al., 2011; MEHTA et al., 2015). No entanto, a relação custo-benefício e a viabilidade do biocontrole em escala de campo precisam ser determinadas para estimar o valor agrônômico real de tais abordagens (LANGENBACH et al., 2016).



Universidade Estadual do Norte do Paraná - UENP

Criada pela Lei Estadual nº 15.300/06 – Autorizada pelo Decreto Estadual nº 3909/08

CAMPUS LUIZ MENEGHEL
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE MESTRADO EM AGRONOMIA
BR 369 KM 54 (43) 3542-8053

Interações micoparasíticas entre *Verticillium psalliotae* e *P. pachyrhizi* formaram estruturas semelhantes à apressórios em possíveis locais de infecção em uredósporos, conforme relatado por Saksirirat e Hoppe (1990); Zare e Gams (2001). O fungo *S. lanosoniveum*, apesar de não ser relatado como micoparasita, foi encontrado em urédias de *P. pachyrhizi* e reduzindo significativamente o desenvolvimento da ferrugem-asiática à campo, conforme Ward et al. (2011) e Ward et al. (2012). De forma similar, Kumar e Jha (2002) observaram retração de uredósporos de *P. pachyrhizi* quando colonizados com *Trichothecium rosae*. Além disso, várias cepas de *Bacillus* spp. reduziram a gravidade da ferrugem-asiática da soja (DORIGHELLO et al., 2015).

Não foram encontrados relatos do uso de *Penicillium* spp. para controle da FAS e seus modos de utilização, abrindo possibilidade para novos estudos na área.

O manejo integrado de doenças é uma ferramenta importante para o controle de diversos patógenos em plantas, mas requer conhecimento de tecnologias de controle, com disponibilidade econômica e que sejam ecologicamente viáveis.



3. MATERIAL E MÉTODOS

O fungo *Penicillium* sp. foi originalmente obtido a partir do isolamento de colônias que se desenvolviam sobre lesões de FAS em sistema de co-cultivo nas folhas destacadas de soja nas quais objetivava-se multiplicar esporos de ferrugem (dados não publicados e comunicação pessoal da acadêmica do curso de Biologia, Larissa de Assis Carrets) no Laboratório de Biotecnologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual do Norte do Paraná (UENP), na cidade de Bandeirantes-PR. O isolamento foi realizado pela técnica de microcultivo (Fernandez, 1993) de um único esporo produzindo um isolado monospórico de *Penicillium* sp. O isolado foi observado ao microscópio óptico binocular com aumento de 400x, para identificação (**Figura 4**). A espécie de *Penicillium* foi identificada pelo sequenciamento das regiões ITS1 e ITS4 (White et al., 1990) com posterior alinhamento no banco de dados público do NCBI e o resultado desta análise permanece confidencial por interesse de patenteamento.

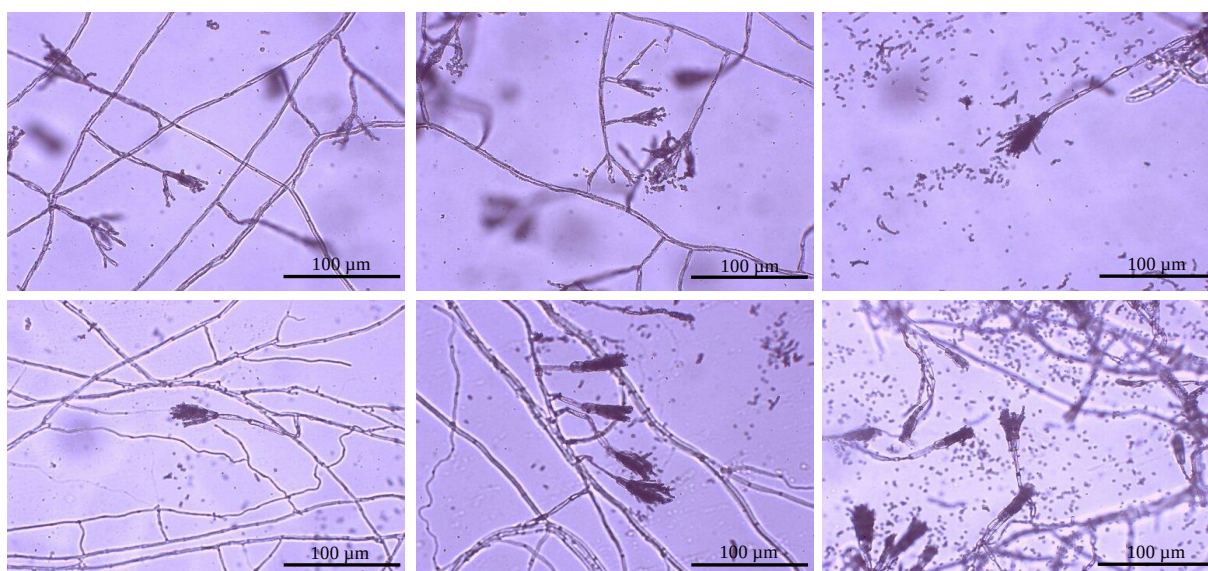


Figura 4: Imagens do isolado de *Penicillium* sp. no microscópio óptico binocular com aumento aproximado de 400x (Fonte: CARRETS, L. de A., 2018).



Universidade Estadual do Norte do Paraná - UENP

Criada pela Lei Estadual nº 15.300/06 – Autorizada pelo Decreto Estadual nº 3909/08

CAMPUS LUIZ MENEGHEL
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE MESTRADO EM AGRONOMIA
BR 369 KM 54 (43) 3542-8053

Os experimentos foram realizados em etapas distintas para caracterização de níveis de controle da FAS pelo fungo *Penicillium* sp. em diferentes situações, sendo: (1) teste de germinação de esporos da ferrugem em placas de Petri e placas de cultivo de células em poços fundos (três ensaios); (2) folhas destacadas de soja cultivadas em placas de Petri (dois ensaios); (3) plantas de soja cultivadas em vasos na casa de vegetação (um ensaio); e (4) plantas de soja cultivadas sob condições de campo (um ensaio).

Foram utilizados diferentes métodos de preparo de *Penicillium* sp. nos testes, sendo: (1) inoculação da suspensão de esporos em água destilada autoclavada na concentração de 1.10^5 esporos.mL⁻¹, com adição de dispersante Tween 20 (0,01%); os demais tendo como base para produção de inóculo meio de cultivo líquido, obtido após crescimento por 72 horas sob constante agitação em Erlenmeyer de 250 mL, contendo 80 mL de meio BD (batata e dextrose) e 1 mL da suspensão de esporos (SE) de *Pencillium* sp. na concentração de 1.10^5 esporos.mL⁻¹. Após crescimento o meio foi centrifugado a 4.000 rpm em tubo Falcon de 15 mL por 25 minutos e o sobrenadante foi coletado para utilização como: (2) sobrenadante (S); (3) sobrenadante filtrado em membrana PES de 0,22 µm (SF); e (4) sobrenadante filtrado em membrana PES de 0,22 µm e autoclavado (SFA). A **Figura 5** traz a representação esquemática dos procedimentos para obtenção dos inóculos utilizados nos tratamentos.

As proporções das diluições utilizadas para compor os tratamentos dos testes 3 a 6 foram: D1 = 1:5, sendo 1 parte do sobrenadante para 4 partes de água destilada autoclavada; D2 = 1:10, sendo 1 parte do sobrenadante para 9 partes de água destilada autoclavada; D3 = 1:100, sendo 1 parte do sobrenadante para 99 partes de água destilada autoclavada; e D4 = 1:1000, sendo 1 parte do sobrenadante para 999 partes de água destilada autoclavada (**Tabela 1**). Contudo, houve variações nos tratamentos empregados em cada ensaio realizado, os quais são descritos nos subtópicos subsequentes. Isso se deve pelos testes terem se iniciado pelo ensaio em placa de Petri, onde foi percebida a necessidade de repetição com uso de outro recipiente para aferição dos resultados, sendo dessa forma repetido em placa de cultivo de células de poços com fundo chato para leitura com microscópio invertido com câmera fotográfica. Com base nos resultados prévios dos ensaios de placa, foi conduzido o ensaio à campo, pois a safra 2018/2019 já se encontrava instalada e na fase de aplicação. Para este ensaio foram excluídos os tratamentos com sobrenadante autoclavado para reduzir a complexidade de



Universidade Estadual do Norte do Paraná - UENP

Criada pela Lei Estadual nº 15.300/06 – Autorizada pelo Decreto Estadual nº 3909/08

CAMPUS LUIZ MENEGHEL
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE MESTRADO EM AGRONOMIA
BR 369 KM 54 (43) 3542-8053

preparo e aplicação no campo. Em paralelo a essa etapa, foi realizado o ensaio em casa de vegetação, onde se acrescentou a diluição de 1:5 nos diferentes sobrenadantes de *Penicillium* sp. uma vez que os ensaios *in vitro* já indicavam que a menor diluição utilizada havia apresentado resultados mais significativos de controle. Após obtidos os resultados do ensaio conduzido na casa de vegetação foram instalados os dois ensaios de folhas destacadas, já com inclusão da diluição 1:5. Por fim foi repetido o ensaio de placa para inclusão da diluição de 1:5.

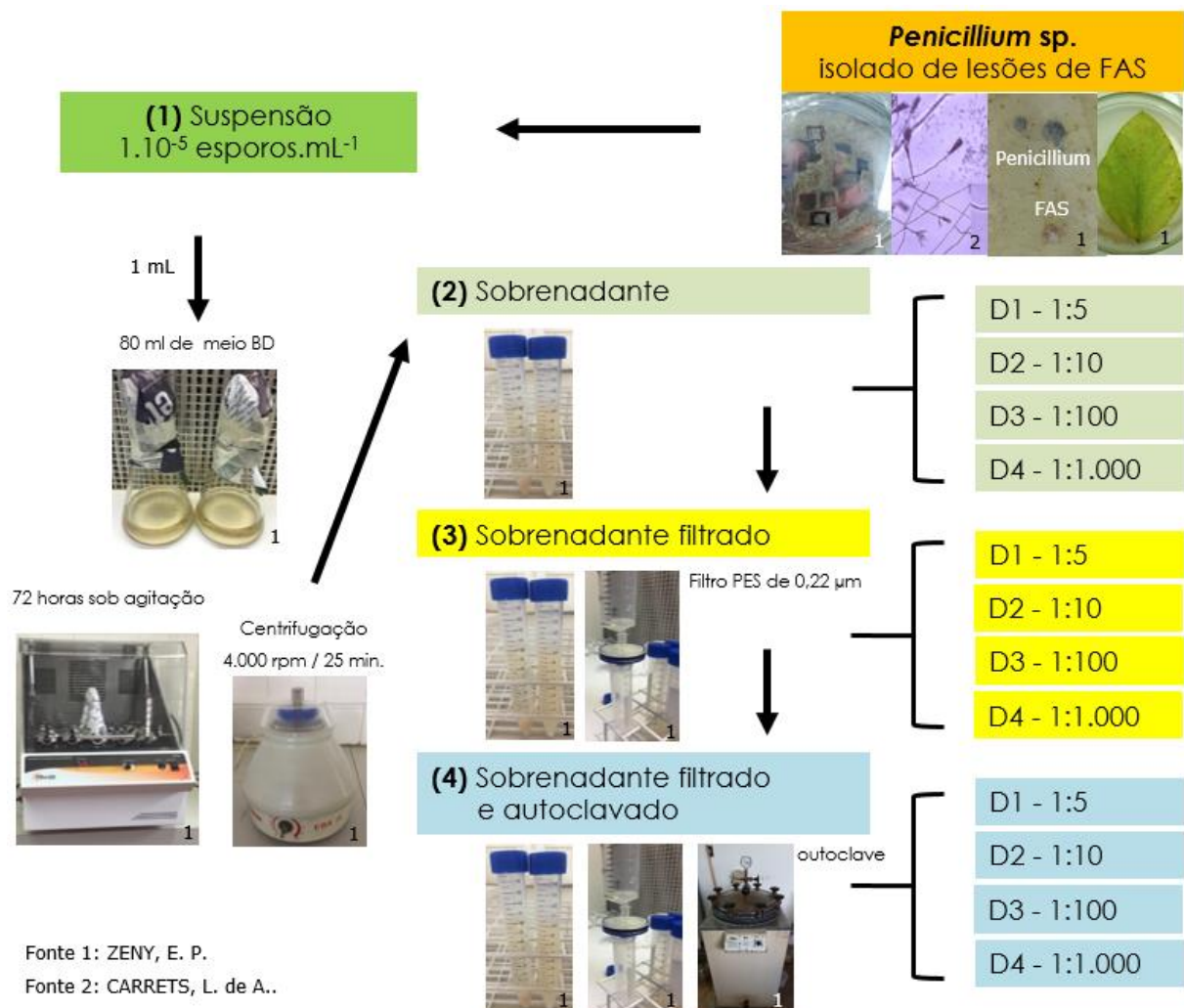


Figura 5: Representação esquemática dos procedimentos para obtenção de inóculo dos tratamentos.



Universidade Estadual do Norte do Paraná - UENP

Criada pela Lei Estadual nº 15.300/06 – Autorizada pelo Decreto Estadual nº 3909/08

CAMPUS LUIZ MENEGHEL
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE MESTRADO EM AGRONOMIA
BR 369 KM 54 (43) 3542-8053

Tabela 1: Descrição dos tratamentos e diluições de *Penicillium* sp. utilizados nos ensaios.

Tratamentos		Diluições
1	Testemunha (água destilada autoclavada)	---
2	Suspensão de esporos (1.10^5 esporos.mL ⁻¹)	---
3	Sobrenadante (S) D1	1:5
4	D2	1:10
5	D3	1:100
6	D4	1:1000
7	Sobrenadante filtrado (SF) D1	1:5
8	D2	1:10
9	D3	1:100
10	D4	1:1000
11	Sobrenadante filtrado e autoclavado (SFA) D1	1:5
12	D2	1:10
13	D3	1:100
14	D4	1:1000
15	Status®	0,5:100

Como padrão de comparação para verificação de nível de controle da FAS foi utilizado uma testemunha absoluta e um tratamento químico com o produto Status® (0,588 kg L⁻¹ de oxicleto de cobre) na diluição de 0,5:100, sendo 0,5 parte do produto para 99,5 partes de água destilada autoclavada.

Os esporos de *P. pachyrhizi* utilizados nos ensaios foram oriundos de coletas no campo na região de Ponta Grossa-PR, ano safra 2018/2019, e armazenados em ultra freezer a -80 °C. Para as inoculações foi utilizada uma suspensão de esporos de *P. pachyrhizi* em água destilada autoclavada na concentração de 1.10^5 esporos.mL⁻¹, com adição de dispersante Tween 20 (0,01%).

Para obtenção da % de controle, os dados dos tratamentos com os diferentes métodos de preparo do *Penicillium* sp. e com Status® foram comparados com a testemunha. Para os diferentes sobrenadantes do *Penicillium* sp., foi utilizado apenas a diluição de 1:10 por ser comum em todos os ensaios realizados.

Os parâmetros avaliados (% de esporos de *P. pachyrhizi* germinados e AACPD) e os dados convertidos em % de controle foram submetidos aos testes de Hartley, para verificação da homocedasticidade das variâncias, e Shapiro-Wilk, para examinar a normalidade dos dados. As médias dos tratamentos foram submetidas à análise de variância pelo teste de



Universidade Estadual do Norte do Paraná - UENP

Criada pela Lei Estadual nº 15.300/06 – Autorizada pelo Decreto Estadual nº 3909/08

CAMPUS LUIZ MENEGHEL
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE MESTRADO EM AGRONOMIA
BR 369 KM 54 (43) 3542-8053

Fisher-Snedecor e comparadas pelo teste de Duncan, pelo software SASM – Agri. Para as doses optou-se pela regressão polinomial, com um grau de confiança superior a 95% de probabilidade.

3.1. TESTE DE GERMINAÇÃO EM PLACA

No total foram realizados três ensaios independentes nessa etapa, conduzidos no Laboratório de Biotecnologia do Centro de Ciências Biológicas da UENP, na cidade de Bandeirantes-PR. Tais ensaios tiveram como parâmetro avaliado a porcentagem de esporos de *P. pachyrhizi* germinados em placa de Petri e placa de cultivo de células de 48 poços fundo chato. Previamente em cada placa/poço foi adicionado meio Água-Agar a 1% e posteriormente adicionado a suspensão de *P. pachyrhizi* na concentração de 1×10^5 esporos.mL⁻¹ juntamente com os diferentes métodos de preparo do *Penicillium* sp. e suas diluições. A montagem dos ensaios ocorreu em: 12 de janeiro de 2019 para o ensaio em placa de Petri; 01 de fevereiro de 2019 para o ensaio em placa 48 poços (1); e 18 de junho de 2019 para o ensaio em placa 48 poços (2). O volume utilizado na placa de Petri foi de 400 µL, sendo 200 µL da suspensão de *P. pachyrhizi* e 200 µL do respectivo inóculo do *Penicillium* sp. Já nas placas de 48 poços, cada poço recebeu 20 µL, sendo 10 µL da suspensão de *P. pachyrhizi* e 10 µL do respectivo inóculo do *Penicillium* sp. Na testemunha foi adicionado apenas água destilada autoclavada e no padrão químico de comparação o Status® na diluição de 0,5:100, ambos nos mesmos volumes anteriores (**Tabela 2**).

As placas foram acondicionadas em BOD, de forma aleatória, na temperatura de 24 °C, sem luz, e as leituras foram realizadas no dia seguinte à inoculação com aproximadamente 12 horas de incubação (over-night). Para a visualização dos esporos de *P. pachyrhizi* germinados foi utilizado, no ensaio em placa de Petri, microscópio óptico binocular com aumento de 100x e nos ensaios com placa de 48 poços, microscópio invertido com câmera fotográfica, onde foi possível contar com maior eficiência e acurácia o número de esporos germinados a partir das imagens obtidas no aumento de 100x. Foi considerado esporo germinado aqueles nos quais o comprimento do tubo germinativo era o dobro do tamanho do



Universidade Estadual do Norte do Paraná - UENP

Criada pela Lei Estadual nº 15.300/06 – Autorizada pelo Decreto Estadual nº 3909/08

CAMPUS LUIZ MENEGHEL
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE MESTRADO EM AGRONOMIA
BR 369 KM 54 (43) 3542-8053

esporo de *P. pachyrhizi* e os valores foram representados em porcentagem de esporos germinados.

Tabela 2: Tratamentos utilizados nos ensaios de placa.

Tratamentos		Placa de Petri (5 repetições)	Placa 48 poços (1) (5 repetições)	Placa 48 poços (2) (5 repetições)
1	Testemunha	sim	sim	sim
2	Suspensão de esporos	sim	sim	sim
3	S ¹ - D1	não	não	sim
4	D2	sim	sim	sim
5	D3	sim	sim	sim
6	D4	sim	sim	sim
7	SF ² - D1	não	não	sim
8	D2	sim	sim	sim
9	D3	sim	sim	sim
10	D4	sim	sim	sim
11	SFA ³ - D1	não	não	sim
12	D2	sim	sim	sim
13	D3	sim	sim	sim
14	D4	sim	sim	sim
15	Status [®]	sim	sim	sim

¹ S: Sobrenadante;

² SF: Sobrenadante e filtrado; e

³ SFA: Sobrenadante, filtrado e autoclavado.

3.2. ENSAIO EM FOLHAS DESTACADAS CULTIVADAS EM PLACAS DE PETRI

No total foram realizados dois ensaios nessa etapa, ambos conduzidos no Laboratório de Biotecnologia do Centro de Ciências Biológicas da UENP, na cidade de Bandeirantes-PR. Esses consistiram na verificação da quantidade de lesões de FAS em folhas destacadas de soja cultivadas individualmente ou em dupla em placas de Petri contendo meio Água-Agar a 1%. A cultivar utilizada foi a M 5917 Ipro e as plantas foram cultivadas em vasos de cinco litros com oito plantas em cada vaso, sob regime de irrigação, substrato e adubação adequados ao bom desenvolvimento da cultura. Esses foram acondicionados em casa de vegetação isenta da presença da FAS. As folhas coletadas eram provenientes do terceiro trifólio



Universidade Estadual do Norte do Paraná - UENP

Criada pela Lei Estadual nº 15.300/06 – Autorizada pelo Decreto Estadual nº 3909/08

CAMPUS LUIZ MENEGHEL
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE MESTRADO EM AGRONOMIA
BR 369 KM 54 (43) 3542-8053

emitido de cada planta quando as mesmas se encontravam com quatro a seis trifólios totalmente emitidos. Previamente a montagem das placas de Petri, as folhas passaram por lavagem em água corrente, seguida de imersão em solução de ácido acético a 2,5% (v/v) por 15 minutos e então deixadas em água destilada, para enxague, até a montagem das placas.

Na montagem as folhas foram colocadas com a parte superior em contato com o meio Água-Agar de forma individual no ensaio (1) e em duplas no ensaio (2). Para manutenção da umidade do meio e garantir a longevidade das folhas, foi colocado uma pequena porção de algodão que era umedecido com água destilada autoclavada a cada dois dias.

A aplicação dos tratamentos com *Penicillium* sp. e posterior inoculação dos esporos de *P. pachyrhizi* foram realizadas utilizando um borrifador plástico, previamente esterilizado. Utilizou-se a suspensão de esporos de *P. pachyrhizi* na concentração de 1×10^5 esporos.mL⁻¹ em todos os tratamentos. Na testemunha foi borrifado primeiramente apenas água destilada autoclavada e na sequência inoculada a FAS. No padrão químico primeiramente foi borrifada suspensão de Status® (diluição de 0,5:100) e na sequência inoculada a FAS.

Nesses dois ensaios foi acrescentado um tratamento “falso inoculado” no qual foi borrifado apenas água destilada autoclavada duas vezes servindo para confirmação que não havia presença de FAS nas folhas utilizadas. Na **Tabela 3** consta os tratamentos utilizados em cada ensaio de folhas destacadas.

Após o término das aplicações e inoculação da FAS as placas com as folhas foram acondicionadas de forma aleatória em BOD na temperatura de 20 °C, sem luz, por aproximadamente 12 horas (over night) e então com luz até o término das avaliações. No total foram utilizadas 240 folhas, sendo 80 no ensaio (1) e 160 no ensaio (2). Em cada avaliação realizada, as placas eram mudadas de local na BOD com nova aleatorização.

As avaliações foram realizadas com auxílio de estereomicroscópio com iluminação e aumento de 10x e se iniciaram com o aparecimento das primeiras urédias de *P. pachyrhizi*, sendo: ensaio (1) data de montagem em 19 de abril de 2019 e início das avaliações com 12 dias após a inoculação, onde se realizaram sete avaliações com intervalos de dois dias entre elas, as quais consistiram na contagem do número de lesões por folha; e ensaio (2) data de montagem em 14 de junho de 2019 e início das avaliações com nove dias após a inoculação, onde se realizaram sete avaliações com intervalos de três dias entre elas, as quais



Universidade Estadual do Norte do Paraná - UENP

Criada pela Lei Estadual nº 15.300/06 – Autorizada pelo Decreto Estadual nº 3909/08

CAMPUS LUIZ MENEGHEL
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE MESTRADO EM AGRONOMIA
BR 369 KM 54 (43) 3542-8053

consistiram na verificação da % de severidade da FAS, conforme escala diagramática para avaliação de *P. pachyrhizi* (GODOY et al., 2006). No total 480 folhas foram avaliadas considerando os ensaios 1 e 2.

Tabela 3: Tratamentos utilizados nos ensaios de folhas destacadas.

Tratamentos	Folhas destacadas (1) (5 repetições)	Folhas destacadas (2) (5 repetições)
1 Testemunha	sim	sim
2 Suspensão de esporos	sim	sim
3 S ¹ - D1	sim	sim
4 D2	sim	sim
5 D3	sim	sim
6 D4	sim	sim
7 SF ² - D1	sim	sim
8 D2	sim	sim
9 D3	sim	sim
10 D4	sim	sim
11 SFA ³ - D1	sim	sim
12 D2	sim	sim
13 D3	sim	sim
14 D4	sim	sim
15 Status [®]	sim	sim
- Falso inoculado	sim	sim

¹ S: Sobrenadante;

² SF: Sobrenadante filtrado; e

³ SFA: Sobrenadante filtrado e autoclavado.

Com base nos valores encontrados, em ambos os ensaios, foi calculada a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), para representação dos dados.

3.3. ENSAIO EM CASA DE VEGETAÇÃO

Nessa etapa foi realizado um ensaio, conduzido na Casa de Vegetação do Centro de Ciências Biológicas da UENP, na cidade de Bandeirantes-PR. Tal ensaio teve como objetivo mensurar a quantidade de lesões de *P. pachyrhizi* em folhas de soja da cultivar



Universidade Estadual do Norte do Paraná - UENP

Criada pela Lei Estadual nº 15.300/06 – Autorizada pelo Decreto Estadual nº 3909/08

CAMPUS LUIZ MENEGHEL
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE MESTRADO EM AGRONOMIA
BR 369 KM 54 (43) 3542-8053

M 5917 Ipro cultivadas em vasos de cinco litros com oito plantas em cada vaso, sob regime de irrigação, substrato e adubação adequados ao bom desenvolvimento da cultura.

As aplicações dos tratamentos e inoculações da FAS foram realizadas da mesma forma que nos ensaios anteriores com folhas destacada, utilizando borrifador plástico, simulando a melhor cobertura possível do dossel de folhas das plantas sem escorrimento, sob condições de temperatura abaixo de 30 °C, umidade relativa do ar acima de 50%, vento praticamente nulo e no final da tarde. Após a inoculação da ferrugem, as plantas foram cobertas com saco plástico umedecido, para favorecer a germinação dos esporos, sendo os sacos removidos apenas na manhã do dia seguinte. Nesse ensaio foram realizadas duas aplicações de *Penicillium* sp. com intervalo de 18 dias, sendo: aplicação A na data de 19 de fevereiro de 2019, quando as plantas se encontravam no estágio V6 a V8; e aplicação B na data de 09 de março de 2019, com as plantas em pleno florescimento (estádio R2) e com lesões em sua maioria com urédias fechadas ainda, ou seja, não esporulando. Na **Tabela 4** são apresentados os tratamentos utilizados no ensaio em casa de vegetação.

Tabela 4: Tratamentos utilizados no ensaio em casa de vegetação.

Tratamentos	Casa de vegetação (5 repetições)
1 Testemunha	sim
2 Suspensão de esporos	sim
3 S ¹ - D1	sim
4 D2	sim
5 D3	sim
6 D4	sim
7 SF ² - D1	sim
8 D2	sim
9 D3	sim
10 D4	sim
11 SFA ³ - D1	sim
12 D2	sim
13 D3	sim
14 D4	sim
15 Status [®]	sim

¹ S: Sobrenadante;

² SF: Sobrenadante filtrado; e

³ SFA: Sobrenadante filtrado e autoclavado.



Universidade Estadual do Norte do Paraná - UENP

Criada pela Lei Estadual nº 15.300/06 – Autorizada pelo Decreto Estadual nº 3909/08

CAMPUS LUIZ MENEGHEL
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE MESTRADO EM AGRONOMIA
BR 369 KM 54 (43) 3542-8053

Nesse ensaio foram realizadas um total de quatro avaliações, as quais consistiram da contagem do número de lesões de *P. pachyrhizi* por trifólio com auxílio de lupa de mão com aumento de 30x, sendo: a primeira na visualização das primeiras urédias de *P. pachyrhizi*, 11 dias após a aplicação/inoculação A; a segunda com 18 dias, quando se realizou a aplicação/inoculação B; a terceira com 29 dias; e a quarta 36 dias após o estabelecimento do experimento.

O ensaio contou com um total de 30 vasos, sendo dois vasos de oito plantas cada por tratamento. Considerando quatro plantas por repetição, onde foram avaliados quatro trifólios (12 folhas) do terço médio, totalizando 900 folhas avaliadas. A disposição dos vasos foi em blocos totalmente aleatorizados dentro da casa de vegetação e nova aleatorização a cada avaliação realizada.

Com base nos valores encontrados nas quatro avaliações, foi calculada a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para representação dos dados.

3.4. ENSAIO À CAMPO

Nessa etapa foi realizado um ensaio, conduzido na Fazenda Escola Capão da Onça da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), na cidade de Ponta Grossa-PR. Esse se constituiu na verificação da % de severidade da FAS nas parcelas. A cultivar utilizada foi a BS 2606 Ipro, sob condições climáticas naturais da safra 2018/2019. Para este ensaio não foi realizada inoculação artificial da *P. pachyrhizi*, considerando que a ocorrência de ferrugem na região foi alta (causando impactos consideráveis na produtividade) e simulando a mesma pressão de doença de lavouras comerciais de soja.

Durante o ensaio foram realizadas quatro aplicações para controle da FAS, sendo duas de produtos químicos registrados e duas dos tratamentos propostos, de forma intercalada com diferentes intervalos entre elas, sendo: aplicação A na data de 10 de janeiro de 2019, quando as plantas atingiram o estágio de V8 (em todos os tratamentos), com os produtos químicos Orkestra® SC (0,167 kg L⁻¹ de fluxapiroxade + 0,33 kg L⁻¹ de piraclostrobina) + Status® (0,588 kg L⁻¹ de oxicloreto de cobre) + Assist® (0,756 kg L⁻¹ de óleo mineral) nas doses



Universidade Estadual do Norte do Paraná - UENP

Criada pela Lei Estadual nº 15.300/06 – Autorizada pelo Decreto Estadual nº 3909/08

CAMPUS LUIZ MENEGHEL
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE MESTRADO EM AGRONOMIA
BR 369 KM 54 (43) 3542-8053

de $0,35 + 0,5 + 0,5 \text{ L ha}^{-1}$, respectivamente; aplicação B: após 14 dias da aplicação A com os tratamentos propostos no ensaio; aplicação C 12 dias após aplicação B, novamente em todos os tratamentos do ensaio, com os produtos químicos Fox[®] ($0,150 \text{ kg L}^{-1}$ de trifloxistrobina + $0,175 \text{ kg L}^{-1}$ de protriocanazol) + Aureo[®] ($0,720 \text{ kg L}^{-1}$ de éster metílico de óleo de soja) nas doses de $0,4 + 0,25 \text{ L ha}^{-1}$, respectivamente; e aplicação D após 14 dias da aplicação C com mesmos tratamentos propostos na aplicação B. Na **Tabela 5** consta os tratamentos utilizados no ensaio à campo.

Tabela 5: Tratamentos utilizados no ensaio à campo.

Tratamentos	Campo (4 repetições)
1 Testemunha	sim
2 Suspensão de esporos	sim
3 S ¹ - D1	não
4 D2	sim
5 D3	sim
6 D4	sim
7 SF ² - D1	não
8 D2	sim
9 D3	sim
10 D4	sim
11 SFA ³ - D1	não
12 D2	não
13 D3	não
14 D4	não
15 Status [®]	sim

¹ S: Sobrenadante;

² SF: Sobrenadante filtrado; e

³ SFA: Sobrenadante filtrado e autoclavado.

Para as aplicações A e C foi utilizado equipamento tratorizado, equipado com filtros malha 100 e pontas de pulverização da marca Teejet modelo TT11002-VP, com vazão de 200 L ha^{-1} . Nas aplicações B e D foi utilizado equipamento costal de pressão continua (pressurizado por CO₂), equipado com pontas de pulverização da marca Magno modelo AD11002D, com vazão de 200 L ha^{-1} , realizadas no início da noite (sem incidência de raios solares) visando a maior viabilidade do agente biológico *Penicillium* sp. Na **Tabela 6** consta os dados climáticos coletados no momento das aplicações.



Universidade Estadual do Norte do Paraná - UENP

Criada pela Lei Estadual nº 15.300/06 – Autorizada pelo Decreto Estadual nº 3909/08

CAMPUS LUIZ MENEGHEL
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE MESTRADO EM AGRONOMIA
BR 369 KM 54 (43) 3542-8053

Tabela 6: Dados climáticos coletados no momento das aplicações do ensaio à campo.

Data	Aplic.	Estádio cultura	Temperatura ar (°C)	% umidade relativa	Vento (km h ⁻¹)	Hora aplicação
10-jan-19	A	V8 – V9	27,4	68,8	4,7	12:45 as 12:55
24-jan-19	B	R3	23,3	79,6	3,1	20:40 as 21:15
05-fev-19	C	R5.2	16,1	91,0	8,9	8:20 as 8:30
19-fev-19	D	R5.4	20,5	88,5	3,2	20:00 as 20:30

As parcelas do ensaio foram compostas por quatro repetições de 10 m² cada (cinco linhas, espaçadas em 50 cm e com quatro metros de comprimento), tendo 4,5 m² de área útil (três linhas centrais com três metros), restante da área foi considerada bordadura (linhas laterais e 50 cm no início e final da parcela), portanto área total utilizada pelo ensaio foi de 360 m². Conduzido em delineamento de blocos totalmente aleatorizados. Na **Tabela 7** está representado os tratamentos culturais utilizados no ensaio à campo.

Tabela 7: Tratamentos culturais utilizados no ensaio à campo.

Data	Trato cultural	Produto ¹	Dose ha ⁻¹
---	cultura anterior	aveia preta	---
03-nov-18	dessecação	Roundup Transorb R [®] + Heat [®] + Avatar [®]	2,0 L + 50 g + 0,8 L
13-nov-18	trat. sementes	Standak [®] Top	0,1 L
13-nov-18	semeadura	BS 2606 Ipro	---
20-nov-18	emergência	---	320.000 plantas
06-dez-18	pós-emergente	Roundup Transorb R [®] + Vezir [®] 100 + Assist [®]	2,0 L + 0,5 L + 0,5L
06-dez-18	inseticida	Pirate [®]	0,8 L
02-jan-19	pós-emergente	Roundup Transorb R [®]	1,5 L
02-jan-19	inseticida	Pirate [®]	0,8 L
21-jan-19	inseticida	Engeo Pleno [®] + Pirate [®]	0,25 L + 0,8L

¹Roundup TransorbR[®] (0,588 kg L⁻¹ de glifosato sal de potássio); Heat[®] (0,7 kg kg⁻¹ de saflufenacil); Avatar[®] (0,15 kg L⁻¹ de indoxacarbe); Standak[®] Top (0,025 kg L⁻¹ de piraclostrobina + 0,225 kg L⁻¹ de tiofanato-metílico + 0,25 kg L⁻¹ de fipronil); Vezir[®] 100 (0,106 kg L⁻¹ de imazetapir); Assist[®] (0,756 kg L⁻¹ de óleo mineral); e Engeo Pleno[®] (0,141 kg L⁻¹ de tiamectoxam + 0,106 kg L⁻¹ de lambda-cialotrina).



Universidade Estadual do Norte do Paraná - UENP

Criada pela Lei Estadual nº 15.300/06 – Autorizada pelo Decreto Estadual nº 3909/08

CAMPUS LUIZ MENEGHEL
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE MESTRADO EM AGRONOMIA
BR 369 KM 54 (43) 3542-8053

No ensaio foi realizado um total de seis avaliações as quais consistiram na verificação da % de severidade da FAS de forma visual, conforme escala diagramática para avaliação de *P. pachyrhizi* (GODOY et al., 2006), sendo: primeira no momento da aplicação C; segunda oito dias após aplicação C; terceira no momento da aplicação D; quarta sete dias após a aplicação D; quinta 14 dias após a aplicação D; e sexta 21 dias após a aplicação D.

Com base nos valores encontrados nas seis avaliações, foi calculada a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para representação dos dados.



4. RESULTADO E DISCUSSÕES

O teste de Hartley apontou a homocedasticidade das variâncias e Shapiro-Wilk confirmou a normalidade dos dados, para todas as variáveis estudadas. Portanto, não foi necessária a transformação dos valores para aplicação da análise de variância nos dados resultantes dos ensaios realizados.

4.1. TESTE DE GERMINAÇÃO EM PLACA

Com o objetivo de identificar se havia diferença entre os métodos de preparo Suspensão de esporos, S, SF e SFA do *Penicillium* sp., os dados de % de esporos de *P. pachyrhizi* germinados dos ensaios em placa de Petri e em placa 48 poços para as diferentes diluições foram agrupados formando médias por método de aplicação. (**Tabela 8**).

Tabela 8: Porcentagem de esporos de *P. pachyrhizi* germinados nos testes de germinação em placa de Petri e em placa de 48 poços sob diferentes métodos de preparo do *Penicillium* sp.

Tratamentos		Placa de Petri	Placa 48 poços (1)	Placa 48 poços (2)	Média ensaios placa
		AACPD			
1	Testemunha	26,0 a ¹	21,3 a	12,7 a	19,9 a
2	Suspensão de esporos	15,9 b	21,2 b	6,8 e	14,6 b
3 - 6	S ²	15,5 b	17,9 c	10,7 b	14,7 b
7 - 10	SF ³	10,7 c	14,9 c	7,9 d	11,1 c
11 - 14	SFA ⁴	9,5 c	14,3 d	8,7 c	10,8 c
15	Status [®]	0,5 d	0,1 e	0,2 f	0,3 d
Coeficiente de variação (%)		17,8	2,6	7,4	8,4

¹ Médias seguidas com a mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Duncan ($P > 0,05$);

² S: sobrenadante;

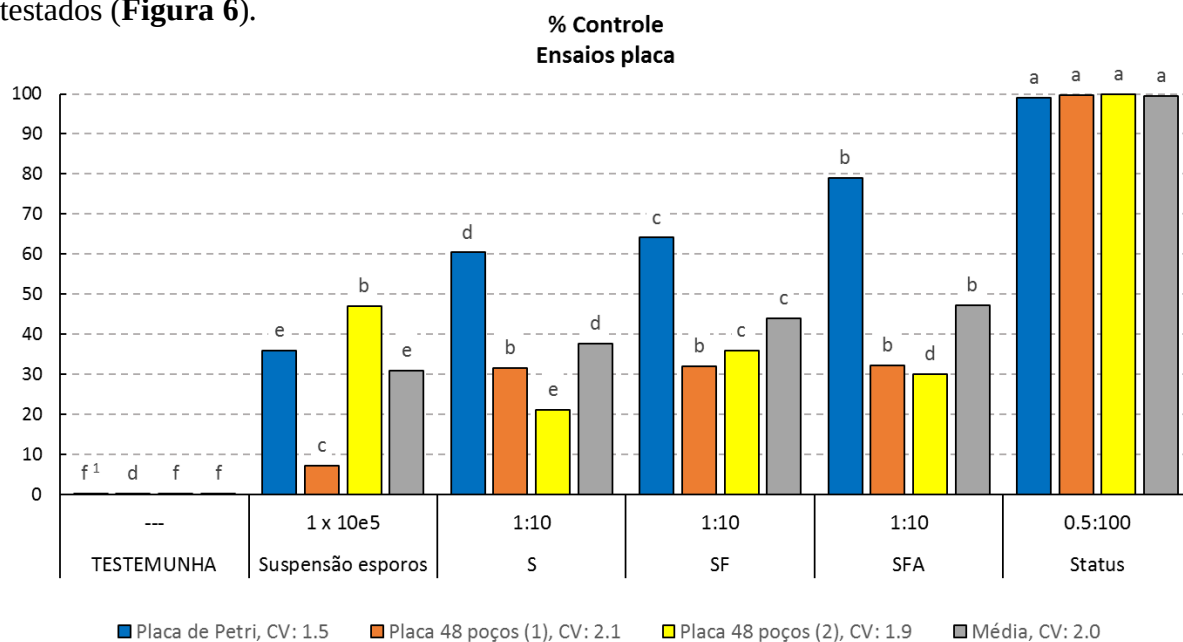
³ SF: sobrenadante filtrado; e

⁴ SFA: sobrenadante filtrado e autoclavado.



Ao se analisar a porcentagem de esporos germinados, na média dos três ensaios em placa realizados, o tratamento com Status® foi estatisticamente superior aos demais, confirmando as expectativas para um produto químico já registrado que atua principalmente na germinação dos esporos de *P. pachyrhizi* e suportando as afirmações de Juliatti et al. (2017) para seu uso no manejo da doença. Já para os diferentes métodos de preparo do *Penicillium* sp. observou-se igualdade entre SF e SFA, sendo esses superiores a S que foi igual a Suspensão de esporos e que por sua vez foi estatisticamente superior a testemunha (**Tabela 8**). A redução na germinação dos esporos nos tratamentos Suspensão de esporos, S, SF e SFA sugere, portanto, uso potencial do *Penicillium* sp. para inibição de germinação de esporos de *P. pachyrhizi* de forma direta, independentemente do método de preparo (suspensão de esporos ou diferentes sobrenadantes) em condições *in vitro*.

Para comparação da % de controle entre os tratamentos, foi utilizado apenas a diluição de 1:10 como representante dos métodos de preparo S, SF e SFA do *Penicillium* sp., uma vez que essa foi a diluição de melhor desempenho nos diferentes métodos de preparo testados (**Figura 6**).



¹ Médias seguidas com a mesma letra na mesma coloração de coluna não diferem significativamente pelo teste de Duncan ($P > 0,05$); S: sobrenadante; SF: sobrenadante filtrado; e SFA: sobrenadante filtrado e autoclavado.

Figura 6: Porcentagem de controle de *P. pachyrhizi* nos ensaios em placa.



Universidade Estadual do Norte do Paraná - UENP

Criada pela Lei Estadual nº 15.300/06 – Autorizada pelo Decreto Estadual nº 3909/08

CAMPUS LUIZ MENEGHEL
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE MESTRADO EM AGRONOMIA
BR 369 KM 54 (43) 3542-8053

O tratamento com Status® foi estatisticamente superior a todos os demais testados, chegando a níveis muito próximos a 100% nos três ensaios realizados. A alta inibição da germinação dos esporos de *P. pachyrhizi* provavelmente foi alcançada em função de uma possível potencialização do produto em função do contato direto com os esporos nas placas de poços fundos. Contudo, ao se analisar os diferentes métodos de preparo do *Penicillium* sp. observou-se respostas variadas entre os ensaios realizados, onde: Ensaio em placa de Petri, o tratamento com SFA foi superior a SF que foi superior a S e esse a Suspensão de esporos, todos os tratamentos foram superiores em relação a testemunha; Ensaio em placa 48 poços (1), os tratamentos SFA, SF e S se destacaram, sendo estes superiores a Suspensão de esporos e a testemunha; e para o Ensaio em placa 48 poços (2): houve uma inversão onde o tratamento da Suspensão de esporos foi estatisticamente superior aos demais, seguido pelo tratamento SF que foi superior ao SFA que por sua vez foi superior ao S sendo esse último superior a testemunha. Possivelmente essa alteração no perfil de resposta aos tratamentos se deva a variação natural do nível de controle proporcionado pelo *Penicillium* sp. e a diferença na viabilidade apresentada pelos esporos utilizados de *P. pachyrhizi* nos três ensaios. No Ensaio em placa de Petri tivemos 26,0% de esporos germinados na testemunha, 21,3% no Ensaio em placa 48 poços (1) e 12,7% no Ensaio em placa 48 poços (2). Dessa forma a análise da média dos três ensaios em placa apresentou resultados mais consistentes, onde verificamos que o tratamento SFA foi estatisticamente superior ao SF com níveis de controle de 47,2% e 44,0%, respectivamente, sendo esses superiores ao tratamento S que foi superior a Suspensão de esporos. Todos os diferentes métodos de preparo do *Penicillium* sp. foram superiores a testemunha (**Figura 6**).

Uma vez que os sobrenadantes do *Penicillium* sp. apresentaram resultados médios superiores a utilização da Suspensão de esporos, podemos sugerir que provavelmente o efeito sobre os esporos de *P. pachyrhizi* tenha se dado de forma mais ativa, nos ensaios em placa, pelas substâncias/metabólitos produzidos no processo descrito anteriormente na **Figura 5**, se aproximando ao relato feito por De Cal et al. (1988) de antibióticos produzidos pela espécie *Penicillium frequentans* serem ativos contra a germinação de esporos de *Monilinia laxa*, atuando no crescimento do tubo germinativo, sugerindo antibiose como mecanismo de atuação.

Outro ponto importante a ser considerado para análise dos resultados é que os tratamentos SF e SFA passaram por um filtro em membrana PES de 0,22 µm que teria retirado



todas as estruturas remanescentes da centrifugação e coleta do sobrenadante do *Penicillium* sp. (esporos e hifas). Assim como, o tratamento com SFA, por ter sido autoclavado, teria esterilizado o sobrenadante eliminando possíveis partes vivas remanescentes do *Penicillium* sp. ou outros organismos presentes, além de degradar as proteínas produzidas no processo pela desnaturação.

4.2. ENSAIO EM FOLHAS DESTACADAS CULTIVADAS EM PLACAS DE PETRI

Em ambos os ensaios de folhas de soja destacadas e cultivadas em placas de Petri não houve desenvolvimento de sintomas de *P. pachyrhizi* no tratamento utilizado como “falso inoculado”, confirmando a ausência de FAS nas folhas coletadas para utilização, o que garantiu homogeneidade de condições de inóculo para todos os tratamentos.

Para interpretação dos resultados de AACPD dos ensaios em folhas destacadas, as diluições foram agrupadas para formar uma média dos métodos de preparo do *Penicillium* sp.: S, SF e SFA (**Tabela 9**).

Ao se interpretar os resultados obtidos para AACPD da média dos dois ensaios de folhas destacadas, novamente o tratamento com Status® se destacou e foi estatisticamente superior aos demais, mantendo a tendência dos ensaios em placa. Porém os dados para os diferentes métodos de preparo do *Penicillium* sp. demonstraram que o tratamento SF apresentou superioridade estatística em relação a SFA que por sua vez foi superior aos tratamentos S e Suspensão de esporos, sendo esses iguais e superiores a testemunha (**Tabela 9**). Repetindo dessa maneira o potencial de uso para controle biológico do *Penicillium* sp., independentemente do método utilizado, reduzindo a AACPD da FAS em condições de cultivo de folhas destacadas *in vitro*.



Tabela 9: AACPD de *P. pachyrhizi* em folhas destacadas de plantas de soja (*Glycine max*) da cultivar M 5917 Ipro, cultivadas em placas de Petri.

Tratamentos		Folhas destacadas (1)	Folhas destacadas (2) AACPD	Média ensaios folha destacadas
1	Testemunha	1.501 a ¹	435 a	968 a
2	Suspensão esporos	963 c	375 b	669 b
3 - 6	S ²	1.053 b	323 c	688 b
7 - 10	SF ³	800 e	321 c	560 d
11 - 14	SFA ⁴	915 d	361 b	638 c
15	Status [®]	42 f	27 d	34 e
Blocos		ns ⁵	ns	ns
Coeficiente de variação (%)		3,6	6,8	3,3

¹ Médias seguidas com a mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Duncan ($P > 0,05$);

² S: sobrenadante;

³ SF: sobrenadante filtrado;

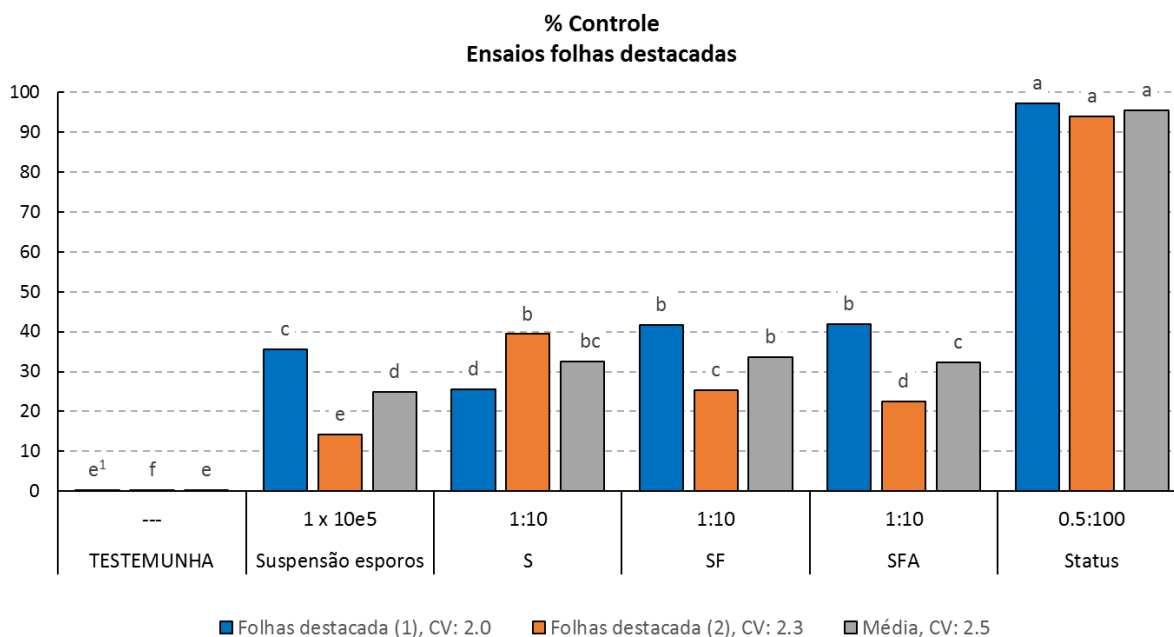
⁴ SFA: sobrenadante filtrado e autoclavado; e

⁵ ns: não significativo.

Essa capacidade de inibição das lesões de *P. pachyrhizi* em folhas destacadas de soja pode estar ligada à produção de alguma substância/metabólito que tenha sido capaz de resistir ao processo de filtragem e autoclavagem e que possa, por exemplo, atuar sobre a parede celular do patógeno, como descrito por Reetha et al. (2014) para o gênero *Penicillium* spp., novamente indicando atuação por antibiose.

Para comparação da % de controle, foi utilizada apenas a diluição de 1:10 como representante dos métodos de preparo S, SF e SFA do *Penicillium* sp. (**Figura 7**).

Assim como nos ensaios em placa, o tratamento com Status[®] demonstrou resultados ótimos de controle, próximos a 95%, nos dois ensaios com folhas destacadas, sendo superior estatisticamente a todos os demais tratamentos utilizados. Esses resultados novamente confirmam o potencial de uso do controle químico de um produto considerado protetor com ação multissítio quando as condições de uso são excelentes em relação a aplicação preventiva e contato direto do produto com os esporos da *P. pachyrhizi*.



¹ Médias seguidas com a mesma letra na mesma coloração de coluna não diferem significativamente pelo teste de Duncan ($P > 0,05$);

S: sobrenadante;

SF: sobrenadante filtrado; e

SFA: sobrenadante filtrado e autoclavado.

Figura 7: Porcentagem de controle de *P. pachyrhizi* em folhas destacadas de plantas de soja (*Glycine max*) da cultivar M 5917 Ipro.

Os métodos de preparo do *Penicillium* sp. apresentaram mais uma vez diferenças de resultados entre os dois ensaios realizados, onde Ensaio (1) o tratamento com SFA foi estatisticamente igual ao SF, sendo esses superiores a Suspensão de esporos que foi superior ao S que por sua vez foi superior a testemunha. Já no Ensaio (2) o tratamento com S se destacou, sendo ainda o SF superior ao SFA, e este superior a Suspensão de esporos que foi superior a testemunha. Essas respostas são explicadas pela variação natural do nível de controle proporcionado pelo *Penicillium* sp. e a diferença de infecção das folhas por *P. pachyrhizi* encontrados nos dois ensaios. Isso demonstrado pelo ensaio (1) ter um menor nível de infecção nas folhas, onde as avaliações foram realizadas através da contagem do número de lesões e o ensaio (2) ter apresentado um alto nível de infecção, o que possibilitou realizar as avaliações através do uso da escala de % de severidade da FAS conforme escala diagramática proposta por



Godoy et al. (2006). Com isso, novamente a análise da média dos dois ensaios com folhas destacadas apresentou resultados com maior confiabilidade, onde foi verificado que o tratamento SF foi estatisticamente igual ao S e superior aos demais métodos de preparo do *Penicillium* sp., também tivemos S igual ao SFA, sendo esse superior a Suspensão de esporos e todos superiores a testemunha (**Figura 7**).

Em conformidade com os ensaios em placa, os diferentes tratamentos com *Penicillium* sp., em seus diferentes métodos, apresentaram resultados significativamente superior à testemunha, com média de controle de *P. pachyrhizi* em folhas destacadas na ordem de 31%, o que vem ao encontro com Nicoletti et al. (2007) que cita a identificação de espécies de *Penicillium* e sua comprovada atividade biológica no controle de patógenos.

Durante as avaliações dos ensaios foi possível visualizar o desenvolvimento do *Penicillium* sp. sobre lesões de *P. pachyrhizi* impedindo sua esporulação e consequentemente reduzindo sua taxa de progressão, principalmente nos tratamentos com Suspensão de esporos e Sobrenadante (**Figura 8**).

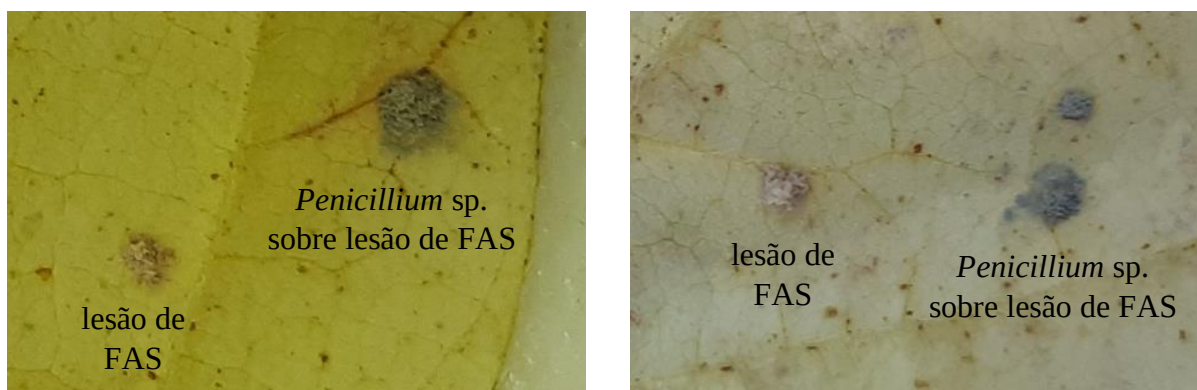


Figura 8: Lesões de *P. pachyrhizi* micoparasitadas por *Penicillium* sp. encontradas no ensaio com folhas destacadas (1) (Fonte: Zeny, E.P., 2019).

Com isso podemos também sugerir que ocorram interações micoparasíticas entre o *Penicillium* sp. e *P. pachyrhizi*, similar ao relatado de outros três agentes: *Verticillium psalliotae* que formou estruturas semelhantes à apressórios em possíveis locais de infecção em uredósporos de *P. pachyrhizi*, relatado por Saksirirat e Hoppe (1990) e Zare e Gams (2001); *S. lanosoniveum* que foi encontrado em urédias de *P. pachyrhizi* e reduziu significativamente o desenvolvimento da ferrugem-asiática à campo, observado por Ward et al. (2011) e Ward et al.



(2012); e *Trichothecium rosae* que ao colonizar uredósporos de *P. pachyrhizi* causou sua retração, descrito por Kumar e Jha (2002).

4.3. ENSAIO EM CASA DE VEGETAÇÃO

Primeiramente deve-se ressaltar que esse ensaio foi conduzido sobre condições de baixa pressão de inóculo de FAS, atingindo em média cerca de 21 lesões por trifólio da soja na última avaliação realizada. Esse cenário se deve ao isolamento das plantas em casa de vegetação, no intuito de garantir a aplicação preventiva dos tratamentos, e ausência de esporos de FAS para infecção natural do patógeno. Sendo a única fonte de *P. pachyrhizi* a realização de inoculação na concentração de 1.10^5 esporos.mL⁻¹ no momento da primeira aplicação dos tratamentos, como descrito no **Item 3.3**.

Para interpretação dos resultados de AACPD do ensaio em casa de vegetação, as diluições foram agrupadas para formar uma média dos métodos de preparo S, SF e SFA do *Penicillium* sp. (**Tabela 10**).

Tabela 10: AACPD de *P. pachyrhizi* em folhas de soja (*Glycine max*) da cultivar M 5917 Ipro, cultivadas em casa de vegetação.

Tratamentos		AACPD
1	Testemunha	1.065 a ¹
2	Suspensão esporos	789 e
3 - 6	S ²	869 d
7 - 10	SF ³	964 b
11 - 14	SFA ⁴	939 c
15	Status [®]	763 f
Blocos		significativo
Coeficiente de variação (%)		1,9

¹ Médias seguidas com a mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Duncan (P > 0,05);

² S: sobrenadante;

³ SF: sobrenadante filtrado; e

⁴ SFA: sobrenadante filtrado e autoclavado.



A avaliação do resultado da AACPD do ensaio conduzido com plantas de soja da cultivar M 5917 Ipro em casa de vegetação demonstrou, em conformidade com os ensaios anteriores, que o tratamento com Status[®] foi estatisticamente superior aos demais, porém muito próximo numericamente ao tratamento com Suspensão de esporos de *Penicillium* sp. Em relação apenas aos diferentes métodos de preparo do *Penicillium* sp., foi possível verificar que o tratamento com Suspensão de esporos foi superior ao S, este superior ao SFA, que por sua vez foi superior ao SF, sendo todos superiores a testemunha (**Tabela 10**).

Essa aproximação do resultado da AACPD do tratamento utilizando a Suspensão de esporos de *Penicillium* sp. em relação ao tratamento químico com Status[®], demonstra que nas condições e metodologia que foi conduzido o ensaio em casa de vegetação o controle biológico atuou de forma estável e próximo aos resultados anteriormente descritos, contudo o tratamento químico com Status[®] teve uma redução em sua efetividade. O que já era esperado e se aproxima das respostas atualmente encontradas em áreas comerciais com esse produto, devido a necessidade de contato direto do i.a. com o esporo da *P. pachyrhizi* para inibir seu desenvolvimento de forma preventiva, o que nem sempre é possível pelas limitações impostas pela estrutura da planta e tecnologia de aplicação empregada.

Para comparação da % de controle, foi utilizado apenas a diluição de 1:10 como representante dos métodos de preparo S, SF e SFA do *Penicillium* sp. (**Figura 9**).

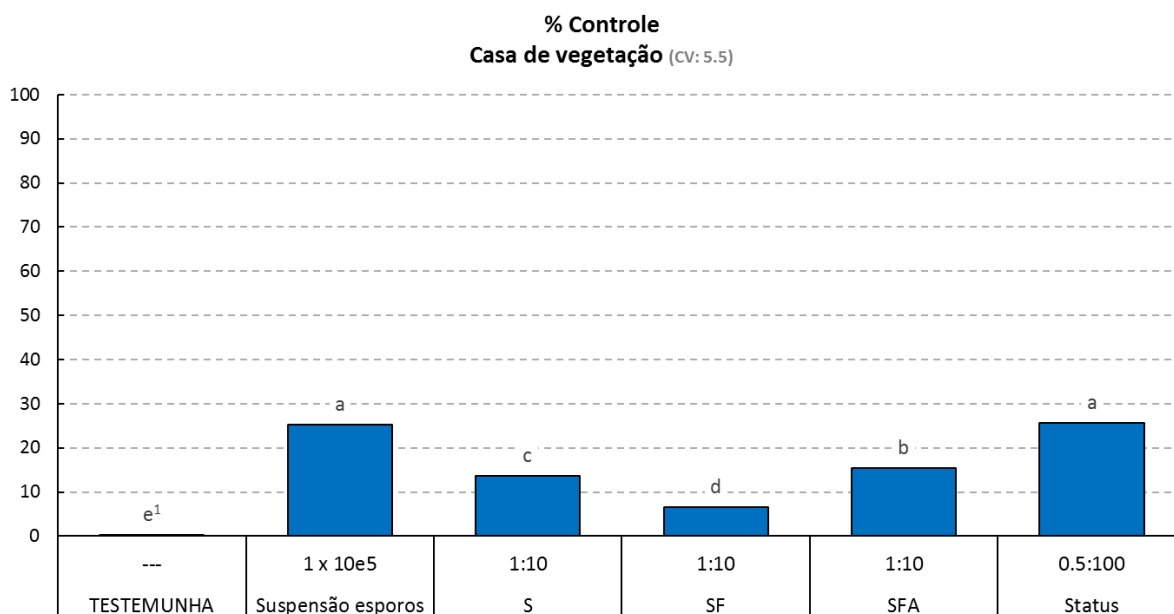
Diferentemente dos ensaios citados anteriormente, o tratamento com Status[®] foi estatisticamente e numericamente igual Suspensão de esporos do *Penicillium* sp., com nível de controle da FAS de 25%, ambos superiores ao SFA, que foi superior ao S, que por sua vez foi superior ao SF (**Figura 9**).



Universidade Estadual do Norte do Paraná - UENP

Criada pela Lei Estadual nº 15.300/06 – Autorizada pelo Decreto Estadual nº 3909/08

CAMPUS LUIZ MENEGHEL
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE MESTRADO EM AGRONOMIA
BR 369 KM 54 (43) 3542-8053



¹ Médias seguidas com a mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Duncan ($P > 0,05$);

S: sobrenadante;

SF: sobrenadante filtrado; e

SFA: sobrenadante filtrado e autoclavado.

Figura 9: Porcentagem de controle de *P. pachyrhizi* em folhas de soja (*Glycine max*) da cultivar M 5917 Ipro, cultivadas em casa de vegetação.

A alternância de resultados encontrados entre os diferentes métodos de preparo do *Penicillium* sp., nos diferentes ensaios já descritos, indicam que o mesmo possui mais de um mecanismo de atuação sobre a FAS e todos interagem entre si de forma conjunta, em conformidade com as colocações de Hossain et al. (2017) que cita os fungos fitopatogênicos endófitos podendo possuir uma combinação de mecanismos como por exemplo: interações diretas por micoparasitismo, competição, antibiose por meio da produção de metabólitos secundários; e interações indiretas mais complexas entre fungos micopatogênicos e patógenos causadores de doenças mediadas por sua planta hospedeira mútua (por exemplo, estimulação de metabólitos secundários de plantas, promoção de crescimento das plantas e indução de resistência sistêmica).



4.4. ENSAIO À CAMPO

Diferentemente do ensaio em casa de vegetação, o ensaio conduzido em condições de campo apresentou condições de alta pressão de inóculo de FAS, atingindo em média 94% de severidade na testemunha na última avaliação realizada. Isso ocorreu pelas condições climáticas impostas na safra 2018/2019 estarem favoráveis a *P. pachyrhizi*, principalmente umidade e temperatura ideais para infecção, garantindo constante re-inoculação natural pela altíssima presença de esporos no ar.

Para interpretação dos resultados de AACPD do ensaio à campo, as diluições foram agrupadas para formar uma média dos métodos de preparo S, SF e SFA do *Penicillium* sp. (**Tabela 11**).

Tabela 11: AACPD de *P. pachyrhizi* em de plantas de soja (*Glycine max*) da cultivar BS 2606 Ipro, cultivadas à campo.

Tratamentos		AACPD
1	Testemunha	1.055 a ¹
2	Suspensão esporos	899 c
4 - 6	S ²	952 b
8 - 10	SF ³	939 b
15	Status [®]	692 d
Blocos		ns
Coeficiente de variação (%)		2,4

¹ Médias seguidas com a mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Duncan (P > 0,05);

² S: Sobrenadante; e

³ SF: Sobrenadante filtrado.

A avaliação do resultado da AACPD do ensaio conduzido com plantas de soja da cultivar BS 2606 Ipro à campo demonstrou, novamente, que o tratamento com Status[®] foi estatisticamente superior aos demais. Contudo, mais uma vez próximo numericamente ao tratamento com Suspensão de esporos de *Penicillium* sp., repetindo a tendência encontrada no ensaio descrito anteriormente conduzido em casa de vegetação. Ao se comparar apenas os diferentes métodos de preparo do *Penicillium* sp., foi possível verificar que o tratamento com



Universidade Estadual do Norte do Paraná - UENP

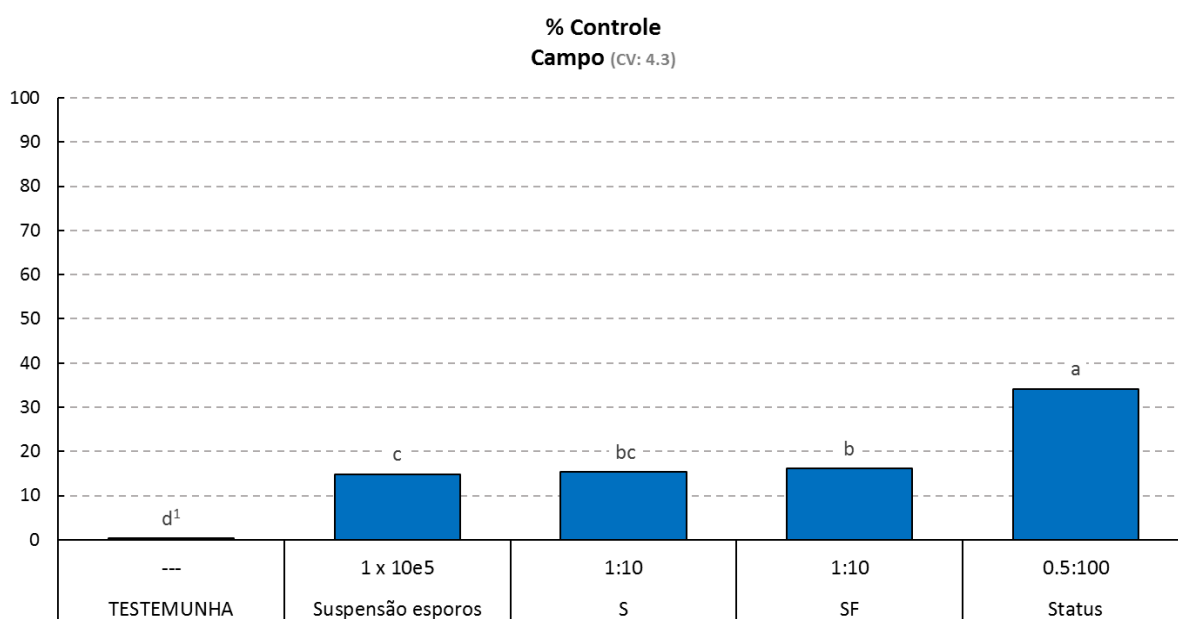
Criada pela Lei Estadual nº 15.300/06 – Autorizada pelo Decreto Estadual nº 3909/08

CAMPUS LUIZ MENEGHEL
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE MESTRADO EM AGRONOMIA
BR 369 KM 54 (43) 3542-8053

Suspensão de esporos foi estatisticamente superior aos demais, onde S foi igual a SF, que por sua vez foram superiores à testemunha (**Tabela 11**).

Os melhores resultados com a utilização da Suspensão de esporos de *Penicillium* sp., se aproximando do resultado da AACPD do tratamento químico com Status[®], indica que em condições de campo essa forma de uso do *Penicillium* sp. possa ter contribuído de forma mais eficiente uma vez que nesse experimento a alta pressão de inóculo gerou um grande número de lesões de *P. pachyrhizi* para serem micoparasitadas, como observado no ensaio a campo na **Figura 10**.

Para comparação da % de controle, foi utilizado apenas a diluição de 1:10 como representante dos métodos de preparo S e SF do *Penicillium* sp. (**Figura 10**).



¹ Médias seguidas com a mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Duncan ($P > 0,05$);

S: sobrenadante; e

SF: sobrenadante filtrado.

Figura 10: Porcentagem de controle de *P. pachyrhizi* em plantas de soja (*Glycine max*) da cultivar BS 2606 Ipro, cultivadas à campo.

Os resultados de % de controle à campo demonstraram que o tratamento com Status[®] foi estatisticamente superior a todos os demais com nível de controle da FAS de 34%, o que se encontra dentro do esperado para esse produto em condições de alta pressão de FAS.



Já para os diferentes métodos de preparo do *Penicillium* sp. o tratamento com SF foi superior a Suspensão de esporos e igual ao S, assim como S foi igual a Suspensão de esporos e todos superiores à testemunha. Contudo, mesmo com diferenças estatísticas, os valores numéricos de controle se encontram muito próximos 16,1%; 15,3% e 14,8% para SF, S e Suspensão de esporos, respectivamente (**Figura 10**).

Isso demonstrou, que mesmo em condições de alta pressão de FAS à campo, houve potencial considerável de uso do *Penicillium* sp. como agente de controle biológico de *P. pachyrhizi* como um biofungicida, em linha com as colocações de Larena et al. (2018) que citaram a necessidade crescente de um agente com essas características para suportar o novo sistema de produção agrícola.

4.5. ANÁLISE DAS DILUIÇÕES DOS SOBRENADANTES

Para análise de resposta das diluições foi estabelecida uma regressão logarítmica, onde se agrupou os dados dos diferentes métodos de preparo do *Penicillium* sp. (S, SF e SFA), gerando uma média das diluições 1:5, 1:10, 1:100 e 1:1000 de quatro ensaios [Placa 48 poços (2); Folhas destacadas (1) e (2); e Casa de vegetação] (**Figura 11**).

Com base nos resultados obtidos observou-se uma resposta linear crescente a maior concentração do sobrenadante de *Penicillium* sp. na diluição. Dessa forma, a melhor diluição testada para uso foi a de 1:5 que apresentou um resultado de controle de *P. pachyrhizi*, na média dos quatro ensaios analisados, a nível de 38,4%. Contudo, é possível afirmar que diluições ainda mais concentradas possam apresentar resultados superiores de controle.

Esses dados caracterizam o *Penicillium* sp. como possível agente de controle biológico para FAS, uma vez que se encontra em conformidade com as características de redução de inóculo conceituadas por Cook e Baker (1983); Bettiol, (1991), citados por Bettiol e Morandi (2009).

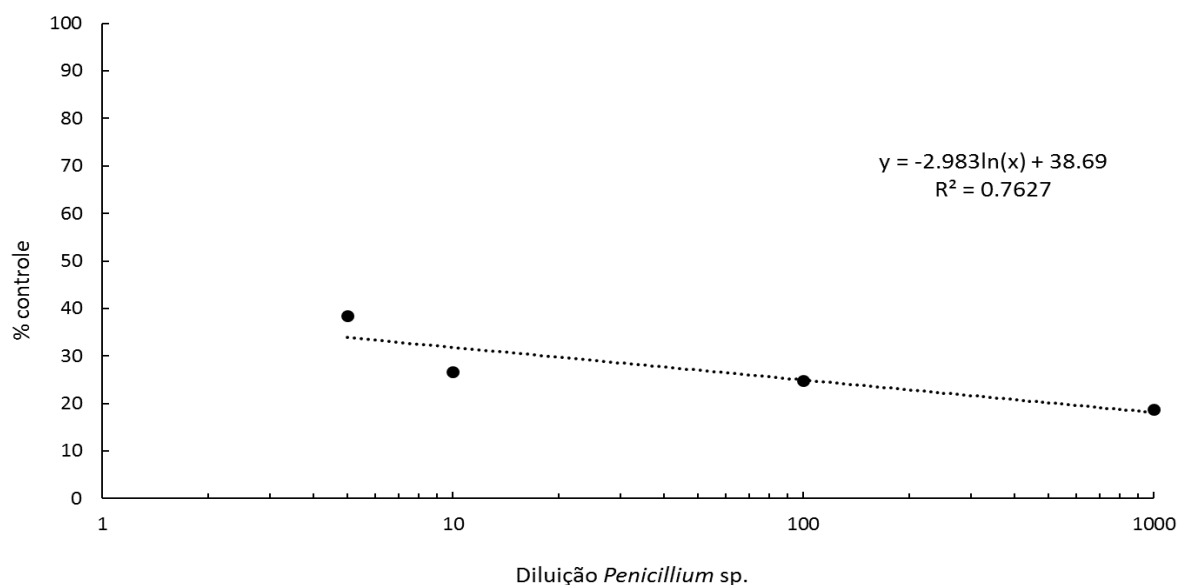


Figura 11: Porcentagem de controle de *P. pachyrhizi* pela aplicação das diluições do *Penicillium* sp., média de 4 ensaios.

4.6. CONSIDERAÇÕES GERAIS DOS ENSAIOS

Após análise de todos os ensaios realizados para verificação do potencial de controle biológico para FAS pelo fungo *Penicillium* sp., é possível afirmar que o mesmo demonstrou capacidade de controle relevantes, mesmo se tratando de métodos de preparo simples sem desenvolvimento de formulações específicas, o que pode vir a potencializar ainda mais os resultados alcançados. Outro ponto relevante foram as diferenças demonstradas para uso da suspensão de esporos ou sobrenadantes (S, SF e SFA), onde foi possível verificar que para ação direta sobre a germinação de esporos de *P. pachyrhizi* os tratamentos com SF e SFA se destacaram, provavelmente pela ação das substâncias/metabólitos produzidos durante o processo descrito na **Figura 5**. Já para condições de inibição de lesões de *P. pachyrhizi*, no ensaio em casa de vegetação e à campo, os tratamentos com Suspensão de esporos e S melhoraram em desempenho, inclusive se aproximando do tratamento com Status® em alguns casos, indicando interações micoparasíticas entre o *Penicillium* sp. e *P. pachyrhizi*.



Universidade Estadual do Norte do Paraná - UENP

Criada pela Lei Estadual nº 15.300/06 – Autorizada pelo Decreto Estadual nº 3909/08

CAMPUS LUIZ MENEGHEL
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE MESTRADO EM AGRONOMIA
BR 369 KM 54 (43) 3542-8053

Visto que no campo durante a safra de soja as condições encontradas são de constante inoculação de esporos da *P. pachyrhizi* presentes no ar, a maior possibilidade de sucesso de controle seria com um agente de ação conjunta que atuasse de forma preventiva sobre a germinação de esporos e também sobre a inibição de lesões iniciais ou até mesmo já em esporulação, o que reduziria a taxa de progresso da FAS e consequentemente seus danos a cultura. Seguindo esse raciocínio, a utilização do sobrenadante centrifugado acrescido com nova carga de esporos do *Penicillium* sp., seria uma boa opção para novos estudos à campo, assim como o desenvolvimento de uma formulação para estabilizar e proteger os esporos e as substâncias/metabólitos produzidos no processo de crescimento do meio de cultivo das condições ambientais. Outro ponto a ser verificado, seria a identificação das substâncias/metabólitos envolvidos no processo para melhor descrição da forma de atuação sobre a *P. pachyrhizi* e talvez trabalhar na possibilidade de maior concentração ou potencialização dos mesmos.

Devido ao histórico e desafio atual imposto pela FAS para a utilização apenas de controle químico (vários casos de mutações descritas no **Item 2.2.1**), baixa resposta com resistência genética pela cultura da soja (relatados no **Item 2.2.2**) e necessidade de imposição de vazio sanitário para reduzir inóculo inicial (informações **Item 2.2.3**), não se espera que o controle biológico de *P. pachyrhizi* com *Penicillium* sp. atinja altos níveis de controle de forma isolada, mas sim faça parte de uma estratégia de manejo que continue viabilizando o cultivo de soja juntamente com as demais ferramentas já utilizadas pelos produtores.



Universidade Estadual do Norte do Paraná - UENP

Criada pela Lei Estadual nº 15.300/06 – Autorizada pelo Decreto Estadual nº 3909/08

CAMPUS LUIZ MENEGHEL
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE MESTRADO EM AGRONOMIA
BR 369 KM 54 (43) 3542-8053

5. CONCLUSÕES

O fungo *Penicillium* sp. se mostrou um potencial agente para uso no controle biológico da FAS, em alguns casos se aproximando do controle obtido com o produto químico a base de oxiclureto de cobre (ensaio conduzido em casa de vegetação).

Todas as diferentes formas de utilização (suspensão de esporos ou sobrenadantes) apresentaram potencial de uso. Contudo, nos ensaios de germinação de esporos de *P. pachyrhizi* conduzidos em placas os melhores resultados foram com SF e SFA, já os ensaios em folhas destacadas, casa de vegetação e à campo indicaram a Suspensão de esporos e S como as opções mais viáveis.

A curva de resposta de dose apontou a diluição de 1:5 como sendo mais efetiva.



Universidade Estadual do Norte do Paraná - UENP

Criada pela Lei Estadual nº 15.300/06 – Autorizada pelo Decreto Estadual nº 3909/08

CAMPUS LUIZ MENEGHEL
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE MESTRADO EM AGRONOMIA
BR 369 KM 54 (43) 3542-8053

6. REFERÊNCIAS

AGROLINK. **Ferrugem Asiática**. Disponível em: <https://www.agrolink.com.br/culturas/soja/informacoes/ferrugem-asiatica_361544.html>. Acesso em: 06-out-2019.

BEAUVERIA BASSIANA. In: WIKIPÉDIA: a enciclopédia livre. Wikimedia, 2019. Disponível em: <https://pt.wikipedia.org/w/index.php?title=Beauveria_bassiana&oldid=54935640>. Acesso em: 26 set. 2019.

BETTIOL, W. (Org). **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariuna: EMBRAPA-CNPDA, 1991. p.1-5 (EMBRAPA-CNPDA. Documentos, 15).

BETTIOL, W. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. 1. ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. 341 p.

_____. Biological control of peach twig blight (*Monilinia laxa*) with *Penicillium frequentans*. **Plant Pathology**, v. 39, n. 4, p. 612-618, dez. 1990.

BRITO Jr, J. G.; FARONI, L. R. D'A.; CECON, P. R.; BENEVENUTO, W. C. A. N.; BENEVENUTO JR. A. A.; HELENO, F. F. Efficacy of ozone in the microbiological disinfection of maize grains. **Brazilian Journal of Food Technology**. Campinas, v. 21, Epub June 07, 2018. DOI: <<http://dx.doi.org/10.1590/1981-6723.02217>>. Disponível em: <<https://search.scielo.org/?lang=pt&count=15&from=0&output=site&sort=&format=summary&fb=&page=1&q=Efficacy+of+ozone+in+the+microbiological+disinfection+of+maize+grains>>. Acesso em: 06 out. 2019.

CANTERI, M.G. et al. SASM-Agri - Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott-Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, v.1, n2, p.18-24, 2001. Disponível em: <http://www.agrocomputacao.deinfo.uepg.br/dezembro_2001/Arquivos/RBAC_Artigo_03.pdf>. Acesso em: 17 set. 2019.

CHECHI, A.; BOLLER, W.; FORCELINI, C. A.; ROEHRIG, R.; ZUCHELLI, E. Área foliar, volumes de pulverização e quantidades aplicáveis de fungicida durante o período de proteção para controle da ferrugem-asiática da soja. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 44, n. 4, out./dec., 2018. DOI: <<http://dx.doi.org/10.1590/0100-5404/174517>>. Disponível em: <https://scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-54052018000400326&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 06 out. 2019.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira – grãos**: Décimo segundo levantamento, setembro 2019 – safra 2018/2019. Brasília: CONAB, 2019. 126 p. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos>>. Acesso em: 06 out. 2019.



Universidade Estadual do Norte do Paraná - UENP

Criada pela Lei Estadual nº 15.300/06 – Autorizada pelo Decreto Estadual nº 3909/08

CAMPUS LUIZ MENEGHEL
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE MESTRADO EM AGRONOMIA
BR 369 KM 54 (43) 3542-8053

CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 20.; ANNUAL MEETING OF THE INTERAMERICAN SOCIETY FOR TROPICAL HORTICULTURE, 54., 2008, Vitória.

Anais [VENTURA, J. A. & COSTA, H. Estratégias de Manejo para o Controle de Doenças de Plantas: Casos de Sucesso em Banana, Abacaxi e Morango]. Vitória: INCAPER: Sociedade Brasileira de Fruticultura, out. 2008.

CRUZ, M. F. A. da et al. Inducers of resistance and silicon on the activity of defense enzymes in the soybean - *Phakopsora pachyrhizi* interaction. **Bragantia**, v. 72, n. 2, p.162-172, 29 jul. 2013.

DALL'AGNOL, A.; LAZAROTTO, J.J.; HIRAKURI, M.H. **Desenvolvimento, Mercado e Rentabilidade da Soja Brasileira**. Circular Técnica 74, Embrapa. Londrina, PR. Abril, 2010. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/854125/1/CT74eletronica.pdf>>. Acesso em: 06 out. 2019.

DE CAL, A.; SAGASTA, E. M.; MELGAREJO, P. Antifungal substances produced by *Penicillium frequentans* and their relationship to the biocontrol of *Monilinia laxa*. **Phytopathology**, v. 78, p. 888-893, 1988.

DERAL, Departamento de Economia Rural. **Estimativa de Safra**. 2019. Disponível em: <<http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/pss.xls>>. Acesso em: 06 out. 2019.

DORIGHELLO, D. V. et al. Controlling Asian soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) with *Bacillus* spp. and coffee oil. **Crop Protection**, v. 67, p.59-65, jan. 2015.

_____. **Eficiência de fungicidas para o controle da ferrugem-asiática da soja, *Phakopsora pachyrhizi*, na safra 2017/2018**: Resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. Circular 138. Londrina: Embrapa Soja, 2018. 8 p.

EL-FAWY, M. M.; EL-SHARKAWY, R M. I.; ABO-ELYOUSR, K. A. M. Evaluation of certain *Penicillium frequentans* isolates against *Cercospora* leaf spot disease of sugar beet. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 28, n. 1, p.28-49, 6 jun. 2018.

EMBRAPA SOJA. **Vazio sanitário e calendarização da semeadura da soja**. 2019. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/soja/ferrugem/vaziosanitariocalendarizacao-semeadura>>. Acesso em: 25 out. 2019.

FAOSTAT. **Pesticides Use**. 2016. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/RP>>. Acesso em: 03 out. 2018.



Universidade Estadual do Norte do Paraná - UENP

Criada pela Lei Estadual nº 15.300/06 – Autorizada pelo Decreto Estadual nº 3909/08

CAMPUS LUIZ MENEGHEL
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE MESTRADO EM AGRONOMIA
BR 369 KM 54 (43) 3542-8053

FERREIRA, T. F.; CARVALHO, M. V.; FERREIRA, V. F.; MAVAIEIE, D. P. R.; GUIMARÃES, G. C.; OLIVEIRA, J. A. Sanitary quality of soybean seeds treated with fungicides and insecticides before and after storage. **Journal of Seed Science**. Londrina, v.41, n.3, Epub Sep 09, 2019. DOI: <<http://dx.doi.org/10.1590/2317-1545v41n3210498>>. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2317-15372019000300293&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 06 out. 2019.

FERNADEZ, M. R. **Manual para Laboratório de Fitopatologia**. Passo Fundo: Embrapa-CNPT, 1993, 128 p.

FRAC - Comitê de Ação para Resistência a Fungicidas. **Informações sobre Novas recomendações para o manejo da ferrugem-asiática da soja**. Disponível em: <<http://www.frac-br.org/soja>>. Acesso em 26 set. 2019.

FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*: a guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. **Studies in Mycology no. 49**. Utrecht: Elsevier, 2004, p. 1–174. Disponível em: <<http://www.westerdijkinstitute.nl/publications/Sim49/Sim49Article1.pdf>>. Acesso em 06 out. 2019.

GODOY, C.V., KOGA, L.J. & CANTERI, M.G. Diagrammatic scale for assessment of soybean rust severity. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, p. 063-068, 2006.

GODOY, C. V. et al. **Eficiência de fungicidas para o controle da ferrugem-asiática da soja, *Phakopsora pachyrhizi* na safra 2016/2017**: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. Circular 129. Londrina: Embrapa Soja, 2017. 12 p.

GODOY, C. V. et al. **Eficiência de fungicidas para o controle da ferrugem-asiática da soja, *Phakopsora pachyrhizi* na safra 2017/2018**: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. Circular 138 Londrina: Embrapa Soja, 2018. 8 p.

GODOY, C. V.; SEIXAS, C. D. S.; SOARES, R. M.; MARCELINO-GUIMARÃES, F. C.; MEYER, M. C.; COSTAMILAN, L. M. Asian soybean rust in Brazil: past, presente, and future. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v. 51, n. 5, maio de 2016. DOI: <<http://dx.doi.org/10.1590/s0100-204x2016000500002>>. Disponível em: <<http://www.seer.sct.embrapa.br/index.php/pab/article/view/23063/13304>>. Acesso em: 06 out. 2019.

GOELLNER, K. et al. *Phakopsora pachyrhizi*, the causal agent of Asian soybean rust. **Molecular Plant Pathology**, v. 11, n. 2, p.169-177, mar. 2010.



Universidade Estadual do Norte do Paraná - UENP

Criada pela Lei Estadual nº 15.300/06 – Autorizada pelo Decreto Estadual nº 3909/08

CAMPUS LUIZ MENEGHEL
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE MESTRADO EM AGRONOMIA
BR 369 KM 54 (43) 3542-8053

GRICOLETO, M. R. P.; MEDINA, P. F.; PARISI, F. J. D.; SANTOS, F dos.; Health aspects and ideal temperature for germination of peanut seeds. **Journal of Seed Science**. Londrina, v. 41, n. 2, Epub 01 julho 2019. DOI: <<http://dx.doi.org/10.1590/2317-1545v41n2195483>>. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2317-15372019000200233&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 06 out. 2019.

GUIJARRO, B. et al. Effect of drying on conidial viability of *Penicillium frequentans*, a biological control agent against peach brown rot disease caused by *Monilinia* spp. **Biocontrol Sci Technol**, v. 16, 257–269, 2006.

GUIJARRO, B.; MELGAREJO, P.; DE CAL, A. Effect of stabilizers on the shelf-life of *Penicillium frequentans* conidia and their efficacy as a biological agent against peach brown rot. **Int J Food Microbiol**, v.13, 117–124, 2007.

HANUDIN, H.; MARWOTO, B.; BUDIARTO, K. Application of PGPR and Antagonist Fungi-based Biofungicide for White Rust Disease Control and Its Economyc Analysis in Chrysanthemum Production. **Agrivita Journal of Agricultural Science**, v. 39, n. 3, p.266-278, 7 ago. 2017.

HARTMAN, G.L. et al. **Compêndio de doenças e pragas da soja**. 5. ed. São Paulo: APS Press, 2015.

HOSSAIN, Md. M.; SULTANA, F.; HYAKUMACHI, M. Role of ethylene signalling in growth and systemic resistance induction by the plant growth-promoting fungus *Penicillium viridicatum* in Arabidopsis. **Journal of Phytopathology**, v. 165, n. 7-8, p.432-441, 11 maio 2017.

JABER, L. R.; OWNLEY, B. H. Can we use entomopathogenic fungi as endophytes for dual biological control of insect pests and plant pathogens? **Biological Control**, v. 116, p.36-45, jan. 2018.

JULIATTI, F.C. et al. Sensitivity of *Phakopsora pachyrhizi* Populations to Dithiocarbamate, Chloronitrile, Triazole, Strobilurin, and Carboxamide Fungicides. **Bioscience Journal**. Uberlândia, v. 33, n. 4, p. 933-943, July/Aug. 2017. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/318684260_SENSITIVITY_OF_Phakopsora_pachyrhizi_POPULATIONS_TO_DITHIOCARBAMATE_CHLORONITRILE_TRIAZOLE_STROBILURIN_AND_CARBOXAMIDE_FUNGICIDES_SENSIBILIDADE_DE_POPULACOES_DE_Phakopsora_pachyrhizi_AOS_FUNGICIDAS_DI>. Acesso em: 06 out. 2019.

KANTOLIC, A. G.; CARMONA, M. A. Bases fisiológicas para a geração do rendimento: relação com o efeito de doenças foliares e com o uso de fungicidas em soja. In: REIS, E. M.;



Universidade Estadual do Norte do Paraná - UENP

Criada pela Lei Estadual nº 15.300/06 – Autorizada pelo Decreto Estadual nº 3909/08

CAMPUS LUIZ MENEGHEL
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE MESTRADO EM AGRONOMIA
BR 369 KM 54 (43) 3542-8053

CASA, R. T. (Org.). **Doenças da Soja**: etiologia, sintomatologia, diagnose e manejo integrado. Passo Fundo: Berthier, 2012. p. 13-53. Tradução de Erlei Melo Reis.

KAWANO, C. Y. et al. Comparative study of intracellular and extracellular pectinases produced by *Penicillium frequentans*. **Biotechnol Appl Biochem**, v. 29, p.133–140, 1999.

KIMATI, H. Fungos. In: GALLI, F.; TOKESHI, H.; CARVALHO, P. C. T.; BALMER, T. L.; CARDOSO, C. O. N.; SALGADO, C. L.; KUGNER, T. L.; CARDOSO, E. J. V. N.; BERGAMIM FILHO, A. **Manual de Fitopatologia**. 2. ed. São Paulo: Editora Agronômica, 1978. p. 246-279.

KUMAR, S., JHA D. K. *Trichothecium roseum*: a potential agent for the biological control of soybean rust. **Indian Phytopathol**. 55 232–234, 2002.

KUPPER, K. C.; CERVANTES, A. L. L.; KLEIN, M. N.; SILVA, A. C. Avaliação de microrganismos antagonistas, *Saccharomyces cerevisiae* e *Bacillus subtilis* para o controle de *Penicillium digitatum*. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal, v. 35, n. 2, June 2013. DOI: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452013000200011>>. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-29452013000200011>. Acesso em: 06 out. 2019.

LANGENBACH, C. et al. Fighting Asian Soybean Rust. **Frontiers In Plant Science**, v. 7, p.797, 7 jun. 2016.

LANNA FILHO, R.; FERRO, H. M.; PINHO, R. S. C. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**. Lavras, v. 4, n. 2, p. 12, 2010. DOI: <<http://dx.doi.org/10.0000/rtcab.v4i2.145>>. Disponível em: <<http://www.periodicoselétronicos.ufma.br/index.php/ccaatropica/article/view/145>>. Acesso em: 06 out. 2019.

LARENA, I. et al. Molecular Techniques to Register and Commercialize a *Penicillium rubens* Strain as a Biocontrol Agent. **New And Future Developments In Microbial Biotechnology And Bioengineering**, p.97-117, 2018.

LUCAS, E. M. F.; CASTRO, M. C. M.; TAKAHASHI, J. A. Antimicrobial properties of sclerotiorin, isochromophilone VI and pencolide, metabolites from a Brazilian cerrado isolate of *Penicillium sclerotiorum* van Beyma. **Brazilian Journal of Microbiology** 38:785–789, 2007.

MA, J. F.; YAMAJI, N. Silicon uptake and accumulation in higher plants. **Trends In Plant Science**, v. 11, n. 8, p.392-397, ago. 2006.



Universidade Estadual do Norte do Paraná - UENP

Criada pela Lei Estadual nº 15.300/06 – Autorizada pelo Decreto Estadual nº 3909/08

CAMPUS LUIZ MENEGHEL
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE MESTRADO EM AGRONOMIA
BR 369 KM 54 (43) 3542-8053

MALTBY, L.; BROCK, T. C. M.; BRINK, P. J. van Den. Fungicide Risk Assessment for Aquatic Ecosystems: Importance of Interspecific Variation, Toxic Mode of Action, and Exposure Regime. **Environmental Science & Technology**, v. 43, n. 19, p.7556-7563, out. 2009.

MANDARINO, J. M. G. **Blog Origem e História da Soja no Brasil**. São Paulo: 05 abril 2017. Disponível em: <<https://blogs.canalrural.uol.com.br/embrapasoja/2017/04/05/origem-e-historia-da-soja-no-brasil/>> Acesso em: 19 set. 2019.

MEDEIROS, J. G. F.; ARAÚJO NETO, A. C.; URSULINO, M. M.; NASCIMENTO, L. C.; ALVES, E. U. FUNGOS ASSOCIADOS ÀS SEMENTES DE *Enterolobium contortisiliquum*: ANÁLISE DA INCIDÊNCIA, CONTROLE E EFEITOS NA QUALIDADE FISIOLÓGICA COM O USO DE EXTRATOS VEGETAIS. **Ciência Florestal**. Santa Maria, v. 26, n. 1, p. 47-58, jan.-mar. 2016. DOI: <<http://dx.doi.org/10.5902/1980509821090>>. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1980-50982016000100047&script=sci_abstract&tlng=pt>. Acesso em: 06 out. 2019.

MEDEIROS, J. G. F.; FONTES, I. C. G.; SILVA, E. C.; SANTOS, P. D.; RODRIGUES, R. M. Controle de fungos e qualidade fisiológica de sementes de soja (*Glycine max* L.) submetidas ao calor húmido. **Revista de Ciências Agrárias**. Lisboa, v. 42, n. 2, jun. 2019. DOI: <<http://dx.doi.org/10.19084/RCA.17182>>. Disponível em: <http://www.scielo.mec.pt/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0871-018X2019000200019&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 06 out. 2019.

MEHTA, Y. R. et al. Systemic Acquired Resistance of Soybean to Soybean Rust Induced by Shale Water. **American Journal of Plant Sciences**, v. 06, n. 14, p.2249-2256, 2015.

MENDGEN, K. et al. Volatiles modulate the development of plant pathogenic rust fungi. **Planta**, v. 224, n. 6, p.1353-1361, 15 jun. 2006.

NASCIMENTO, J. M.; GAVASSONI, W. L.; BACCHI, L. M. A.; MELO, E. P. Germinação de uredinosporos de *Phakopsora pachyrhizi* e *Puccinia kuehnii* sob diferentes adjuvantes. **Arquivos do Instituto Biológico**. São Paulo, v. 82, Epub Jan 12, 2016. DOI: <<http://dx.doi.org/10.1590/1808-1657001242013>>. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1808-16572015000100226>. Acesso em: 06 out. 2019.

NICOLETTI, R. et al. Production and fungitoxic activity of Sch 642305, a secondary metabolite of *Penicillium canescens*. **Mycopathologia**, v. 163, n. 5, p.295-301, 12 abr. 2007.

OSÓRIO, G. T.; OLIVEIRA, B. S.; Di PIERO, R. M. Effect of fumigants on blue and gray molds of apple fruit. **Tropical Plant Pathology**. Brasília, v. 38, n. 1, Jan./Feb. 2013. DOI:



Universidade Estadual do Norte do Paraná - UENP

Criada pela Lei Estadual nº 15.300/06 – Autorizada pelo Decreto Estadual nº 3909/08

CAMPUS LUIZ MENEGHEL
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE MESTRADO EM AGRONOMIA
BR 369 KM 54 (43) 3542-8053

<<http://dx.doi.org/10.1590/S1982-56762013000100010>>. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1982-56762013000100010>. Acesso em: 06 out. 2019.

PENICILLIUM. In: WIKIPÉDIA: a enciclopédia livre. Wikimedia, 2019. Disponível em: <<https://pt.wikipedia.org/wiki/Penicillium>>. Acesso em: 6 out. 2019.

PINHEIRO, R. A.; DUARTE, V. C. B.; BEVILAQUA, G. A. P.; ANTUNES, I. F. Efeito de preparados homeopáticos no vigor de sementes e desenvolvimento de plântulas de feijão. **Revista de Ciências Agrárias**. Lisboa, v. 42, n. 2, jun. 2019. DOI: <<http://dx.doi.org/10.19084/RCA.15209>>. Disponível em: <http://www.scielo.mec.pt/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0871-018X2019000200009&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 06 out. 2019.

RANCIC, A. et al. Isolation and structural elucidation of two secondary metabolites from the filamentous fungus *Penicillium ochrochloron* with antimicrobial activity. **Environmental Toxicology And Pharmacology**, v. 22, n. 1, p.80-84, jul. 2006.

REETHA, S. et al. Isolation of indole acetic acid (IAA) producing rhizobacteria of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* and enhance growth of onion (*Allium cepa* L.). **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 2, n. 3, p. 568–574, 2014.

REIS, E. M.; BRESOLIN, A. C. R.; CARMONA, M. **Doenças da soja I: Ferrugem-asiática**. 1. ed. Passo Fundo: Editora Universidade de Passo Fundo, 2006. v. I. 48 p.

REIS, E. M. et al. Ferrugem-asiática. In: REIS, E. M.; CASA, R. T. (Org.). **Doenças da Soja: etiologia, sintomatologia, diagnose e manejo integrado**. Passo Fundo: Berthier, 2012. p. 69-101. Tradução de Erlei Melo Reis.

ROSA, C. R. E. da; SPEHAR, C. R.; LIU, J. Q. Asian Soybean Rust Resistance: An Overview. **Journal of Plant Pathology & Microbiology**, v. 06, n. 09, p.1-7, 2015.

SAKSIRIRAT, W.; HOPPE, H. H. Light-and scanning electron microscopic studies on the development of the mycoparasite *Verticillium psalliotae* Treschow on uredospores of the soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi* Syd.). **J. Phytopathol.**, v. 128, p. 340-344, 1990.

SARGS - Sociedade de Agronomia do Rio Grande do Sul. **Embrapa lista produtos para controle biológico**. Disponível em: <<https://www.sargs.com.br/noticias/embrapa-lista-produtos-para-controle-biologico/>>. Acesso em: 27 set. 2019.



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

SILVA, A. C. et al. Essential oils from *Hyptis marrubioides*, *Aloysia gratissima* and *Cordia verbenacea* reduce the progress of Asian soybean rust. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 36, n. 2, p.159, 29 abr. 2014.

SRIVASTAVA, P. et al. Saccharin-induced systemic acquired resistance against rust (*Phakopsora pachyrhizi*) infection in soybean: Effects on growth and development. **Crop Protection**, v. 30, n. 6, p.726-732, jun. 2011.

STEFANELLO, M. T.; MARQUES, L. N.; PINTO, F. F.; RAMOS, J. P.; CADORE, P. C.; BALARDIN, R. S. Dinâmica do controle químico de *Phakopsora pachyrhizi* em plantas de soja submetidas a diferentes regimes hídricos. **Arquivos do Instituto Biológico**. São Paulo, v. 83, jan 2016. DOI: <<http://dx.doi.org/10.1590/1808-1657000792014>>. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1808-16572016000100227&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 06 out. 2019.

USDA. United States Department Of Agriculture. **Production, Supply and Distribution**. 2019. Disponível em: <<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/app/index.html#/app/downloads>>. Acesso em: 06 out. 2019.

WAQAS, M. et al. Endophytic fungi promote plant growth and mitigate the adverse effects of stem rot: an example of *Penicillium citrinum* and *Aspergillus terreus*. **Journal of Plant Interactions**, v. 10, n. 1, p.280-287, jan. 2015.

WARD, N. A. et al. Effects of *Simplicillium lanosoniveum* on *Phakopsora pachyrhizi*, the Soybean Rust Pathogen, and Its Use as a Biological Control Agent. **Phytopathology**, v. 102, n. 8, p.749-760, ago. 2012.

WARD, N. A., SCHNEIDER, R. W., AIME, M. C. Colonization of soybean rust sori by *Simplicillium lanosoniveum*. **Fungal Ecology**, v. 4, n. 5, p.303-308, out. 2011.

White, T.J. et al. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. **PCR Protocols, a Guide to Methods and Applications**, v. 38, p. 315-322, 1990.

WIGHTWICK, A. et al. Environmental Risks of Fungicides Used in Horticultural Production Systems. **Fungicides**, p.273-304, 14 dez. 2010.



Universidade Estadual do Norte do Paraná - UENP

Criada pela Lei Estadual nº 15.300/06 – Autorizada pelo Decreto Estadual nº 3909/08

CAMPUS LUIZ MENEGHEL
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE MESTRADO EM AGRONOMIA
BR 369 KM 54 (43) 3542-8053

YAMANAKA, N. et al. Development of classification criteria for resistance to soybean rust and differences in virulence among Japanese and Brazilian rust populations. **Tropical Plant Pathology**, v. 35 (3), p.153-162, May-June 2010.

YORINORI, J. T. et al. Epidemics of Soybean Rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Brazil and Paraguay from 2001 to 2003. **Plant Disease**, v. 89, n. 6, p.675-677, jun. 2005.

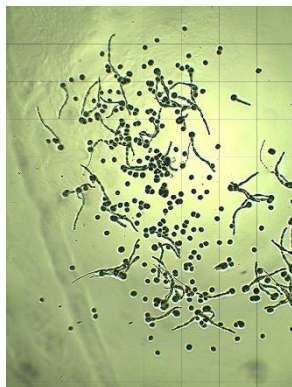
YUAN, Z.W. et al. Pathogenicity to willow rust, *Melampsora epitea*, of the mycoparasite *Sphaerellopsis filum* from different sources. **Mycological Research**, v. 103, n. 4, p.509-512, abr. 1999.

ZARE, R.; GAMS, W. A revision of *Verticillium* section Prostrata. IV. The genera *Lecanicillium* and *Simplicillium* gen. nov. **Nova Hedwigia**, Stuttgart, v. 73, p. 1-50, 2001.

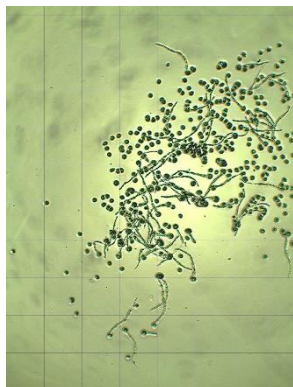
APÊNDICES

APÊNDICE A**TESTE DE GERMINAÇÃO EM PLACA 48 POÇOS (2)**

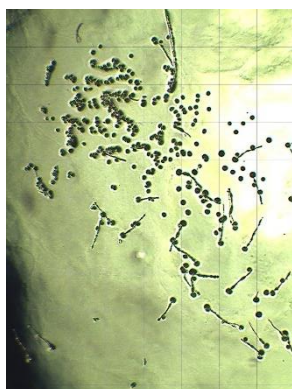
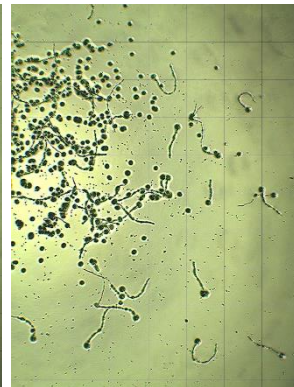
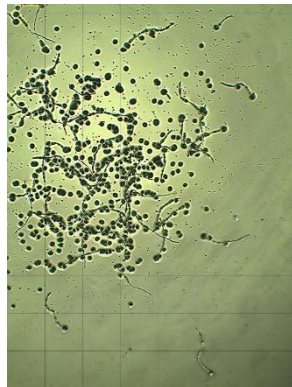
Imagens da contagem do número de esporos germinados de *P. pachyrhizi*, utilizando se microscópio invertido com câmera fotográfica (aumento de 100x) após over-night.



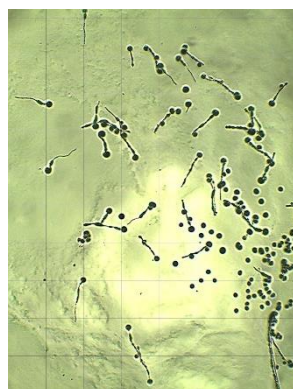
Testemunha



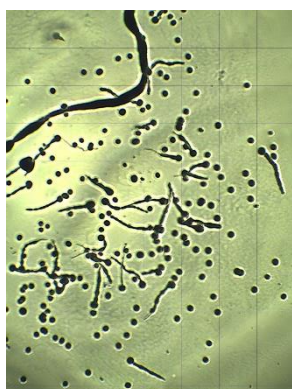
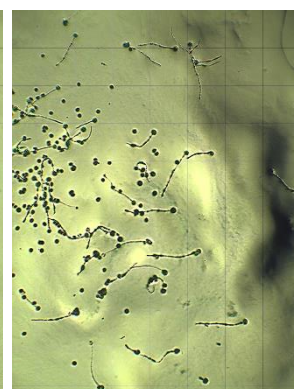
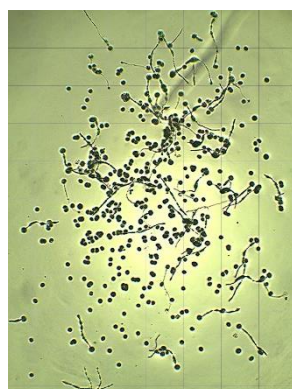
Suspensão de esporos



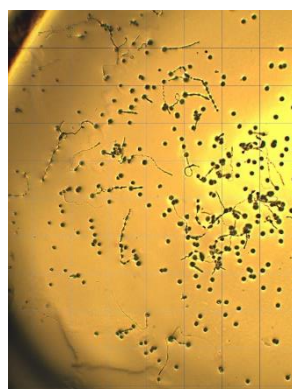
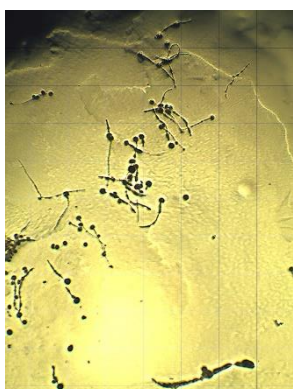
Sobrenadante D 1:10



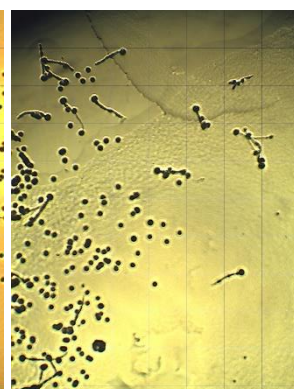
Sobrenadante D 1:100

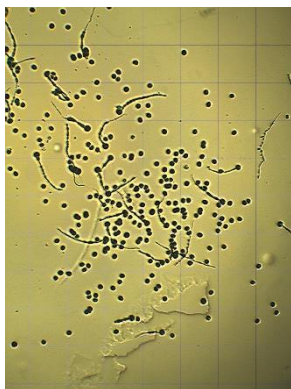


Sobrenadante D 1:1000

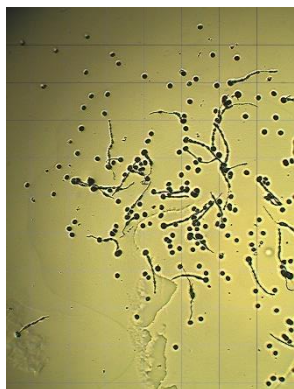


Sobrenadante filtrado D 1:10

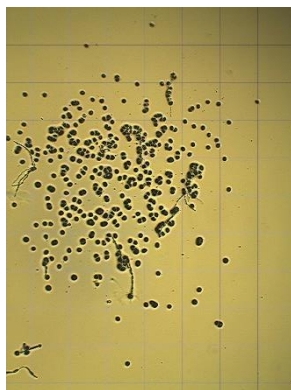
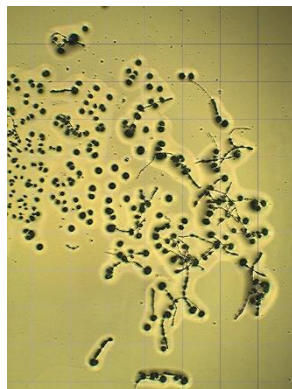
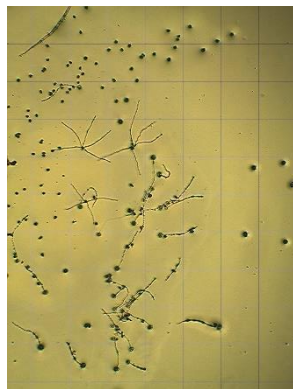




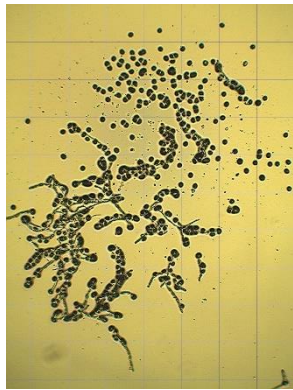
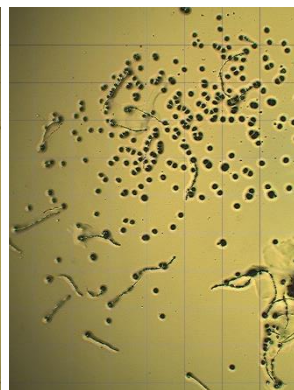
Sobrenadante filtrado D 1:100



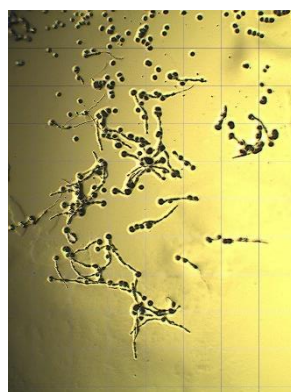
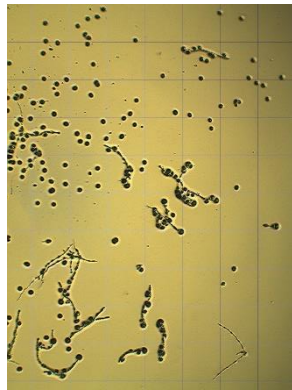
Sobrenadante filtrado D 1:1000



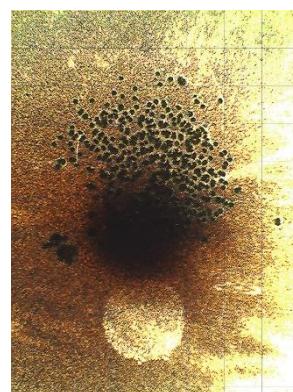
Sobrenadante filtrado e autoclavado
D 1:10



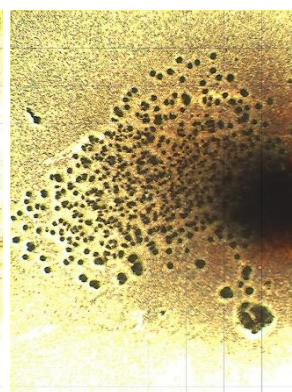
Sobrenadante filtrado e autoclavado
D 1:100



Sobrenadante filtrado e autoclavado
D 1:1000



Status® – 0,5:100

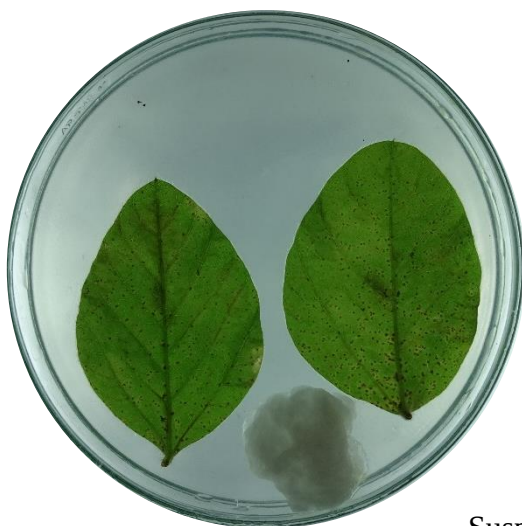


APÊNDICE B**ENSAIO EM FOLHAS DESTACADAS CULTIVADAS EM PLACAS DE PETRI (2)**

Imagens das folhas destacadas 15 dias após aplicação dos tratamentos e inoculação de *P. pachyrhizi*.



Testemunha



Suspensão de esporos



Sobrenadante D 1:5



Sobrenadante D 1:10



Sobrenadante D 1:100



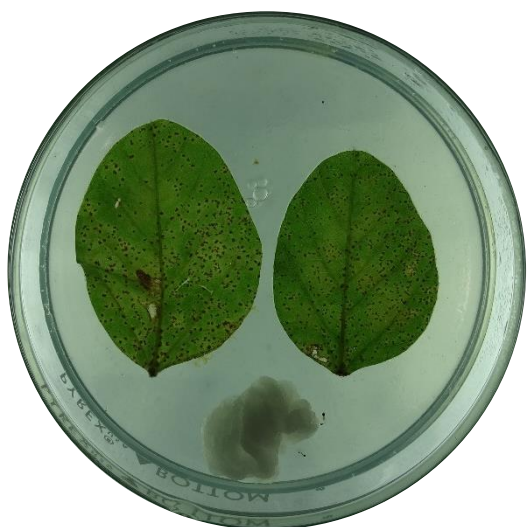
Sobrenadante D 1:1000



Sobrenadante filtrado
D 1:5



Sobrenadante filtrado
D 1:10



Sobrenadante filtrado
D 1:100





Sobrenadante filtrado
D 1:1000



Sobrenadante filtrado e
autoclavado – D 1:5



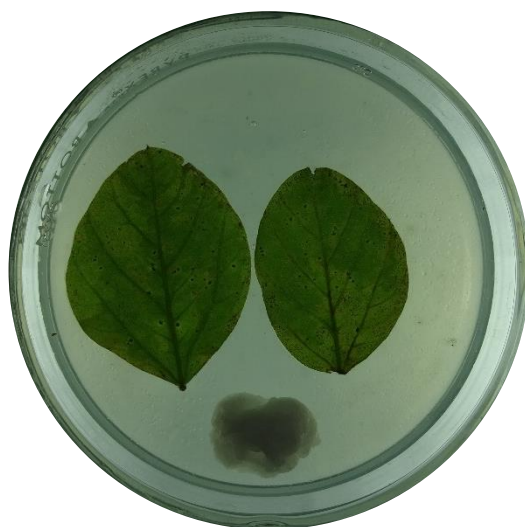
Sobrenadante filtrado e
autoclavado – D 1:10



Sobrenadante filtrado e
autoclavado – D 1:100



Sobrenadante filtrado e
autoclavado – D 1:1000



Status® – 0,5:100



“Falso inoculado”

APÊNDICE C**ENSAIO EM CASA DE VEGETAÇÃO**

Imagens folhas das plantas de soja 36 dias após estabelecimento do experimento.



Testemunha



Suspensão de esporos



Sobrenadante - D 1:5



Sobrenadante - D 1:10



Sobrenadante - D 1:100



Sobrenadante - D 1:1000



Sobrenadante filtrado
D 1:5



Sobrenadante filtrado
D 1:10



Sobrenadante filtrado
D 1:100



Sobrenadante filtrado
D 1:1000



Sobrenadante filtrado e autoclavado - D
1:5



Sobrenadante filtrado e autoclavado - D
1:10



Sobrenadante filtrado e autoclavado - D
1:100



Sobrenadante filtrado e autoclavado - D
1:1000



Status® – 0,5:100

ANEXO

ANEXO A

ANÁLISES ESTATÍSTICAS

1. Teste de germinação em placa de Petri: % esporos germinados

Tratamento	Repetição 1	Repetição 2	Repetição 3	Repetição 4	Repetição 5	Média	
Tret. 01	21,20	26,36	27,63	26,26	28,39	25,968	
Tret. 02	12,41	15,50	15,09	17,88	18,64	15,904	
Tret. 03	15,38	13,67	14,61	14,67	19,06	15,478	
Tret. 04	12,25	9,06	8,27	8,97	14,82	10,674	
Tret. 05	8,49	6,69	11,76	8,28	12,07	9,458	
Tret. 06	0,15	0,30	1,54	0,25	0,10	0,468	
Causa da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	F (5%)	F (1%)	
Tratamentos	5	1788,74685666667	357,749371333333	67,0406319726752	2,62065175701643	3,89505596362561	significativo (1%)
Resíduo	24	128,07136	5,33630666666667				
Total	29	1916,81821666667					
C.V.	17,78%						

Tratamento	Média	Repetições	Scott-Knott	Tukey	Duncan
Tret. 01	25,968	5	a	a	a
Tret. 02	15,904	5	b	b	b
Tret. 03	15,478	5	b	b	b
Tret. 04	10,674	5	c	c	c
Tret. 05	9,458	5	c	c	c
Tret. 06	0,468	5	d	d	d

2. Teste de germinação em placa 48 poços (1): % esporos germinados

Tratamento	Repetição 1	Repetição 2	Repetição 3	Repetição 4	Repetição 5	Média	
Tret. 01	21,72	21,66	20,88	21,15	20,96	21,274	
Tret. 02	20,99	21,12	20,76	21,86	21,01	21,148	
Tret. 03	17,73	17,65	17,78	18,25	18,12	17,906	
Tret. 04	14,69	15,01	14,58	15,54	14,51	14,866	
Tret. 05	14,38	14,68	14,19	13,39	14,66	14,26	
Tret. 06	0,45	0,10	0,00	0,05	0,05	0,13	
Causa da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	F (5%)	F (1%)	
Tratamentos	5	1536,29714666667	307,259429333333	2073,71860384023	2,62065175701643	3,89505596362561	significativo (1%)
Resíduo	24	3,55604	0,148168333333333				
Total	29	1539,85318666667					
C.V.	2,58%						

Tratamento	Média	Repetições	Scott-Knott	Tukey	Duncan
Tret. 01	21,274	5	a	a	a
Tret. 02	21,148	5	a	a	a
Tret. 03	17,906	5	b	b	b
Tret. 04	14,866	5	c	c	c
Tret. 05	14,26	5	d	c	d
Tret. 06	0,13	5	e	d	e

3. Teste de germinação em placa 48 poços (2): % esporos germinados

Tratamento	Repetição 1	Repetição 2	Repetição 3	Repetição 4	Repetição 5	Média	
Tret. 01	12,50	13,39	13,37	11,58	12,83	12,734	
Tret. 02	8,45	6,14	6,56	6,77	6,28	6,84	
Tret. 03	10,61	10,41	10,59	10,82	11,14	10,714	
Tret. 04	8,20	8,38	7,55	8,01	7,16	7,86	
Tret. 05	8,78	8,29	9,08	8,43	8,98	8,712	
Tret. 06	0,95	0,05	0,05	0,05	0,05	0,23	
Causa da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	F (5%)	F (1%)	
Tratamentos	5	459,417896666667	91,8835793333333	271,145652975807	2,62065175701643	3,89505596362561	significativo (1%)
Resíduo	24	8,13292	0,338871666666667				
Total	29	467,550816666667					
C.V.	7,42%						

Tratamento	Média	Repetições	Scott-Knott	Tukey	Duncan
Tret. 01	12,734	5	a	a	a
Tret. 03	10,714	5	b	b	b
Tret. 05	8,712	5	c	c	c
Tret. 04	7,86	5	d	cd	d
Tret. 02	6,84	5	e	d	e
Tret. 06	0,23	5	f	e	f

4. Média ensaios em placa: % esporos germinados

Tratamento	Repetição 1	Repetição 2	Repetição 3	Repetição 4	Repetição 5	Média	
Treat. 01	19,47	20,80	20,63	21,00	18,06	19,992	
Treat. 02	14,62	14,92	13,47	15,17	15,31	14,698	
Treat. 03	14,24	13,91	13,99	14,25	17,10	14,698	
Treat. 04	11,72	10,82	9,80	10,84	12,50	11,136	
Treat. 05	10,88	9,55	11,68	10,03	11,90	10,808	
Treat. 06	0,13	0,15	0,15	0,12	0,90	0,29	
Causa da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	F (5%)	F (1%)	
Tratamentos	5	1088,49059	217,698118	214,748546710925	2,62065175701643	3,895055596362561	significativo (1%)
Resíduo	24	24,32964	1,013735				
Total	29	1112,82023					
C.V.	8,43%						

Tratamento	Média	Repetições	Scott-Knott	Tukey	Duncan
Treat. 01	19,992	5	a	a	a
Treat. 03	14,698	5	b	b	b
Treat. 02	14,698	5	b	b	b
Treat. 04	11,136	5	c	c	c
Treat. 05	10,808	5	c	c	c
Treat. 06	0,29	5	d	d	d

5. Folhas destacadas cultivadas em placas de Petri (1): AACPD

Tratamento	Bloco 1	Bloco 2	Bloco 3	Bloco 4	Bloco 5	Média	
Treat. 01	1475	1557	1499	1454	1521	1501,2	
Treat. 02	994	983	916	991	933	963,4	
Treat. 03	1096	1063	1070	1014	1024	1053,4	
Treat. 04	785	775	839	771	828	799,6	
Treat. 05	906	916	946	881	928	915,4	
Treat. 06	47	47	30	58	30	42,4	
Causa da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	F (5%)	F (1%)	
Blocos	4	2853,53333333333	713,383333333333	0,700106971464462	2,86606235099939	4,43057690927988	não significativo
Tratamentos	5	5661000,56666667	1132200,11333333	1111,12939621642	2,71088726676849	4,10266945508757	significativo (1%)
Resíduo	20	20379,2666666667	1018,96333333333				
Total	29	5684233,36666667					
C.V.	3,63%						

Tratamento	Média	Repetições	Scott-Knott	Tukey	Duncan
Treat. 01	1501,2	5	a	a	a
Treat. 03	1053,4	5	b	b	b
Treat. 02	963,4	5	c	c	c
Treat. 05	915,4	5	d	c	d
Treat. 04	799,6	5	e	d	e
Treat. 06	42,4	5	f	e	f

6. Folhas destacadas cultivadas em placas de Petri (2): AACPD

Tratamento	Bloco 1	Bloco 2	Bloco 3	Bloco 4	Bloco 5	Média	
Treat. 01	423	426	468	413	447	435,4	
Treat. 02	362	403	408	350	354	375,4	
Treat. 03	318	310	293	351	342	322,8	
Treat. 04	323	303	340	308	327	320,2	
Treat. 05	364	350	342	368	379	360,6	
Treat. 06	28	26	12	25	42	26,6	
Causa da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	F (5%)	F (1%)	
Blocos	4	786,333333333333	196,583333333333	0,451393406862558	2,86606235099939	4,43057690927988	não significativo
Tratamentos	5	515429,766666667	103085,953333333	236,705314157565	2,71088726676849	4,10266945508757	significativo (1%)
Resíduo	20	8710,06666666667	435,503333333333				
Total	29	524926,166666667					
C.V.	6,80%						

Tratamento	Média	Repetições	Scott-Knott	Tukey	Duncan
Treat. 01	435,4	5	a	a	a
Treat. 02	375,4	5	b	b	b
Treat. 05	360,6	5	b	bc	b
Treat. 03	322,8	5	c	c	c
Treat. 04	320,2	5	c	c	c
Treat. 06	26,6	5	d	d	d

7. Média ensaios folhas destacadas cultivadas em placas de Petri: AACPD

Tratamento	Bloco 1	Bloco 2	Bloco 3	Bloco 4	Bloco 5	Média	
Treat. 01	949	991	983	933	984	968	
Treat. 02	648	658	692	701	648	669,4	
Treat. 03	707	706	681	662	683	687,8	
Treat. 04	559	539	584	539	577	559,6	
Treat. 05	635	633	644	624	653	637,8	
Treat. 06	37	36	23	39	36	34,2	
Causa da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	F (5%)	F (1%)	
Blocos	4	1179,46666666667	294,866666666667	0,755358210229699	2,86606235099939	4,43057690927988	não significativo
Tratamentos	5	2354144	470828,8	1206,11937494663	2,71088726676849	4,10266945508757	significativo (1%)
Resíduo	20	7807,33333333333	390,366666666667				
Total	29	2363130,8					
C.V.	3,33%						

Tratamento	Média	Repetições	Scott-Knott	Tukey	Duncan
Treat. 01	968	5	a	a	a
Treat. 03	687,8	5	b	b	b
Treat. 02	669,4	5	b	bc	b
Treat. 05	637,8	5	c	c	c
Treat. 04	559,6	5	d	d	d
Treat. 06	34,2	5	e	e	e

8. Casa de vegetação: AACPD

Tratamento	Bloco 1	Bloco 2	Bloco 3	Bloco 4	Bloco 5	Média	
Treat. 01	1041	1089	1085	1078	1033	1065,2	
Treat. 02	757	790	795	803	798	788,6	
Treat. 03	842	868	871	878	885	868,8	
Treat. 04	967	933	977	999	946	964,4	
Treat. 05	947	914	942	959	933	939	
Treat. 06	765	739	769	783	761	763,4	
Causa da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	F (5%)	F (1%)	
Blocos	4	3990,86666666667	997,716666666667	3,32442938857111	2,86606235099939	4,43057690927988	significativo (5%)
Tratamentos	5	324918,166666667	64983,6333333333	216,527905814405	2,71088726676849	4,10266945508757	significativo (1%)
Resíduo	20	6002,33333333333	300,116666666667				
Total	29	334911,366666667					
C.V.	1,93%						

Tratamento	Média	Repetições	Scott-Knott	Tukey	Duncan
Treat. 01	1065,2	5	a	a	a
Treat. 04	964,4	5	b	b	b
Treat. 05	939	5	c	b	c
Treat. 03	868,8	5	d	c	d
Treat. 02	788,6	5	e	d	e
Treat. 06	763,4	5	f	d	f

9. Campo: AACPD

Tratamento	Bloco 1	Bloco 2	Bloco 3	Bloco 4	Média		
Treat. 01	1039	1056	1072	1055	1055,5		
Treat. 02	908	933	876	881	899,5		
Treat. 03	945	933	957	972	951,75		
Treat. 04	965	939	941	913	939,5		
Treat. 05	716	664	707	681	692		
Causa da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	F (5%)	F (1%)	
Blocos	3	582,95	194,316666666667	0,392110042375731	3,48999000731737	5,95049565949804	não significativo
Tratamentos	4	285560,8	71390,2	144,0577117105	3,25914205104244	5,41178663381546	significativo (1%)
Resíduo	12	5946,8	495,566666666667				
Total	19	292090,55					
C.V.	2,45%						

Tratamento	Média	Repetições	Scott-Knott	Tukey	Duncan
Treat. 01	1055,5	4	a	a	a
Treat. 03	951,75	4	b	b	b
Treat. 04	939,5	4	b	bc	b
Treat. 02	899,5	4	c	c	c
Treat. 05	692	4	d	d	d

10. Teste de germinação em placa de Petri: % de controle

Causa da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	F (5%)	F (1%)	
Tratamentos	5	29839,916	5967,9832	8273,54417744917	2,62065175701643	3,89505596362561	significativo (1%)
Resíduo	24	17,312	0,721333333333333				
Total	29	29857,228					
C.V.	1,50%						

Tratamento	Média	Repetições	Scott-Knott	Tukey	Duncan
Trat. 06	98,96	5	a	a	a
Trat. 05	79,12	5	b	b	b
Trat. 04	64,08	5	c	c	c
Trat. 03	60,46	5	d	d	d
Trat. 02	35,96	5	e	e	e
Trat. 01	0,3	5	f	f	f

11. Teste de germinação em placa 48 poços (1): % de controle

Causa da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	F (5%)	F (1%)	
Tratamentos	5	30947,552	6189,5104	12041,8490272373	2,62065175701643	3,89505596362561	significativo (1%)
Resíduo	24	12,336	0,514				
Total	29	30959,888					
C.V.	2,12%						

Tratamento	Média	Repetições	Scott-Knott	Tukey	Duncan
Trat. 06	99,72	5	a	a	a
Trat. 05	32,16	5	b	b	b
Trat. 04	32,02	5	b	b	b
Trat. 03	31,58	5	b	b	b
Trat. 02	7,16	5	c	c	c
Trat. 01	0,28	5	d	d	d

12. Teste de germinação em placa 48 poços (2): % de controle

Causa da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	F (5%)	F (1%)	
Tratamentos	5	28479,643	5695,9286	10284,5535961481	2,62065175701643	3,89505596362561	significativo (1%)
Resíduo	24	13,292	0,553833333333333				
Total	29	28492,935					
C.V.	1,91%						

Tratamento	Média	Repetições	Scott-Knott	Tukey	Duncan
Trat. 06	100	5	a	a	a
Trat. 02	47,02	5	b	b	b
Trat. 04	35,86	5	c	c	c
Trat. 05	30,04	5	d	d	d
Trat. 03	21,12	5	e	e	e
Trat. 01	0,26	5	f	f	f

13. Média ensaios em placa: % de controle

Causa da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	F (5%)	F (1%)	
Tratamentos	5	25978,0746666667	5195,61493333333	7051,27563899571	2,62065175701643	3,89505596362561	significativo (1%)
Resíduo	24	17,684	0,736833333333333				
Total	29	25995,7586666667					
C.V.	1,99%						

Tratamento	Média	Repetições	Scott-Knott	Tukey	Duncan
Trat. 06	99,36	5	a	a	a
Trat. 05	47,16	5	b	b	b
Trat. 04	43,98	5	c	c	c
Trat. 03	37,7	5	d	d	d
Trat. 02	30,9	5	e	e	e
Trat. 01	0,26	5	f	f	f

14. Folhas destacadas cultivadas em placas de Petri (1): % de controle

Causa da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	F (5%)	F (1%)	
Blocos	4	1,72533333333333	0,431333333333332	0,649516877901867	2,86606235099939	4,43057690927988	não significativo
Tratamentos	5	25372,8154166667	5074,56308333333	7641,45526414857	2,71088726676849	4,10266945508757	significativo (1%)
Resíduo	20	13,2816666666667	0,664083333333334				
Total	29	25387,8224166667					
C.V.	2,02%						

Tratamento	Média	Repetições	Scott-Knott	Tukey	Duncan
Trat. 06	97,17	5	a	a	a
Trat. 05	42,02	5	b	b	b
Trat. 04	41,74	5	b	b	b
Trat. 02	35,63	5	c	c	c
Trat. 03	25,63	5	d	d	d
Trat. 01	0,32	5	e	e	e

15. Folhas destacadas cultivadas em placas de Petri (2): % de controle

Causa da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	F (5%)	F (1%)	
Blocos	4	1,57333333333334	0,393333333333334	0,703721374045804	2,86606235099939	4,43057690927988	não significativo
Tratamentos	5	26706,4896666667	5341,29793333333	9556,23437500001	2,71088726676849	4,10266945508757	significativo (1%)
Resíduo	20	11,1786666666667	0,558933333333333				
Total	29	26719,2416666667					
C.V.	2,29%						

Tratamento	Média	Repetições	Scott-Knott	Tukey	Duncan
Trat. 06	93,9	5	a	a	a
Trat. 03	39,38	5	b	b	b
Trat. 04	25,44	5	c	c	c
Trat. 05	22,54	5	d	d	d
Trat. 02	14,18	5	e	e	e
Trat. 01	0,26	5	f	f	f

16. Média ensaios folhas destacadas cultivadas em placas de Petri: % de controle

Causa da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	F (5%)	F (1%)	
Blocos	4	3,20333333333332	0,800833333333331	0,985964624286942	2,86606235099939	4,43057690927988	não significativo
Tratamentos	5	24872,5186666667	4974,50373333333	6124,47621783559	2,71088726676849	4,10266945508757	significativo (1%)
Resíduo	20	16,2446666666667	0,812233333333334				
Total	29	24891,9666666667					
C.V.	2,47%						

Tratamento	Média	Repetições	Scott-Knott	Tukey	Duncan
Trat. 06	95,56	5	a	a	a
Trat. 04	33,6	5	b	b	b
Trat. 03	32,52	5	b	b	bc
Trat. 05	32,3	5	b	b	c
Trat. 02	24,92	5	c	c	d
Trat. 01	0,3	5	d	d	e

17. Casa de vegetação: % de controle

Causa da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	F (5%)	F (1%)	
Blocos	4	0,795333333333334	0,198833333333333	0,309982850906823	2,86606235099939	4,43057690927988	não significativo
Tratamentos	5	2524,96966666667	504,993933333333	787,289819674687	2,71088726676849	4,10266945508757	significativo (1%)
Resíduo	20	12,8286666666667	0,641433333333333				
Total	29	2538,59366666667					
C.V.	5,53%						

Tratamento	Média	Repetições	Scott-Knott	Tukey	Duncan
Trat. 06	25,64	5	a	a	a
Trat. 02	25,2	5	a	a	a
Trat. 05	15,52	5	b	b	b
Trat. 03	13,6	5	c	c	c
Trat. 04	6,64	5	d	d	d
Trat. 01	0,26	5	e	e	e

18. Campo: % de controle

Causa da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	F (5%)	F (1%)	
Blocos	3	4,042	1,34733333333333	2,7741935483871	3,48999000731737	5,95049565949804	não significativo
Tratamentos	4	2315,112	578,778	1191,71859986273	3,25914205104244	5,41178663381546	significativo (1%)
Resíduo	12	5,828	0,48566666666667				
Total	19	2324,982					
C.V.	4,32%						

Tratamento	Média	Repetições	Scott-Knott	Tukey	Duncan
Trat. 05	34,175	4	a	a	a
Trat. 04	16,125	4	b	b	b
Trat. 03	15,275	4	b	b	bc
Trat. 02	14,775	4	b	b	c
Trat. 01	0,3	4	c	c	d

