

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Potencial de isolados de *Metarhizium* spp. no controle alternativo da
ferrugem-asiática da soja**

Sabrina Holz

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra
em Ciências. Área de concentração: Fitopatologia

**Piracicaba
2020**

Sabrina Holz
Engenheira Agrônoma

Potencial de isolados de *Metarhizium* spp. no controle da ferrugem-asiática da soja
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **SÉRGIO FLORENTINO PASCHOLATI**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra
em Ciências. Área de concentração: Fitopatologia

Piracicaba
2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Holz, Sabrina

Potencial de isolados de *Metarhizium* spp. no controle alternativo da ferrugem-asiática da soja / Sabrina Holz. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2020.

92 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

1. Ferrugem-asiática 2. Fungos entomopatogênicos 3. Biocontrole 4. Soja 5. Controle biológico 6. Indução de resistência I. Título

*Aos meus pais, Ademir e Eliane,
por toda educação, oração, amor e apoio as minhas escolhas;
Ao meu irmão Ricardo, pelo carinho e afeto.*

Dedico

*A Deus, pela presença constante em minha vida,
A Maria, minha mãezinha do céu, quem intercede por nós, acalma meu
coração e passa na frente diante das dificuldades.*

Ofereço

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida e por seu amor incondicional pelos seus filhos. A Mãe Rainha, por estar comigo em todos os momentos de minha vida.

Agradeço ao Prof. Sérgio Florentino Pascholati, pela orientação, dedicação e as oportunidades. Agradeço a paciência e disponibilidade por me atender quando precisasse, em especial pela confiança depositada e pelo incentivo ao intercâmbio.

Ao Prof. Dr. Italo Delalibera Jr. e a Dra. Celeste Paola D'Alessandro pela oportunidade de trabalho junto ao Laboratório de Patologia e Controle Microbiano do Departamento de Entomologia da Esalq. Agradeço pela co-orientação, em especial da Dra. Celeste, pelas palavras e pensamento positivos e quem sempre esteve disposta a me ajudar e auxiliar no trabalho.

Ao Prof. Dr. Zhi-Yuan Chen, da Louisiana State University (LSU), agradeço por ter me aceitado em seu laboratório, pelos conhecimentos transmitidos e todo trabalho realizado. Agradeço também ao Prof. Dr. Ely de Oliveira Garcia, pela acolhida e suporte durante o intercâmbio.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro no início do curso do mestrado e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão de bolsa de mestrado no país (processo nº 18/18393-2) e pela bolsa de estágio no exterior (BEPE-processo nº 19/19767-6). Agradeço também ao programa Sparcbio (São Paulo Advanced Research Center for Biological Control) projeto Fapesp (2018/02317-5).

A Profa. Dra. Clarice Garcia Borges Demetrio do Departamento de Ciências Exatas, junto com seu aluno doutorando Eduardo Elias Ribeiro Junior, agradeço grandiosamente o auxílio nas análises estatísticas.

Agradeço, a todos do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano, com a disponibilidade de espaço e uso de materiais e equipamentos, em especial, a técnica laboratorial Solange Aparecida Vieira Barros, por todo suporte no uso do laboratório.

Aos colegas do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Fitopatológica, Victor Hugo Moura de Souza, Samuel de Paula, Ruan Navarro Furtado, Janaína Barreta, Suzani Paz, Daniel Grossi, Mariana Colli, Daniele Cristina Fontana e Ronaldo Dalio agradeço pelo convívio diário, pelas risadas e por deixarem o ambiente de trabalho descontraído, em especial a Tainara Menegassi e Samuel de Paula pela ajuda na condução de experimentos.

Agradeço ao Department of Plant Pathology and Crop Physiology da LSU, pela tão afetuosa acolhida. Aos alunos do “Dr. Chen’s lab”, a Olanike Omolehin, Yenjit Raruang e

Maria Izabel Costa de Novaes agradeço grandiosamente pela ajuda que me foi dada, carinho, amizade e por terem me acolhido tão bem durante minha estadia. Vocês são pessoas excepcionais e que eu guardarei em meu coração para o resto da vida.

Ao Departamento de Fitopatologia e Nematologia da ESALQ/USP, a todos os professores, pelos ensinamentos repassados e também a todos os funcionários que sempre estavam dispostos a nos ajudar e auxiliar, especialmente a senhora Fabiana Wolak.

A todos os colegas, mestrandos e doutorandos do Departamento.

As minhas amigas que estão sempre no meu coração, Samara Perissato, Marinara Vitorim, Ana Claudia Casagrande e Luisa Baccin, obrigada pela amizade de cada uma mesmo na distância. Especialmente a Jéssica Iara da Costa e ao Jonatan Arantes, obrigada pelas orações e por tanto zelo e carinho por nossa amizade.

Aos meus amigos que Deus foi me dando aos poucos, eu agradeço imensamente por cada palavra de incentivo, pela positividade, parceria e companheirismo. Amigos são anjos enviados por Deus para compartilhar com nós eternos momentos de felicidade. A vocês, Karla Kudlawiec, Wesler Marcelino, Manoel Gonçalves, Kelly Pazolini, Isabela Primiano, Tainara Menegassi e aos meus queridos amigos da velha guarda, obrigada por me acolherem!

Ao meu namorado, Alexandre, obrigada pela paciência, compreensão e por não medir esforços em me ajudar quando necessário, sou eternamente grata pelas suas palavras, conselhos e por todo cuidado comigo.

Aos meus pais, que tanto amo, Eliane e Ademir, obrigada pela forma que me criaram, e por toda oração dedicada a mim. Ao meu irmão Ricardo e minha cunhada Pamela e a todos os meus familiares, pelas palavras de conforto e amparo.

A Profa. Dra. Vivian Carré Missio e ao Prof. Dr. Roberto Luis Portz, em que desde a graduação não me deixaram desanimar, me incentivando e apoiando a pesquisa científica.

A todos que de alguma forma, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

A todos, os meus sinceros agradecimentos!!!

“Nunca, jamais, desanimeis, embora venham ventos contrários”

Madre Paulina

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1. A cultura da soja [<i>Glycine max</i> (L.) Merr.]	17
2.2. Ferrugem-asiática da soja	17
2.3. Controle biológico e a indução de resistência	23
2.4. Fungo entomopatogênico: <i>Metarhizium</i> spp.	27
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1. Obtenção das plantas de soja.....	31
3.2. Obtenção e manutenção do inóculo de <i>P. pachyrhizi</i>	31
3.3. Obtenção e manutenção dos isolados de <i>Metarhizium</i> spp.	32
3.4. Produção e preparo dos agentes utilizados nos tratamentos.....	33
3.4.1. Obtenção das preparações de <i>Metarhizium</i> spp.....	33
3.4.2. Suspensão de conídios de <i>Metarhizium</i> spp.	33
3.4.3. Produção do filtrado de cultivo de <i>Metarhizium</i> livre de estruturas fúngicas	33
3.4.4. Controle negativo	34
3.4.5. Controle positivo – efeito fungicida	34
3.4.6. Controle positivo – efeito indutor de resistência	34
3.5. Experimentos realizados.....	35
3.5.1. Testes <i>in vitro</i>	35
3.5.1.1. Efeito direto dos agentes sobre a germinação de urediniósporos de <i>P. pachyrhizi</i>	35
3.5.2. Testes <i>in vivo</i>	36
3.5.2.1. Efeito indireto dos agentes aplicados em folíolos destacados de soja no controle da ferrugem-asiática em condições de laboratório	36
3.5.2.2. Efeito indireto dos agentes aplicados via aérea em plantas de soja no controle de ferrugem-asiática em condições de casa de vegetação	38

3.5.2.3. Efeito das suspensões de conídios de <i>Metarhizium</i> spp. inoculadas no substrato, no controle da ferrugem-asiática em plantas de soja mantidas em casa de vegetação	41
3.5.3. Análises de PCR quantitativo	42
3.5.3.1. Delineamento experimental, inoculação e coleta de amostras para o ensaio de qPCR	43
3.5.3.2. Extração de DNA	44
3.5.3.3. Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)	45
3.5.4. Caracterização dos metabólitos presentes nos filtrados de <i>Metarhizium</i> spp	46
4. RESULTADOS	49
4.1. Testes <i>in vitro</i>	49
4.1.1. Efeito direto dos agentes sobre a germinação de urediniósporos de <i>P. pachyrhizi</i>	49
4.2. Testes <i>in vivo</i>	52
4.2.1. Efeito indireto dos agentes aplicados em folíolos destacados de soja no controle de ferrugem-asiática em condições de laboratório	52
4.2.2. Efeito indireto dos agentes aplicados via aérea em plantas de soja no controle de ferrugem-asiática em condições de casa de vegetação	54
4.2.3. Efeito de suspensões de conídios de <i>Metarhizium</i> spp. inoculados no substrato, no controle de ferrugem-asiática em plantas de soja mantidas em casa de vegetação	60
4.3. Biomassa de <i>P. pachyrhizi</i> em plantas de soja	61
4.4. Caracterização dos metabólitos presentes nos filtrados de <i>Metarhizium</i> spp	63
5. DISCUSSÃO	69
6. CONCLUSÃO	79
REFERÊNCIAS	80

RESUMO

Potencial de isolados de *Metarhizium* spp. no controle alternativo da ferrugem-asiática da soja

A produtividade da cultura da soja está em constante ameaça por diversos fatores, incluindo o fungo *Phakopsora pachyrhizi*, causador da principal doença da soja no Brasil, a ferrugem-asiática. A busca por medidas alternativas como, o controle biológico e a indução de resistência, se fazem necessárias para integrar o sistema de manejo. Assim, os fungos entomopatogênicos do gênero *Metarhizium*, já estabelecidos no controle biológico de pragas e por apresentarem associação benéfica com as plantas, surgem como potenciais no controle de doenças de plantas. Dessa maneira, objetivou-se avaliar o potencial de três espécies do fungo (*M. anisopliae* BR-01, *M. robertsii* BR-02 e *M. humberii* BR-03) no controle de *P. pachyrhizi*, em testes *in vitro* (efeito direto) e *in vivo* (efeito indireto). Além disso, caracterizaram-se as moléculas biologicamente ativas presentes no filtrado de cultura quanto ao tamanho das moléculas, estabilidade ao calor e resistência a atividade da proteinase K. Os testes *in vitro* foram realizados em placa de Petri de poliestireno, utilizando o teste da microgota para se avaliar o efeito direto de suspensão de conídios de *Metarhizium* (2×10^5 conídios/mL) e do filtrado de cultura livre de estruturas fúngicas (FCLEF) na germinação de uredinósporos. Em ensaios com folíolos destacados de soja, as preparações (conídios e FCLEF) foram pulverizadas 72 horas antes da inoculação (h.a.i.) do fungo causador da ferrugem e avaliou-se o número de pústulas por cm². Com plantas mantidas em casa de vegetação (cultivar DS 5916 IPRO) foram realizados dois ensaios. No primeiro aplicou-se os conídios de *Metarhizium* spp. em dois trifólios da planta, 72 h.a.i. do patógeno e no segundo pulverizou-se o filtrado de cultura em dois trifólios da soja e inoculou-se a ferrugem em três trifólios, a fim de se avaliar a possível translocação de algum sinal e a severidade foi avaliada com base em escala diagramática. Em outro experimento, avaliou-se a inoculação do *Metarhizium*, via solo, como inoculante, utilizando 2 mL da suspensão de 1×10^8 conídios/mL, pela metodologia “soil drench”, e após 20 dias inoculou-se o patógeno na parte aérea e avaliou-se a severidade da doença. Para todos os ensaios, utilizou-se as três espécies de *Metarhizium* (BR-01, BR-02 e BR-03). Nos resultados dos testes *in vitro*, apenas os tratamentos com filtrados de culturas de *Metarhizium* apresentaram inibição, variando o efeito com cada isolado, sendo o destaque para *M. robertsii* BR-02, com 66% de inibição na menor concentração final (12,5%) e 99% de inibição na maior (50%). Em folíolo destacado utilizando-se suspensões de conídios, *M. anisopliae* BR-01 e *M. humberii* BR-03 se destacaram com redução no número de pústulas em relação ao controle água. Para o filtrado de cultura, tanto em folíolo destacado quanto em plantas, o destaque foi para *M. humberii* BR-03, que reduziu os sintomas de ferrugem nos três trifólios, e no terceiro trifólio que não recebeu os indutores, mostrando redução significativa na severidade quando comparada com o controle água. Para o ensaio utilizando *Metarhizium* como inoculante, *M. anisopliae* BR-01 se sobressaiu em relação aos demais, causando redução na severidade da doença em relação ao controle água. Durante estágio na Louisiana State University nos Estados Unidos da América, foram realizados ensaios para a quantificação da biomassa do fungo causador da ferrugem em soja, através de PCR em tempo real, em plantas de soja (Pioneer 93M60) tratadas com filtrados de cultura (isolados *M. humberii* BR-03, *M. anisopliae* BR-01 e *M. robertsii* US-04). Os resultados mostraram-se condizentes quanto a redução de severidade de ferrugem e a expressão relativa do gene alvo de *P. pachyrhizi*, com os três isolados. Ressalta-se que embora o ensaio tenha ocorrido em condições diferentes das do Brasil, o filtrado de cultura de *Metarhizium* apresentou efeito contra a ferrugem da soja. Sobre a caracterização dos metabólitos, demonstrou-se que os compostos ativos presentes nos filtrados estão na faixa de 3 a 10 kDa, são estáveis ao calor e, provavelmente, de natureza não proteica. Portanto, conclui-

se que os diferentes isolados de *Metarhizium* apresentam atividade antiferrugem direta e/ou indireta, via possível ativação dos sistemas de defesa das plantas de soja, contra *P. pachyrhizi*, sendo que os mecanismos de ação devem ser esclarecidos através de análises bioquímicas e moleculares. Finalmente, não há relatos anteriores na literatura científica sobre o uso de *Metarhizium* para este patossistema, sendo os resultados deste estudo inovadores e com potencial para o controle da ferrugem-asiática da soja.

Palavras-chave: Ferrugem-asiática, Fungos entomopatogênicos, Biocontrole, Soja, Controle biológico, Indução de resistência

ABSTRACT

Potential of *Metarhizium* spp. isolates in the alternative control against Asian soybean rust

The production of soybean crop is under constant threat of different fungal pathogens, including *Phakopsora pachyrhizi*, the causal agent of Asian soybean rust (ASR). Thus, alternative control measures, such as biological control and resistance induction, have been integrated into the management system of this disease. On the other hand, the entomopathogenic fungus *Metarhizium* sp. is used in the biological control of pests and shows association with plants through endophytic activity or rhizosphere colonization exhibiting potential to be used against plant pathogens. Thus, the objective of this work was to evaluate the potential of three different species of the fungus (*M. anisopliae* BR-01, *M. robertsii* BR-02 and *M. humberii* BR-03) in the control of soybean rust under *in vitro* (direct effect) and *in vivo* (indirect effect) assays. Besides that, the biologically active molecules present in the *Metarhizium* spp. culture filtrates free of fungal structures (CFFFS) were characterized in terms of molecular weight, heat and proteinase K activity stabilities. The *in vitro* tests were carried out inside of polystyrene Petri dishes, by using micro drops to evaluate the direct effect of conidial suspensions of *Metarhizium* (2×10^5 conidia/mL) and of the CFFFS filtrates in germination of the rust spores. By using detached soybean leaves (kept under laboratory conditions), they were first sprayed by using the preparations (CFFFS filtrates and conidial suspensions) and after 72 h they were spray-inoculated with the rust spores and the number of pustules per cm^2 was evaluated. In plants maintained under greenhouse conditions (cultivar DS 5916 IPRO), two experiments were carried out. In the first assay, *Metarhizium* conidia were sprayed onto two trefoil of the soybean plants and after 72 h they were spray-inoculated with urediniospores suspensions. In the second one, CFFFS filtrates were sprayed onto two trefoil of the plants and later on spray-inoculated with the rust spores in three trefoil, aiming to evaluate a possible signal translocation (systemic resistance) and the severity of the disease was measured by using a diagrammatic scale. In the other experiment, *Metarhizium* spp. was evaluated via soil inoculation (“soil drench”) by adding 2 mL of the spore suspension (1×10^8 conidia/mL), and after 20 days, a urediniospore suspension was spray-inoculated in two trefoil of the plants and the severity measured. For all the mentioned experiments, the species *Metarhizium* (BR-01, BR-02 e BR-03) were used. In the results for the *in vitro* tests, only the CFFFS filtrate treatments showed inhibition, where the *M. robertsii* BR-02 was the best one, with inhibition around 66% in the lowest final concentration (12,5%) and around 99% in the highest one (50%). In the detached leaves assays, by using the conidial suspensions, the *M. anisopliae* BR-01 and *M. humberii* BR-03 isolates showed the best performance based upon reduction in pustule number. For the CFFFS filtrates both in detached leaves and in whole plants, the *M. humberii* BR-03 isolate was the best one, by showing a significant reduction in rust symptoms in the three trefoils, and in the third trefoil that did not receive the inducers. In the assay regarding *Metarhizium* as inoculant via soil, the *M. anisopliae* BR-01 isolate was the best one in reducing the symptoms of rust in the plants. During the intership at Louisiana State University - USA, assays were performed to quantify the rust fungal biomass inside soybean leaves by using real time PCR, in soybean plants (Pioneer 93M60) treated with CFFFS filtrates (*M. humberii* BR-03, *M. anisopliae* BR-01 and *M. robertsii* US-04). The results were consistent as well as in reducing the disease severity and the relative expression of the target *P. pachyrhizi* gene with the three species. Although, the assay was carried out under different conditions from Brazil, the CFFFS filtrates showed anti-rust activity. Regarding to characterization of the biologically active molecules, the active compounds in the CFFFS filtrates are in the range of 3 to 10 kDa, heat stable, and most likely non-protein in nature, mainly for the isolates *M.*

anisopliae US-02 and *M. humberii* BR-03. Therefore, the conclusion is that different *Metarhizium* isolates show anti-rust activity (directly and indirectly, probably by induction of resistance in soybean plants) and the mode of action needs to be studied through biochemical and molecular approaches. Finally, there are no previous reports in the literature by using *Metarhizium* for this pathosystem, and the results from this study are novel and have a high potential for the control of the Asian soybean rust.

Keywords: Asian soybean rust, Entomopathogenic fungus, Biocontrol, Soybean, Biological control, Resistance induction

1. INTRODUÇÃO

A soja é uma das culturas mais importantes do mundo, principalmente como fonte de proteína e óleo vegetal, fazendo dela uma matéria-prima essencial que possibilita seu emprego na alimentação humana e o uso do farelo de soja para ração animal (Bezerra, 2015). O Brasil ocupa o segundo lugar na produção mundial e há previsões para se tornar o principal produtor de soja, ultrapassando os Estados Unidos da América na safra 2019/20. A estimativa aponta um crescimento de 2,6% na área plantada e produção de 122,2 milhões de toneladas na safra 2019/20 (Companhia Nacional De Abastecimento-CONAB, 2020).

Contudo, uma doença que ameaça a produtividade da cultura é a ferrugem-asiática da soja, causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* Sydow & P. Sydow (1914) (Matsuo et al., 2015; Godoy et al., 2016a). Descrita em 2001, no Paraguai e no oeste do Paraná no Brasil, espalhou-se em três anos pela América do Sul, tornando-se assim uma preocupação para os sojicultores (Rossi, 2003; Yorinori et al., 2005).

Os sintomas típicos são lesões, que podem conter as pústulas urediniais, consistindo nos sinais do patógeno, principalmente na superfície abaxial da folha e associadas a clorose. Os urediniósporos são disseminados facilmente pelo vento e em condições favoráveis causam novas infecções, sendo eles os responsáveis pelas epidemias no campo. A ferrugem-asiática é considerada uma doença policíclica, caracterizada pelos vários ciclos do patógeno em um ciclo da cultura. A consequência é que com o progresso da doença e alta densidade das lesões, o tecido afetado terá a atividade fotossintética reduzida, levando a desfolha prematura e maturidade precoce da cultura. Assim, o enchimento de grãos pode ser afetado, levando a perdas severas na produção que variam de 10 a 50%, e com perdas ainda maiores, de até 80%, nas regiões tropicais e subtropicais (Agrios, 2005; Hartman et al., 2015; Goellner et al., 2010; Godoy et al., 2016a).

Em se tratando de um fungo biotrófico e da presença de soja praticamente durante o ano todo, como cultura ou planta voluntária, a principal medida de controle para a ferrugem da soja no Brasil é o vazio sanitário (Godoy et al., 2016). Outras estratégias para um manejo eficiente, são a utilização de cultivares precoces, consistindo em um escape e a intervenção com fungicidas. Embora seja uma medida de controle bastante difundida, o uso indiscriminado de fungicidas, associado à monocultura, pode reduzir a eficiência do controle, causar impactos ambientais e ainda exercer pressão de seleção sobre o patógeno (Godoy & Canteri, 2004; Godoy et al., 2016a). A menor sensibilidade de *P. pachyrhizi* a fungicidas do grupo dos inibidores da desmetilação (DMI) e inibidores da quinona externa (azoxistrobina - IQe) já foi confirmada no

Brasil, além dos casos de redução da performance dos inibidores da succinato desidrogenase (Carboxamidas – SDHI) em áreas com histórico intensivo do uso e em condições de alta pressão de inóculo (Klosowski et al., 2016; FRAC, 2017).

Outra estratégia é o uso de cultivares resistentes raça-específica, sendo de fácil obtenção, mas de baixa durabilidade desses genes no campo em função do alto grau de variabilidade genética do patógeno, tornando limitado o uso dessa medida em cultivares comerciais, sendo indicado para pequenas áreas para que sofra menor pressão de seleção (Yamaoka et al., 2014; Murithi et al., 2016; Godoy et al., 2016). Há no mercado cultivares produzidas pela empresa Tropical Melhoramento & Genética (TMG) como TMG 7058 IPRO, TMG 7063 IPRO entre outras, com a presença da tecnologia *Inox*[®] apresentando resistência a ferrugem-asiática.

Tendo em vista as dificuldades encontradas no manejo dessa doença, surgem o controle biológico e a indução de resistência como medidas mais sustentáveis para integrarem o sistema de manejo. Devido a poluição ambiental, com o uso excessivo e indevido de agrotóxicos, o surgimento de raças resistentes de patógenos, além da preocupação com a saúde humana na procura por alimentos mais saudáveis e com menos resíduos, pesquisas têm sido realizadas na busca por agentes de controle biológico ou bioindutores que ativem os mecanismos de defesa das plantas, colaborando para a redução no uso de defensivos químicos (Dallagnol et al., 2006; Medeiros et al., 2018).

O controle biológico pode ser definido de forma simples como “a utilização de um microrganismo não patogênico para controlar outro microrganismo patogênico” (Medeiros et al., 2018). E a indução da resistência como “a ativação de genes responsáveis pela defesa, onde mecanismos estruturais e/ou bioquímicos estão inativos ou latentes, os quais são acionados após a exposição ou contato com agentes indutores, tornando as plantas mais resistentes aos patógenos” (Gozzo & Faoro, 2013; Oliveira et al., 2016).

A demanda por produtos biológicos resultou no aumento de estudos para a descoberta de agentes bióticos e abióticos que poderão ser utilizados como indutores de resistência. Atualmente, já existem disponíveis no mercado mundial produtos de diferentes naturezas que agem como indutores de resistência, como o Acibenzolar-S-metílico (ASM), representado pelo *Bion*[®], o qual foi o primeiro indutor de SAR (resistência sistêmica adquirida) liberado para uso comercial (Lyon & Newton, 1997).

A partir desse cenário, destacam-se os fungos entomopatogênicos, amplamente difundidos na natureza. Esses fungos são encontrados na rizosfera de plantas, como saprófitas ou parasitas de artrópodes e no solo, onde exercem antagonismo contra fitopatógenos, por meio

de antibiose ou parasitismo (Martins-Corder & Melo, 1998). Dentre os fungos entomopatogênicos, os principais são *Metarhizium* (Metschn.) Sorokīn (1883) e *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. (1912), amplamente difundidos em programas de controle biológico de pragas no Brasil (Faria & Wraight, 2007; Valicente, 2009), com vários produtos formulados a base dos mesmos. Além disso, esses fungos apresentam outras interações com as plantas através da colonização da rizosfera (Hu e St. Leger, 2002; Bruck, 2010), associação endofítica e promoção de crescimento de raízes (Sasan & Bidochka, 2012). E também ação contra fitopatógenos, por exemplo, *Metarhizium* spp. foi descrito exibindo propriedades antifúngicas contra *Colletotrichum graminicola* (Lopez, 1991), *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* e *Alternaria solani* (Kang et al., 1996), *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* (Sasan & Bidochka, 2013) e *B. cinerea* (Sarven et al., 2020).

Os mecanismos relacionados com o controle de doenças a partir do uso de entomopatógenos, incluem os que afetam diretamente os fitopatógenos através de micoparasitismo, competição e antibiose, com a produção de metabólitos secundários. Já nos mecanismos relacionados indiretamente, estão a indução de resistência sistêmica, o acúmulo de metabólitos secundários e a promoção do crescimento das plantas. A combinação desses mecanismos, pode ser empregada no controle de fitopatógenos (Vega et al., 2009; Ownley et al., 2010; Jaber & Ownley, 2018).

A partir do exposto, objetivou-se avaliar o potencial de espécies do fungo *Metarhizium* spp., no controle de *P. pachyrhizi*, através do efeito direto (controle biológico) e também pelo efeito indireto (indução de resistência), por meio da utilização de preparações do entomopatógeno (suspensão conidial e filtrado de cultura livre de estruturas fúngicas). Os objetivos específicos envolveram o uso de três espécies do fungo (*M. anisopliae* BR-01, *M. robertsii* BR-02 e *M. humberii* BR-03) em testes *in vitro* e *in vivo* com folíolos destacados e plantas de soja mantidas em casa-de-vegetação, sendo nesse último caso os ensaios conduzidos com preparações de *Metarhizium* aplicadas por aspersão foliar ou como inoculante. Além disso, objetivou-se caracterizar as moléculas biologicamente ativas presentes nos filtrados de cultura a fim de se identificar a natureza química dos componentes, sendo que essa parte do estudo foi realizada durante o estágio de pesquisa na Louisiana State University – EUA. Durante o estágio também se avaliou a biomassa de *P. pachyrhizi* em plantas de soja, através do uso de PCR em tempo real, tratadas com filtrados de cultura de *M. humberii* BR-03, *M. anisopliae* BR-01 e *M. robertsii* US-04 com o intuito de se correlacionar a presença do fungo com a severidade de ferrugem na folha.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A cultura da soja [*Glycine max* (L.) Merr.]

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma importante planta leguminosa, pertencente à família Fabaceae (Judd et al., 2009), sendo originária da Ásia, mais precisamente da China (Hymowitz, 1970). Os grãos servem como fonte de nutrientes e minerais e, devido ao seu alto teor de proteína, cerca de 98% do farelo de soja é utilizado para ração animal. Uma porcentagem menor é processada para produzir farinha de soja para o consumo humano, além da extração do óleo para a alimentação humana e produção de biodiesel (Hartman et al., 2011; Bezerra, 2015).

O Brasil, Estados Unidos da América, Argentina e China são os quatro países que dominam o mercado global de produção de soja e a demanda pela cultura continua em ascensão. De fato, a área de produção e o comércio podem aumentar mais rapidamente em comparação com outras culturas, sendo que a grande maioria da soja cultivada na América do Sul é exportada para a China, a qual é o principal consumidor da leguminosa (Hartman et al., 2011; CONAB, 2019).

A produção de soja nos Estados Unidos foi estimada em 96,8 milhões de toneladas para a safra 2019/20, no entanto, 19,6% menor em comparação com a safra anterior (2018/19). O Brasil deve se apropriar de parte dessa queda dos EUA e ocupar o primeiro lugar na produção mundial de soja com estimativa para 123,8 milhões de toneladas (USDA, 2020).

Segundo a CONAB, em levantamento de janeiro de 2020, a soja deverá ter uma área 2,6% maior que na última safra no Brasil, tornando a cultura com maior aumento de área, correspondendo a cerca de 57% da área total semeada com grãos no país e atingindo 36,8 milhões de hectares. Deve-se destacar os estados do Mato Grosso, Paraná e Rio Grande do Sul, como os principais produtores em nosso território.

Com base no exposto, vê-se a importância da cultura da soja no cenário mundial, como uma das principais commodities do mundo. Contudo, existem alguns obstáculos que ameaçam a cultura interferindo no seu potencial produtivo, entre eles, as doenças infecciosas, as quais trazem grande desafio a pesquisa agrônômica (Hartman et al., 2011).

2.2. Ferrugem-asiática da soja

A ferrugem-asiática da soja foi descrita pela primeira vez no Japão em 1902, como *Uredo sojae*, sendo detectada em toda a Ásia tropical, subtropical e Oceania no início do século

20 (Hennings, 1903; Hartman et al., 1999; Goellner et al., 2010). Na América do Sul, o primeiro relato ocorreu no Paraguai, em fevereiro de 2001 (Morel Paiva, 2001; Yorinori et al., 2005), sendo que após dois meses foi registrada no Brasil, no Estado do Paraná (Yorinori et al., 2002; Costamilan et al., 2002). Em 2004, a doença foi detectada nos Estados Unidos da América (Schneider et al., 2005), caracterizando sua presença em todos os países onde a soja é cultivada (Fiallos, 2011).

A doença é causada pelos fungos *Phakopsora pachyrhizi* Sydow & P. Sydow (1914) (fase anamórfica: *Malupa sojae*) e *Phakopsora meibomia* (Arthur) Arthur (1917), (fase anamórfica: *Malupa vignae*) espécie menos agressiva, pertencentes à família *Phakopsoraceae*, da ordem *Uredinales*, classe *Urediniomycetes*, filo *Basidiomycota* e do reino Fungi (Index Fungorum, 2018b).

O agente causal da ferrugem é um fungo biotrófico, o qual necessita da célula hospedeira viva para sobreviver e se reproduzir, extraindo os nutrientes essenciais para as suas atividades vitais, e apresentando menos modos de sobrevivência do que os necrotróficos. A sobrevivência se dá principalmente na planta (soja ou outros hospedeiros), razão pela qual as plantas remanescentes da cultura após a colheita devem ser eliminadas, visando a redução da fonte de inóculo (Reis, et al., 2006). No caso de outros hospedeiros, este patógeno possui ampla gama, com mais de 150 espécies descritas em 53 gêneros da família das leguminosas (Hartman, 2011), incluindo o feijão (*Phaseolus vulgaris*), trevos e a kudzu (*Pueraria lobata*), a qual é a principal hospedeira secundária no Rio Grande do Sul (Yorinori et al., 2004; Reis et al., 2005).

O sintoma típico da doença se inicia com pequenas lesões de coloração castanho-avermelhada, e várias pústulas urediniais se formam nesses pontos, principalmente na face abaxial das folhas de soja, onde produzem muitos urediniosporos (Figura 1). Essas lesões podem estar associadas à clorose foliar. Com o progresso da doença, pode ocorrer a desfolha prematura e maturação precoce, afetando o enchimento de grãos, resultando em perdas significativas de rendimento (Yorinori et al., 2002; Hartman, et al., 2015; Goellner et al., 2010). As perdas geradas pelo fungo variam de 10 a 50% dependendo de quando a doença começa e da rapidez com que progride (Agrios, 2005; Rupe & Sconyers, 2008).

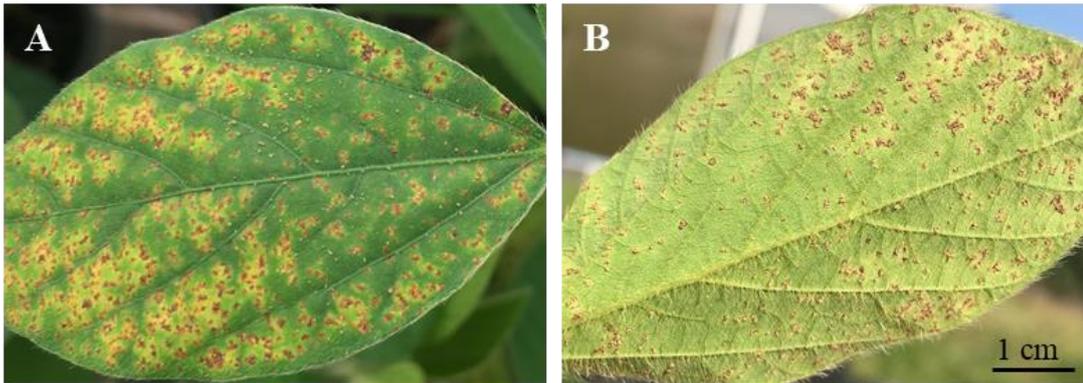


Figura 1. Sintomas causados pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* em folhas de soja. A – Parte adaxial da folha com lesões apresentando necrose. B – Parte abaxial da folha mostrando as pústulas urediniais com urediniósporos. (Fonte: o Autor).

A epidemia tem início com a chegada do inóculo aéreo (urediniósporos), vindo das fontes de inóculo, através da disseminação pelo vento. Os esporos germinam produzindo um tubo que termina em um apressório, de onde se origina a hifa de penetração, a qual penetra diretamente no hospedeiro ou através do estômato, seguida da hifa de infecção. Para que a infecção ocorra são necessárias condições ambientais favoráveis, como molhamento foliar (6 a 12 h) e temperatura ótima de 16 °C a 28 °C. Quando as proteínas efetoras não são reconhecidas pela planta hospedeira, o fungo prossegue na colonização do tecido mesofílico com a formação de haustórios e intenso micélio nos espaços intercelulares. Após 7 a 10 dias, ocorre o rompimento da epiderme da folha e a exposição da massa de urediniósporos através da urédia (Rupe & Sconyers, 2008; Tremblay, 2011).

O estágio uredinial da ferrugem é o estágio de repetição, em que os urediniósporos podem infectar o mesmo hospedeiro no qual eles foram produzidos (soja) durante o mesmo ciclo da cultura, caracterizando uma epidemia policíclica. Algumas pústulas produzem rapidamente centenas de urediniósporos (Rupe & Sconyers, 2008). Na Figura 2, está ilustrado o ciclo completo da ferrugem-asiática.

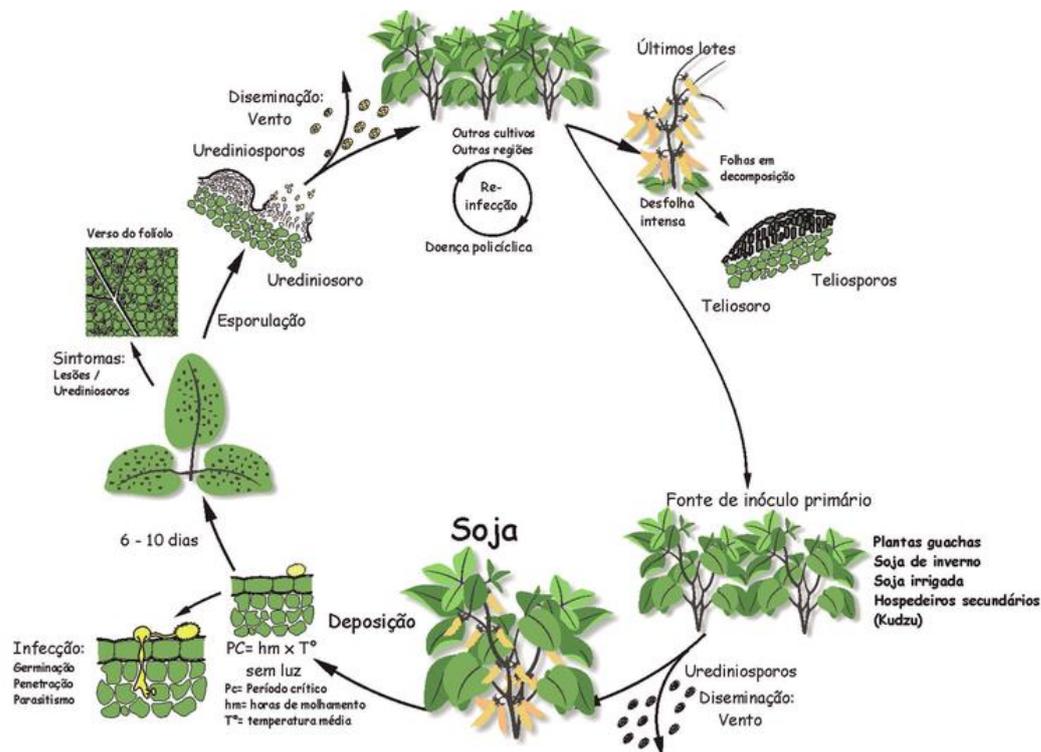


Figura 2. Ciclo da ferrugem-asiática da soja, causada por *Phakopsora pachyrhizi* (Reis et al., 2006).

Com o intuito de evitar reduções na produtividade, diferentes estratégias de manejo devem ser adotadas em conjunto, como a utilização de cultivares de ciclo precoce, semeadura no início da época recomendada consistindo em um escape, eliminação das plantas voluntárias remanescentes em lavouras e beiras de estrada (plantas guaxas), respeitar o vazio sanitário, assim como a rotação de culturas (Godoy et al., 2016). Além do monitoramento da lavoura desde o início do desenvolvimento da cultura, utilização de fungicidas e cultivares resistentes (Embrapa Soja, 2013).

O vazio sanitário é a principal prática para controle, a qual consiste em um período livre de soja de 60 a 90 dias na entressafra. Como o fungo causador da ferrugem precisa da planta viva para sobreviver, o vazio atua na redução do inóculo do patógeno em razão da ausência do hospedeiro. O resultado esperado é o atraso nas primeiras ocorrências da ferrugem na safra, diminuindo a possibilidade de casos no período vegetativo e, por consequência, podendo reduzir o número de aplicações de fungicidas, diminuindo os custos de produção e contaminação ambiental. Durante esse período, também devem ser eliminadas a soja voluntária ou tigueras originárias dos grãos caídos durante a colheita (Embrapa, 2016; Godoy et al., 2017).

O uso de fungicidas é uma medida difundida entre os produtores, sendo que atualmente cerca de 70 produtos químicos estão disponíveis comercialmente para uso nesse patossistema.

O controle químico é uma tática altamente efetiva, sendo que o controle da doença passou a ser mais eficiente quando foram introduzidos os fungicidas inibidores da desmetilação (triazóis e triazolintione - DMIs) (Mehl, 2009). Porém, a partir de 2007/08, foi observada a redução na eficiência dos fungicidas DMIs na região dos Cerrados e, em 2008/09, na região Sul do Brasil, devido a alta utilização dos mesmos de forma isolada e também curativa (Embrapa Soja, 2013; Godoy et al., 2012). Além disso, recentemente, o FRAC (Comitê de Ação a Resistência a Fungicidas) comunicou a sensibilidade reduzida para triazóis e triazolintione em populações do patógeno coletadas na safra 2018/2019 e também variações de performance dessa classe de produtos em condições de campo na mesma safra (FRAC, 2019).

Devido as questões de perda de sensibilidade do fungo aos fungicidas, muitos ensaios são realizados para o monitoramento da resistência, assim como ingredientes ativos isolados também são estudados. A menor sensibilidade de *P. pachyrhizi* a fungicidas do grupo dos inibidores da desmetilação (DMI), inibidores da quinona externa (azoxistrobina - IQe) e inibidores da succinato desidrogenase (Carboxamidas - ISDH) já foi confirmada no Brasil (Schmitz et al., 2014; Klosowski et al., 2016; FRAC, 2017). Devido a esse fato, devem-se seguir as estratégias antirresistência para se preservar as novas moléculas associadas as demais estratégias de manejo da doença, como aplicar os fungicidas DMIs preferencialmente em misturas com fungicidas multissítios, rotacionar fungicidas com diferentes mecanismos de ação e aplicação de forma preventiva, além de práticas culturais (FRAC, 2019).

Por outro lado, pensando-se na resistência genética, a soja pode produzir diferentes tipos de infecção dependendo da reação de resistência ou suscetibilidade. Primeiramente, tem-se a infecção tipo RB, consistindo de lesões marrom-avermelhadas com pouca esporulação. A infecção imune (IM), onde não há sintomas visíveis, implicando em uma interação incompatível na qual o patógeno é avirulento e a planta é resistente. Já nas interações compatíveis, as infecções são do tipo TAN, consistindo em lesões de cor castanhas, com múltiplas pústulas urediniais e esporulantes, sendo o hospedeiro suscetível e o patógeno virulento (Rupe & Sconyers, 2008; Murithi et al., 2016).

Diferentes loci de resistência já foram identificados e mapeados no genoma da soja (genes *Rpp1-7*), além da clonagem do gene *CcRpp1* (*Cajanus cajan* resistência contra *Phakopsora pachyrhizi* 1) de feijão-guandu (*Cajanus cajan*), que conferiu resistência total a *P. pachyrhizi* (Kawashima et al., 2016). No entanto, a resistência da soja apesar de não ser de difícil obtenção, apresenta baixa durabilidade desses genes, devido ao alto grau de variabilidade genética do patógeno, pois esses genes dominantes de resistência não são efetivos contra todas as raças de *P. pachyrhizi* (Yorinori, 2008; Yamaoka et al., 2014). Há no mercado cultivares

produzidas pela empresa Tropical Melhoramento & Genética (TMG) com a tecnologia Inox[®] em que apresentam resistência a ferrugem-asiática e pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), no entanto, é recomendado que sejam utilizadas em pequenas áreas e em conjunto com aplicações de fungicidas para aliviar a pressão de seleção que ocorre naturalmente (Rupe & Sconyers, 2008; Yamaoka et al., 2014; Godoy et al., 2016a).

Em virtude dos desafios encontrados nos métodos de controle para o manejo da ferrugem-asiática da soja, como surgimento de raças resistentes do patógeno a moléculas de fungicidas e/ou a quebra de genes de resistência nas plantas, surge então, o controle alternativo. Controle esse que envolve, de maneira geral, o controle biológico e a indução de resistência nas plantas contra patógenos. Além disso, o uso indiscriminado de agrotóxicos em cultivos agrícolas pode causar desequilíbrio ambiental e problemas à saúde humana devido o potencial de toxicidade. Desse modo, a busca por alimentos mais saudáveis e por uma agricultura mais sustentável vem aumentando (Medeiros et al., 2018).

São evidentes os incrementos na produtividade agrícola em função da utilização dos produtos químicos. No entanto, há interesse de intuições de pesquisa, e mesmo da iniciativa privada, no desenvolvimento de insumos e práticas alternativas as substâncias químicas sintéticas para o controle de pragas e doenças. Entre essas alternativas estão o controle biológico e a indução de resistência sistêmica, envolvendo a ativação de mecanismos de defesa. Além da colonização endofítica por organismos de biocontrole, o que pode desencadear respostas nas plantas reduzindo as doenças. (Ownley et al., 2010).

Em relação a indução de resistência, como forma de controle alternativo para a ferrugem em soja, há relatos na literatura com resultados positivos com o uso principalmente do Bion[®] e do silicato de potássio (Dallagnol et al. 2006; Pereira et al., 2009; Duarte et al., 2009). Há relatos também de controle biológico do fungo causador da ferrugem pelo fungo *Simplicillium lanosoniveum*, atuando como micoparasita (Ward et al., 2012; Gauthier et al., 2014). Além do relato de inibição da germinação dos urediniosporos e redução na severidade da ferrugem em soja, com o uso de *Bacillus subtilis* (QST713) e *Bacillus pumilus* (QST2808) (Dorighello et al., 2015).

Nesse contexto, destacam-se os fungos entomopatogênicos do gênero *Metarhizium*, sendo que *Metarhizium anisopliae* foi o primeiro a ser documentado como agente de biocontrole em 1880 (Zimmermann, 1993), e atualmente, é encontrado em muitos produtos formulados. Segundo o Sistema de Agrotóxicos Fitossanitário (AGROFIT) do Ministério da Agricultura, o número de produtos à base de *Metarhizium anisopliae* (Inseticida microbiológico), a partir de 2016 a 2020, subiu de 16 para 39, evidenciando o avanço no

desenvolvimento de produtos biológicos. A maioria dos produtos é recomendada para o controle da cigarrinha-da-raiz e cigarrinha-das-pastagens, em todas as culturas de ocorrência do alvo biológico (MAPA, 2020).

Os fungos entomopatogênicos podem ser empregados em qualquer programa de Manejo Integrado de Pragas (MIP), como inoculante, produto microbiano, pelo uso de enzimas e metabólitos tóxicos, em plantas transgênicas, entre outros (Gallo, 2002). Esses microrganismos produzem grandes quantidades de enzimas e metabólitos ligados ao aumento de virulência dos mesmos no controle de insetos e, potencialmente, em algumas doenças que afetam as plantas, abrindo novas possibilidades de uso. E essa ação de se inserir o uso destes agentes, visando a diminuição na utilização de pesticidas químicos tradicionais, demonstra-se promissora nos próximos anos, à medida que a mesma se dirige para práticas agrícolas mais sustentáveis (Koiri et al., 2017).

2.3. Controle biológico e a indução de resistência

As doenças das plantas precisam ser controladas para manter a qualidade e a abundância de alimentos e seus subprodutos. Diferentes abordagens podem ser usadas para prevenir, mitigar ou controlar doenças de plantas e muitas delas envolvem o uso de fertilizantes e pesticidas químicos. No intuito de minimizar o uso de produtos químicos, muitas pesquisas concentram esforços no desenvolvimento de insumos alternativos aos produtos químicos sintéticos para o controle de pragas e doenças. Entre essas alternativas estão os chamados controles biológicos (Pal & Gardener, 2006).

Os termos "controle biológico" ou de forma abreviada "biocontrole" foram utilizados principalmente na área da entomologia e fitopatologia. Na fitopatologia, esse termo se aplica ao uso de antagonistas microbianos para suprimir doenças. O organismo que interfere com o inseto praga ou o patógeno é referido como o agente de controle biológico geralmente um fungo, bactéria ou vírus, ou uma mistura destes na planta ou no solo. O agente de controle biológico atua para prevenir a infecção ou o estabelecimento do patógeno na planta (O'Brien, 2017). Mais amplamente, o termo controle biológico também foi aplicado ao uso de produtos naturais extraídos ou fermentados de várias fontes com atividades específicas ou efeitos múltiplos no hospedeiro e no alvo patógeno ou inseto praga (Pal & Gardener, 2006).

Diversos são os mecanismos pelos quais os agentes de controle biológico podem atuar muitos deles, parecem antagonizar patógenos usando múltiplos mecanismos de ação, tais como, antibiose (supressão mediada por antibióticos, caracterizados como toxinas microbianas que

podem, em baixas concentrações, causar efeitos deletérios a outros microrganismos); a competição por espaço e nutrientes; o hiperparasitismo e predação, onde são capazes de parasitar as estruturas do patógeno através da colonização de hifas, produção de enzimas hidrolíticas, entre outros. Essa atuação direta sobre o patógeno contribui para redução do inóculo e da severidade da doença; promoção de crescimento, onde o microrganismo não atua diretamente sobre o patógeno, mas sim favorecendo a planta contribuindo na produção de hormônios, aquisição de nutrientes e absorção de água pela planta (Medeiros et al., 2018).

A indução de resistência é um mecanismo de controle biológico de doenças com ação indireta sobre o patógeno e pode ser incluído no controle alternativo em função dos mecanismos de ação (Medeiros et al., 2018). Nesse contexto, na interação patógeno-hospedeiro observa-se o antagonismo entre dois organismos pela sobrevivência. De um lado, o patógeno lança suas armas químicas de ataque, enquanto do outro, a planta através de mecanismos estruturais e bioquímicos, tenta se defender do patógeno. A resistência de um hospedeiro, é a capacidade da planta em atrasar ou evitar a entrada e/ou a posterior colonização de um patógeno em seus tecidos (Farouk & Osman, 2011; Pascholati & Dalio, 2018).

Os mecanismos de defesa das plantas podem ser divididos em pré-formados (passivos, constitutivos) e pós-formados (ativos, induzíveis). Em ambas categorias, os fatores podem ser subdivididos em estruturais e bioquímicos. Os estruturais atuam como barreiras físicas, evitando a entrada do patógeno nos tecidos, enquanto as reações bioquímicas ocorrem nas células produzindo substâncias tóxicas ao patógeno ou criam condições adversas para o seu desenvolvimento (Pascholati & Dalio, 2018). Muitas vezes os estruturais constitutivos, como cutículas e paredes celulares e, bioquímicos inibidores pré-formados, podem ser suficientes para se evitar a colonização dos tecidos vegetais. No entanto, se ocorrer a penetração do patógeno, o sistema de defesa induzido é ativado (Thakur & Sohal, 2013). O sistema de defesa vegetal é complexo e atua de maneira dinâmica e coordenada, no momento e local apropriados, onde a efetividade depende da expressão dos seus mecanismos em uma sequência lógica, após o contato do patógeno (Pascholati & Dalio, 2018).

A resistência sistêmica adquirida (SAR) e resistência sistêmica induzida (ISR) designam os mecanismos pelos quais as plantas ativam mecanismos de defesa não apenas no local de indução, mas também em outros locais a distância, após serem expostos a um agente indutor (Conrath et al., 2006). A SAR possui um processo que depende do ácido salicílico e está associada à síntese de proteínas relacionadas à patogênese (proteínas-RP), muitas delas exibindo atividade antimicrobiana, além do envolvimento da proteína de transdução NPR1 para que uma resposta de defesa ocorra (Gozzo & Faoro, 2013). A resistência expressa através da

SAR é geralmente eficaz contra um amplo espectro de patógenos incluindo vírus, bactérias e fungos (Elsharkawy et al., 2013). A resistência sistêmica adquirida é induzida por patógenos ou ativadores químicos (Mandal, 2010) e, é caracterizada pela translocação desse sinal e induzindo reações de defesa que irão proteger a planta contra os ataques subsequentes. Há no mercado brasileiro produtos que agem como ativadores de planta, sendo um exemplo o Bion[®] (Acibenzolar-S-metílico - ASM). No mercado externo, outros indutores são encontrados, como Axiom Harpin Proteins[®], Elexa[®] e Oxycom[®], porém os mesmos ainda não estão disponíveis no Brasil (Pascholati & Dalio, 2018).

Já a ISR, é induzida geralmente por um não patógeno como bactérias promotoras de crescimento (rizobactérias) e envolve uma via dependente de outros hormônios, como o ácido jasmônico e o etileno, que por sua vez, são hormônios vegetais que induzem a expressão de vários genes relacionados à defesa e essa via também requer a proteína NPR1 (Thakur e Sohal, 2013). Nesse mecanismo, não há acúmulo de proteínas-RP. Por outro lado, está via induz a produção de H₂O₂, uma espécie reativa de oxigênio que pode atuar como uma primeira molécula sinalizadora de defesa em plantas (Farouk & Osman, 2011; Oliveira et al., 2016).

A proteção induzida é dependente do intervalo de tempo entre o tratamento inicial (tratamento indutor) e a subsequente inoculação do patógeno (tratamento provocador ou desafiador). Essa dependência indica que mudanças específicas no metabolismo da planta, envolvendo a síntese e/ou acúmulo de substâncias, são importantes no fenômeno da resistência induzida. Após a percepção do eliciador pela planta, ocorre a ativação de vias de transdução de sinais e dos genes de resposta de defesa que, geralmente leva à produção de espécies reativas de oxigênio, biossíntese de fitoalexinas e proteínas relacionadas a patogênese (Proteínas-RP), reforço da parede celular (glicoproteínas ricas em hidroxiprolina) associado a compostos fenilpropanóides, deposição de calose e síntese de enzimas de defesa, com propriedades antimicrobianas (Thakur & Sohal, 2013; Oliveira et al., 2016; Pascholati & Dalio, 2018).

As proteínas-RP são produzidas pelas plantas durante o desenvolvimento normal, em resposta a estímulos abióticos ou como parte de um sistema induzível de defesa contra patógenos em potencial, contra os quais exercem algum tipo de controle. Atualmente, as proteínas-RP são categorizadas em 17 famílias de acordo com suas propriedades e funções, incluindo β -1,3-glucanases, quitinases, peroxidases, proteínas inativadoras de ribossomos, tioninas, entre outras. Assim, as proteínas-RP possuem propriedades físico-químicas características que as diferenciam das demais proteínas de plantas. São estáveis em meio ácido até pH 2,8, apresentam uma elevada resistência à ação de enzimas proteolíticas, geralmente ocorrem como monômeros, com massa molecular variando de 5 a 70 kDa, são estáveis sob altas

temperaturas (60-70°C), e podem estar localizadas no vacúolo, parede celular e/ou apoplasto (Pascholati & Dalio, 2018).

Entre estas proteínas-RP, as quitinases e as β -1,3-glucanases são duas importantes enzimas hidrolíticas presentes em muitas plantas após a infecção por diferentes tipos de patógenos. Podem agir contra patógenos fúngicos pela degradação da parede da hifa, onde quitina e β -glucanas são os principais componentes (Li et al., 2001; Saboki et al., 2011). A função imediata dessas proteínas na defesa das plantas é pela ação na degradação de hifas invasoras (ação antimicrobiana direta), com a consequente liberação de eliciadores oligossacarídicos a partir das paredes fúngicas, os quais podem conduzir à ativação de outros mecanismos locais ou sistêmicos de resistência (ação indireta) (Pascholati & Dalio, 2018).

Por sua vez, as espécies reativas de oxigênio (EROs) podem se acumular rapidamente no início do processo infeccioso em ambas as interações compatíveis ou incompatíveis, um processo conhecido como explosão oxidativa. Elas são moléculas reduzidas, transitórias e altamente reativas, produzidas no caminho metabólico de transformação do oxigênio molecular (O_2) a água (H_2O). A partir da adição de um elétron, o oxigênio molecular é convertido ao radical superóxido (O_2^-), processo mediado provavelmente por peroxidases e, este O_2^- , pode passar por reações de oxidorredução ou ser dismutado e regenerar O_2 e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Este por sua vez, por ser a espécie mais estável e prontamente transportada através da membrana, pode estar envolvido na expressão de genes requeridos na resistência ou na formação de mensageiro secundário, com o ácido jasmônico. As EROs podem atuar em cascatas de sinalização e também como moléculas de transdução de sinal (em níveis baixos) ou como moléculas tóxicas altamente oxidantes (em níveis altos) (Pascholati & Dalio, 2018).

Outras substâncias sintetizadas após a ativação dos mecanismos de defesa, são as fitoalexinas, compostos antimicrobianos de baixa massa molecular, formadas pelas plantas e que se acumulam nas células vegetais em resposta à infecção microbiana (Paxton, 1981). O modo de ação sobre fungos inclui granulação citoplasmática, desorganização dos conteúdos celulares, ruptura da membrana plasmática e inibição de enzimas fúngicas, refletindo na inibição da germinação e na alongação do tubo germinativo e na redução ou na inibição do crescimento micelial. As fitoalexinas possuem grande diversidade, sendo que mais de 300 tipos já foram caracterizados (Cavalcanti, 2005). Em soja, a fitoalexina gliceolina mostra-se importante na interação dessa leguminosa com fitopatógenos (Schwan-Estrada et al., 2000).

Além disso, descobriu-se recentemente, o fenômeno de pré-condicionamento conhecido como “*priming*”, o qual é uma parte intrínseca da resistência induzida onde a planta orchestra medidas defensivas contra o atacante em potencial, enquanto prepara seu sistema

defensivo para uma reação mais rápida e/ou mais forte no futuro, caso seja infectada (Mauch-Mani et al., 2017). Esse tipo de fenômeno é eficaz não apenas contra patógenos, mas também contra insetos artrópodes (Engelberth et al., 2004) e estresses abióticos (Beckers & Conrath, 2007). Dessa maneira, o estado de “*priming*” é uma espécie de memória dos estímulos recebidos, um tipo de memória imunológica da planta, como estratégia adaptativa para melhorar a capacidade defensiva, sendo marcado por uma ativação aumentada dos mecanismos de defesa induzidos quando na presença, por exemplo, dos patógenos. Diferente da indução de resistência direta onde existe um gasto energético, o “*priming*” apresenta baixos custos metabólicos e melhor desempenho na presença do desafiador (patógeno) (Conrath et al., 2006; Mauch-Mani et al., 2017).

Portanto, a indução de resistência pode ser vista como uma medida para o controle de doenças vegetais. A proteção já se mostrou viável em casa de vegetação e condições de campo, exibindo varias vantagens, como: a efetividade contra vírus, bactérias, fungos e nematoides; a estabilidade devido a ação de diferentes mecanismos de resistência; o caráter sistêmico, persistente e natural da proteção; a economia de energia metabólica (a plantas permanece em estado “*priming*”) e os mecanismos de resistência são ativados mais rapidamente e somente na presença do patógeno. Salienta-se que esse fenômeno não promove resistência completa, o controle das doenças está entre 20 e 85% em relação as plantas não induzidas. Deixando-se claro, que o uso dessa prática, deve ser de forma integrada a outras no manejo de doenças e pragas (Pascholati & Dalio, 2018).

2.4. Fungo entomopatogênico: *Metarhizium* spp.

Os fungos *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokín (1883) e *Metarhizium robertsii* J.F. Bisch., S.A. Rehner & Humber (2009), pertencem a família Clavicipitaceae e a ordem Hypocreales (Index Fungorum, 2018a). Assim como *M. humberri*, em se tratando de uma nova espécie descrita, isolada dos solos do Brasil e pertencente a mesma família e ordem (Luz et al., 2019). Esses fungos são amplamente difundidos na natureza, sendo encontrados na rizosfera de plantas, cadáveres de artrópodes como saprófitas e parasitas e no solo onde exercem antagonismo contra fitopatógenos, por meio de antibiose ou parasitismo (Martins-Corder & Melo, 1998).

Os fungos entomopatogênicos têm como hospedeiros primários os afídeos, moscas-brancas, gafanhotos, besouros, lagartas, tripes e ácaros. Eles possuem largo espectro de ação, colonizando e causando epizootias em condições naturais. No hospedeiro suscetível, a infecção

é iniciada pelos conídios, produzidos assexuadamente, principalmente através da cutícula onde se fixa e germina. Na penetração estão envolvidos fatores físicos (pressão da hifa) e químicos, resultantes da liberação pelo fungo de enzimas (como esterases, proteases, lipases e quitinases) que degradam seus principais constituintes (proteínas, quitina e lipídios) e facilitam a penetração mecânica. Posteriormente, a colonização do corpo do inseto pelo fungo continua, o qual se multiplica rapidamente e produz toxinas e enzimas que irão ocasionar a destruição dos tecidos. Finalmente, as estruturas fúngicas são expostas sobre a carcaça do hospedeiro e os conídios disseminados. Os insetos colonizados se tornam rígidos e cobertos por uma camada pulverulenta uniforme de conídios de coloração verde sobre o cadáver, originando o nome da doença de muscardine verde (St Leger et al., 1996; Shah & Pell, 2003; Alves et al., 2008).

M. anisopliae produz várias proteases como subtilisina (Pr1), tripsina (Pr2), proteases de cisteína (Pr4) e metaloproteases. As subtilisinas estão envolvidas na virulência de alguns fungos entomopatogênicos e algumas estirpes de *Metarhizium* expressam até 11 subtilisinas durante o crescimento na cutícula dos insetos (Bagga et al., 2004). Na hemolinfa, as hifas diferenciam-se em blastósporos e essas células facilitam a propagação do fungo para causar uma infecção generalizada (Zhang & Xia, 2009). À medida que a colonização do hospedeiro prossegue, os nutrientes se esgotam, a Pr1 auxilia no rompimento da cutícula, onde as hifas emergirão e produzirão conídios na superfície do hospedeiro morto (Small & Bidochka, 2005).

Com base no exposto, fica evidente que na presença de um hospedeiro suscetível, o fungo *Metarhizium* completa seu ciclo de vida, produzindo muitos metabólitos a fim de infectar, colonizar e se reproduzir, deixando clara sua atuação como agente de controle biológico de pragas e mostrando o seu potencial no controle de fitopatógenos.

Como já mencionado, esses fungos desempenham outras interações na natureza, demonstrando associação com as plantas e antagonismo a fitopatógenos (Lopez, 1991; Ownley et al., 2010; Sasan & Bidochka, 2013; Sarven et al., 2020). Apesar dessas ações ainda não serem totalmente compreendidas, oferecem oportunidades para o uso múltiplo desses microrganismos em estratégias de manejo integrado duplo de doenças de plantas e pragas (Vega et al., 2009; Ownley et al., 2010; Lacey et al., 2015).

A possível colonização endofítica por esses fungos, faz com que os mesmos fiquem protegidos dentro das plantas, visto que, na superfície podem estar vulneráveis aos eventos externos. Esses fungos da ordem Hypocreales são generalistas, sem uma preferência estrita pelo hospedeiro, assim, supõe-se que um isolado virulento seja capaz de colonizar endofiticamente a planta hospedeira e lidar com insetos praga e fitopatógenos (Ownley et al., 2010).

Para o manejo de doenças, por exemplo, o endofítico *M. robertsii* conferiu proteção contra a podridão radicular de feijão causada por *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* (Sasan & Bidochka, 2013). Além desse, outros entomopatógenos endofíticos como *B. bassiana*, também mostraram atividade antagônica contra patógenos de plantas (*Rhizoctonia solani* e *Pythium myriotylum* em tomate) (Ownley et al., 2004; Clark, et al., 2006). Os mecanismos relacionados com o controle desses fitopatógenos por exemplo, a partir de entomopatógenos, podem incluir os que afetam diretamente e indiretamente (indução de resistência sistêmica, acúmulo de metabólitos secundários de plantas e promoção do crescimento das plantas) os microrganismos patogênicos (Vega et al., 2009; Ownley et al., 2010; Jaber & Ownley, 2018).

A colonização de plantas com fungos endofíticos, além da indução de resistência sistêmica, pode estimular a planta a produzir metabólitos secundários bioativos, funcionando como mecanismos de defesa (Hartley et al., 2015). Entre estes compostos estão as fitoalexinas com propriedades antifúngicas, antibacterianas e antivirais que ajudam a proteger as plantas contra patógenos. A quantidade de fitoalexinas do tipo isoflavonóides foi significativamente aumentada em plantas de soja inoculadas com *M. anisopliae* quando comparadas com as plantas controle (Khan et al., 2012). Finalmente, outro mecanismo importante é a antibiose, através do qual os agentes de controle biológico conferem proteção contra fitopatógenos e pragas através da produção de metabólitos secundários tóxicos (Ownley et al., 2010). *Metarhizium* sp. produz uma variedade de metabólitos pertencentes a várias classes químicas, que provaram ser tóxicos para uma ampla gama de animais e insetos, bem como microrganismos como fungos (S. Pal, St. Leger, & Wu, 2007).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido nas dependências da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo (ESALQ/USP), junto ao Departamento de Fitopatologia e Nematologia (Campo Experimental e Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Fitopatológica) e Departamento de Entomologia e Acarologia (Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos).

3.1. Obtenção das plantas de soja

A cultivar utilizada foi a DS 5916 IPRO proveniente da Cooperativa Agroindustrial – C. Vale, com hábito de crescimento indeterminado, e suscetível a *P. pachyrhizi*. As sementes de soja foram semeadas em vasos com capacidade de 2,5 L, contendo substrato esterilizado Basaplant[®] (turfa, corretivos, vermiculita, carvão vegetal e casca de *Pinus*), sendo os mesmos acomodados sob condições de casa de vegetação, mantendo-se uma planta por vaso e regadas quando necessário. Essas plantas foram utilizadas nos experimentos e para a manutenção do inóculo do fungo causador da ferrugem da soja.

3.2. Obtenção e manutenção do inóculo de *P. pachyrhizi*

O inóculo de *P. pachyrhizi* foi obtido junto a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Centro Nacional de Pesquisa em Soja (EMBRAPA – CNPSo), localizada na cidade de Londrina/PR. Considerando que o fungo causador da ferrugem é biotrófico, o patógeno foi mantido em plantas de soja, conforme *item 3.1*, em condições de câmara de nebulização caseira construídas com filme plástico (Figura 3). As caixas foram mantidas no interior da casa de vegetação, com umidade relativa próxima a 90%, conseguida através do uso de umidificador (G-Tech[®] Alergy Free Dual) acoplado na lateral da caixa com funcionamento de 15 min/hr. A manutenção do inóculo foi realizada renovando as plantas, pois quando as plantas doentes apresentavam alta severidade, novas plantas sadias eram acondicionadas dentro da caixa, de modo que gerassem novas infecções.



Figura 3. Manutenção de inóculo de *P. pachyrhizi* em plantas de soja mantidas em câmaras de nebulização caseira (A), em condições de casa-de-vegetação, utilizando umidificador na lateral (B).

A coleta dos esporos foi realizada com o auxílio de uma folha de papel sulfite, em que foram efetuadas leves batidas sobre as folhas de soja contendo as pústulas de ferrugem. Após, os mesmos foram transferidos para microtubos de 2 mL, sendo ajustada a concentração de inóculo com auxílio de uma câmara de Neubauer, para a realização dos ensaios *in vitro* e *in vivo*.

3.3. Obtenção e manutenção dos isolados de *Metarhizium* spp.

Os fungos entomopatogênicos do gênero *Metarhizium* foram obtidos junto a Coleção de Entomopatógenos “Prof. Sérgio Batista Alves” do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos da ESALQ-USP, Piracicaba, São Paulo, Brasil (Tabela 1). Os fungos foram cultivados e mantidos em meio de cultivo Batata Dextrose Agar (BDA) da marca Difco[®], sob fotoperíodo de 12/12 horas e temperatura de $26\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, durante 7 a 10 dias em câmara climatizada tipo B.O.D (Biological Oxygen Demand).

Tabela 1. Descrição dos isolados de *Metarhizium* utilizados no estudo.

Espécie fúngica	Código	Origem	Local de coleta
<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>M. anisopliae</i> BR-01	<i>Mahanarva posticata</i>	Boca da Mata- AL
<i>Metarhizium robertsii</i>	<i>M. robertsii</i> BR-02	Solo de milho	Sinop- MT
<i>Metarhizium humberii</i>	<i>M. humberii</i> BR-03	Solo de vegetação	Rio Verde- GO

3.4. Produção e preparo dos agentes utilizados nos tratamentos

3.4.1. Obtenção das preparações de *Metarhizium* spp.

Para a realização dos ensaios *in vitro* e *in vivo* foram utilizadas duas preparações dos fungos com as três espécies de *Metarhizium*. Sendo uma representada pela própria estrutura reprodutiva do fungo (suspensão de conídios) e a outra representada pelo filtrado de cultura livre de estruturas fúngicas (esporos e hifas), consistindo somente dos metabólitos produzidos e liberados pelo fungo em meio de cultivo líquido.

3.4.2. Suspensão de conídios de *Metarhizium* spp.

Para a realização dos testes utilizando conídios de *Metarhizium* spp., inicialmente o fungo foi multiplicado em placas de Petri contendo meio de cultivo BDA, sob fotoperíodo de 12/12 horas e temperatura $26\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, durante 7 dias em câmara climatizada tipo B.O.D. A suspensão de conídios de cada isolado fúngico foi preparada a partir da raspagem superficial do micélio, contendo os esporos no meio de cultura, seguida de diluição com água destilada esterilizada contendo espalhante adesivo Tween 80 (0,01%). A concentração de conídios foi ajustada através da contagem em câmara de Neubauer, utilizando-se microscópio óptico.

A concentração de conídios de *Metarhizium* spp., utilizada nos ensaios de teste de germinação de urediniósporos, folíolos destacados e em plantas de soja mantidas em casa de vegetação, foi de 2×10^5 conídios mL^{-1} .

3.4.3. Produção do filtrado de cultivo de *Metarhizium* livre de estruturas fúngicas

Para a obtenção do filtrado, contendo metabólitos do fungo, foi efetuado o crescimento do *Metarhizium* spp. em caldo de batata dextrose (meio BD), no interior de frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL de meio de cultura. Foram adicionados 5 discos (5 mm diâmetro), coletados de regiões uniformes da placa de Petri, contendo o crescimento fúngico (esporos e micélio). Os frascos foram mantidos sob agitação a 240 rpm (rotações por minuto), em câmara incubadora com agitação orbital (“*shaker*”), sob fotoperíodo de 12/12 horas, temperatura de 26 °C durante 7 dias.

Após esse período, o conteúdo dos frascos foi filtrado primeiramente em sistema Kitassato, associado a uma bomba aspirante (vácuo), com funil de Buchner e papel de filtro

Whatman nº40 para a retenção de estruturas do fungo, como hifas e conídios. Em seguida, submeteu-se o filtrado obtido a uma segunda filtração, utilizando-se filtro de seringa tipo Millipore® (poro de 0,22 µm), obtendo-se o filtrado livre de estruturas fúngicas, contendo apenas os metabólitos produzidos pelo fungo. Os filtrados foram armazenados em congelador a -20°C para uso posterior nos ensaios.

3.4.4. Controle negativo

Para o tratamento controle negativo, utilizou-se apenas água esterilizada e caldo de batata dextrose (meio BD) sem o fungo. Esse controle foi utilizado somente nos experimentos que envolviam o uso do filtrado de cultura onde o *Metarhizium* havia crescido.

3.4.5. Controle positivo – efeito fungicida

Para o tratamento controle positivo, utilizou-se fungicida contendo como ingredientes ativos picoxistrobina + benzovindiflupir (100 g L⁻¹ + 50 g L⁻¹ i.a.) (Vessarya®, DuPont). Dessa forma, considerando-se um volume de calda de 150 L ha⁻¹ na concentração de 500 mL do fungicida ha⁻¹, tem-se uma concentração final de trabalho de 3,33 mL do p.c. L⁻¹.

3.4.6. Controle positivo – efeito indutor de resistência

Para o tratamento controle positivo, com um ativador de planta, utilizou-se o Acibenzolar-S-metílico (Bion® 50 WG – Syngenta). Dessa forma, considerando-se um volume de calda de 200 L ha⁻¹ na concentração de 125 g de i.a. do Bion® ha⁻¹, tem-se uma concentração de trabalho de 1,66 g do p.c. L⁻¹ (Duarte et al., 2009).

3.5. Experimentos realizados

3.5.1. Testes *in vitro*

3.5.1.1. Efeito direto dos agentes sobre a germinação de urediniósporos de *P. pachyrhizi*

A fim de se avaliar o efeito direto dos agentes sobre a germinação dos urediniósporos de *P. pachyrhizi*, realizou-se o presente teste utilizando-se os tratamentos descritos na Tabela 2, os quais foram divididos em três ensaios distintos no tempo. O primeiro utilizando suspensão de conídios, o segundo com filtrados de cultura com concentração final de 50% e o terceiro com filtrados de cultura em diferentes concentrações (diluiu-se os filtrados pela adição de água destilada esterilizada). Todos os tratamentos nos três ensaios distintos (I, II e III) foram conduzidos com as três espécies de *Metarhizium* spp. Os ensaios I e II foram realizados duas vezes, enquanto que o ensaio III apenas uma.

Tabela 2. Tratamentos utilizados no teste *in vitro* envolvendo a germinação de urediniósporos de *P. pachyrhizi*, separados em três ensaios distintos, frente a preparações de *Metarhizium* spp. No ensaio III, diferentes concentrações dos filtrados foram usadas para cada isolado de *Metarhizium*.

Tratamentos		
Ensaio I	Ensaio II	Ensaio III
Suspensão de conídios (2×10^5 conídios mL ⁻¹)	Filtrado de cultura (concentração final 50%)	Filtrado de cultura em diferentes concentrações finais (12,5, 25, 37,5 e 50%)
Controle água	Controle água	Controle água
<i>M. anisopliae</i> BR-01	Controle meio BD*	Controle meio BD*
<i>M. robertsii</i> BR-02	Filtrado <i>M. anisopliae</i> BR-01	Filtrado <i>M. anisopliae</i> BR-01
<i>M. humberii</i> BR-03	Filtrado <i>M. robertsii</i> BR-02	Filtrado <i>M. robertsii</i> BR-02
	Filtrado <i>M. humberii</i> BR-03	Filtrado <i>M. humberii</i> BR-03
	Controle fungicida**	Controle fungicida**

* Meio BD – caldo batata dextrose.

**Dose: 3,33 mL do produto comercial L⁻¹.

Dessa forma, empregou-se o teste da gota para se avaliar a germinação dos esporos de *P. pachyrhizi*. Para tanto, foram utilizadas placas de Petri de poliestireno (40 mm diâmetro x 11 mm altura), contendo uma gota por placa com volume total de 100 µL por tratamento. Assim, utilizou-se 50 µL de cada tratamento + 50 µL da suspensão de urediniósporos (concentração 2×10^5 esporos mL⁻¹). As placas foram colocadas no interior de uma câmara de incubação, tipo

B.O.D., sob temperatura de 25 °C e na ausência de luz por 6 horas. Após, a germinação foi paralisada com a adição de lactoglicerol, realizando-se a contagem dos esporos em microscópio óptico. A avaliação foi realizada através da observação da germinação de 100 urediniósporos, selecionados ao acaso, por repetição. Considerou-se como germinado, o esporo que apresentaram tubo germinativo igual ou maior o diâmetro do urediniósporo.

Os experimentos I e II foram conduzidos sob delineamento inteiramente casualizado, com seis repetições, e cada repetição foi constituída por uma placa. Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e ao teste Tukey ($p \leq 0,01$). Por sua vez, para o experimento III foi usado fatorial 3×4 com três tratamentos adicionais (controles), conduzidos sob o delineamento inteiramente casualizado com seis repetições. Os dados foram apresentados em proporção e ajustados pelo modelo quase-binomial (McCullagh & Nelder, 1989).

A porcentagem de inibição foi calculada em relação ao controle água, utilizando-se a seguinte equação:

$$\% \text{ Inibição} = \left(\frac{\text{Germinação do controle água} - \text{Germinação do tratamento}}{\text{Germinação do controle água}} \right) \times 100$$

3.5.2. Testes *in vivo*

3.5.2.1. Efeito indireto dos agentes aplicados em folíolos destacados de soja no controle da ferrugem-asiática em condições de laboratório

Com intuito de se verificar o efeito indireto dos agentes no controle de *P. pachyrhizi* em folíolos destacados de soja, realizaram-se dois ensaios utilizando-se as duas preparações obtidas do *Metarhizium* spp, representadas pelas suspensões de conídios do fungo e pelos filtrados de cultura livre de estruturas fúngicas em diferentes concentrações (Tabela 3), ambos com os três isolados do fungo. Os ensaios foram conduzidos separadamente no tempo.

Tabela 3. Tratamentos utilizados nos ensaios com folíolos destacados de soja, utilizando-se a suspensão de conídios e os filtrados de cultura dos três isolados de *Metarhizium* spp., aplicados nos folíolos 72 horas antes da inoculação com urediniósporos de *P. pachyrhizi*.

Ensaio I - Suspensão de conídios (2×10^5 conídios mL⁻¹)		
Tratamentos	0 hr	72 hrs
Tratamento 1	Água	Patógeno
Tratamento 2	Suspensão de conídios de <i>M. anisopliae</i> BR-01	Patógeno
Tratamento 3	Suspensão de conídios de <i>M. robertsii</i> BR-02	Patógeno
Tratamento 4	Suspensão de conídios de <i>M. humberii</i> BR-03	Patógeno
Tratamento 5	Fungicida ¹	Patógeno

Ensaio II - Filtrados livres de estruturas fúngicas (50, 75 e 100%)		
Tratamentos	0 hr	72 hrs
Tratamento 1	Água	Patógeno
Tratamento 2	Meio BD	Patógeno
Tratamento 3	Filtrado de <i>M. anisopliae</i> BR-01 (50, 75 e 100%)	Patógeno
Tratamento 4	Filtrado de <i>M. robertsii</i> BR-02 (50, 75 e 100%)	Patógeno
Tratamento 5	Filtrado de <i>M. humberii</i> BR-03 (50, 75 e 100%)	Patógeno
Tratamento 6	Fungicida ¹	Patógeno

¹ Dose: 3,33 mL do p.c. L⁻¹.

Desse modo, usou-se o método da folha destacada, segundo Hooker & Yarwood, (1966), com adaptações. Os folíolos de soja foram obtidos a partir das plantas conduzidas conforme descrito no *item 3.1* e o inóculo conforme descrito no *item 3.2*. Para tanto, quando a planta atingiu o estágio de desenvolvimento V3-V4, coletou-se o trifólio do terceiro nó em que os folíolos estavam completamente expandidos e encaminhou-se ao laboratório. Os folíolos foram colocados com a parte abaxial para cima no interior de placas de Petri (90 mm diâmetro x 15 mm altura), contendo duas folhas circulares de papel de filtro umedecidas com água destilada e duas lâminas de microscopia em formato de “V”, para acondicionar o folíolo de soja sobre as mesmas, além de um pequeno chumaço de algodão, umedecido em água, na ponta do pecíolo para manter a turgidez. As preparações dos tratamentos descritos na Tabela 3 foram pulverizadas até o ponto de escorrimento na folha (cerca de 600 µL / folíolo) (Figura 4), com 72 horas de antecedência à inoculação com o desafiador, *P. pachyrhizi*. As placas foram mantidas em B.O.D., conforme descrito abaixo.



Figura 4. Demonstração do ensaio de folíolo destacado de soja no interior de placas de Petri, após aplicação dos possíveis agentes indutores.

A inoculação foi realizada com a suspensão de *P. pachyrhizi* (10^4 urediniósporos mL⁻¹). As placas contendo os folíolos foram incubadas em estufa tipo B.O.D. com fotoperíodo de 12/12 horas, sob temperatura de 25 °C pelo período de 12 dias. Para a avaliação da doença fez-se a contagem do número de pústulas por cm² do folíolo, realizando-se quatro contagens por folíolo em pontos determinados previamente. Foram realizados testes preliminares para o ajuste da metodologia, dessa forma, somente são apresentados os resultados do segundo ensaio.

Para o ensaio I (suspensões), o delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado com quatro repetições e para a análise do número de pústulas por cm², considerou-se o modelo binomial-negativo. Para o ensaio II (filtrados), foi usado um fatorial 3 × 3 com três tratamentos adicionais (controles), conduzidos sob o delineamento inteiramente casualizado com sete repetições. Os dados foram analisados, usando-se o modelo binomial negativo inflacionado de zeros tipo I (Rigby & Stasinopoulos, 2005).

3.5.2.2. Efeito indireto dos agentes aplicados via aérea em plantas de soja no controle de ferrugem-asiática em condições de casa de vegetação

Neste experimentou-se conduziu-se as plantas de soja conforme *item 3.1*, utilizando-se a cultivar DS 5916 IPRO. Este ensaio teve como objetivo, avaliar a possibilidade da indução de resistência em plantas de soja, utilizando-se os tratamentos descritos na Tabela 4 com suspensões e filtrados como agentes indutores e *P. pachyrhizi* como o desafiador. Os ensaios I e II descritos na tabela, foram realizados duas vezes cada um e separadamente no tempo.

Tabela 4. Tratamentos utilizados em ensaios em plantas de soja mantidas em casa vegetação, tratadas previamente com preparações de *Metharizium* spp 72 horas antes da inoculação com urediniósporos de *P. pachyrhizi*.

Ensaio I - Suspensão de conídios (2×10^5 conídios mL⁻¹)		
Tratamentos	0 hr	72 hrs
Tratamento 1	Água destilada	Patógeno
Tratamento 2	Suspensão de conídios de <i>M. anisopliae</i> BR-01	Patógeno
Tratamento 3	Suspensão de conídios de <i>M. robertsii</i> BR-02	Patógeno
Tratamento 4	Suspensão de conídios de <i>M. humberii</i> BR-03	Patógeno
Tratamento 5	Bion ¹	Patógeno
Tratamento 6	Fungicida ²	Patógeno

Ensaio II - Filtrado de cultura livre de estruturas fúngicas		
Tratamentos	0 hr	72 hrs
Tratamento 1	Água destilada	Patógeno
Tratamento 2	Meio BD	Patógeno
Tratamento 3	Filtrado de <i>M. anisopliae</i> BR-01 75%	Patógeno
Tratamento 4	Filtrado de <i>M. robertsii</i> BR-02 75%	Patógeno
Tratamento 5	Filtrado de <i>M. humberii</i> BR-03 75%	Patógeno
Tratamento 6	Filtrado de <i>M. humberii</i> BR-03 50%	Patógeno
Tratamento 7	Filtrado de <i>M. humberii</i> BR-03 50% ³	Patógeno
Tratamento 8	Filtrado de <i>M. humberii</i> BR-03 25%	Patógeno
Tratamento 9	Bion ¹	Patógeno
Tratamento 10	Fungicida ²	Patógeno

¹ Dose: 1,66 g do p.c. L⁻¹.

² Dose: 3,33 mL do p.c. L⁻¹.

³ Tratamento aplicado um dia antes da inoculação.

Utilizou-se de vasos de 1,5 L preenchidos com substrato esterilizado Basaplant[®], mantendo-se uma planta vigorosa por vaso. Quando as plantas atingiram o estágio de desenvolvimento V3-V4, as mesmas foram pulverizadas até o ponto de escorrimento, com as preparações dos tratamentos descritos na Tabela 4. As aspersões foram executadas no primeiro e no segundo trifólios da planta, em ambas as partes da folha, 72 horas antes da inoculação com o patógeno. A inoculação consistiu na pulverização de uma suspensão de urediniósporos, obtida conforme item 3.2, na concentração de 10^4 urediniósporos mL⁻¹ contendo 0,1% Tween 20, na parte abaxial da folha nos mesmos dois trifólios que receberam os tratamentos indutores (Figura 5). Exceto para o ensaio II, a inoculação com o patógeno ocorreu em três trifólios, o terceiro não recebeu os agentes indutores. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em câmaras de nebulização caseira, como já ilustrado na Figura 3, com condições favoráveis a infecção pelo patógeno.

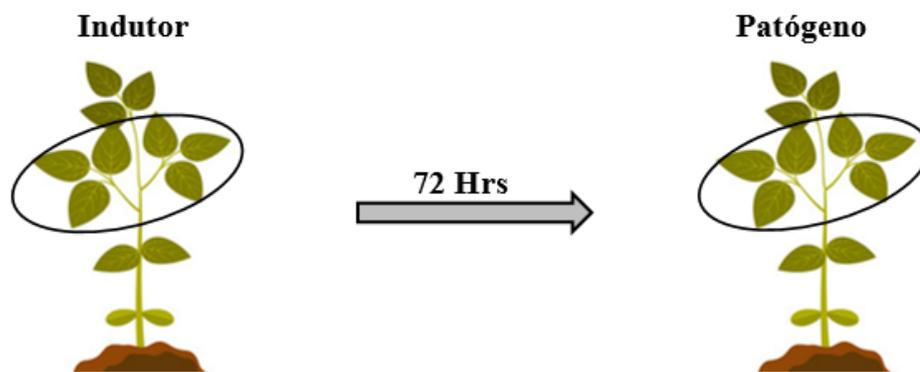


Figura 5. Esquema demonstrativo do ensaio de indução de resistência em plantas de soja, em condições de casa de vegetação (soja V3-V4), com aspersão das preparações dos tratamentos no primeiro e segundo trifólios e após 72 horas, inoculação do patógeno. Exceto para os tratamentos com os filtrados de cultura, inoculou-se *P. pachyrhizi* nos três trifólios, sendo que o terceiro não havia recebido o indutor.

A avaliação da doença ocorreu 12 dias após a inoculação completando o monociclo, com o aparecimento dos sintomas e sinais, mensurando-se a severidade da ferrugem-asiática com base em escala diagramática desenvolvida por Godoy, Koga, & Canteri, (2006). Para o ensaio I, utilizando-se suspensões de conídios de *Metarhizium* spp., avaliaram-se as seis folhas, individualmente dos dois trifólios que receberam os tratamentos indutores. Para o ensaio II, utilizando-se os filtrados de cultura estimou-se a severidade nos três trifólios (nove folhas individuais), sendo que o terceiro não recebeu tratamento indutor e apenas o patógeno, com intuito de se avaliar o possível efeito sistêmico.

Em ambos os ensaios, cada tratamento foi repetido seis vezes, e aleatorizado na casa de vegetação sob o delineamento de blocos (6 blocos no ensaio I e 10 blocos no ensaio II).

No ensaio I, para a análise dos graus médios de severidade em cada trifólio, foram ajustados modelos lineares de análise de variância com erros normais (Rencher & Schaalje, 2007). Para o ensaio II, para a análise em cada trifólio, foram usados modelos lineares de análise de variância com erros heterocedásticos (Pinheiro & Bates, 2000).

Em ambos os ensaios, o controle positivo fungicida foi descartado da análise estatística devido à baixa variabilidade dos dados, sendo que a média dos graus de severidade foi menor do que as médias dos demais nesse tratamento.

3.5.2.3. Efeito das suspensões de conídios de *Metarhizium* spp. inoculadas no substrato, no controle da ferrugem-asiática em plantas de soja mantidas em casa de vegetação

O fungo *Metarhizium* spp. sobrevive no solo e pode efetuar interações simbióticas com as plantas. Por esse motivo, esse experimento teve como objetivo avaliar o controle da ferrugem da soja na parte aérea, utilizando-se os conídios de *Metarhizium* spp. como inoculante no substrato, a fim de se verificar a possível indução da resistência sistêmica quando da chegada do patógeno via aérea.

Realizou-se a inoculação das suspensões de conídios de *M. anisopliae* BR-01, *M. robertsii* BR-02 e *M. humberii* BR-03 em sementes de soja no substrato. As sementes de soja do cultivar DS 5916 IPRO foram transferidas para vasos pequenos contendo, aproximadamente, 150 g de substrato, sendo realizada a semeadura de três sementes por vaso em profundidade em torno de 2 cm. A inoculação dos fungos foi realizada com a aplicação direta da suspensão de conídios no substrato (“*soil drench*”), de acordo com a metodologia de Parsa et al., (2013). A inoculação do fungo foi feita pela aplicação direta de 2 mL da suspensão de 10^8 conídios mL^{-1} sobre a superfície do substrato em contato com a semente, logo após a semeadura. No caso do controle (sem fungo), foram aplicados 2 mL da solução de água esterilizada contendo Tween 80 a 0,01%. Após a emergência, fez-se o raleamento das plantas, mantendo-se apenas a mais vigorosa por vaso. Todos os vasos inoculados foram mantidos em casa-de-vegetação e as plantas foram irrigadas, diariamente, e fertilizadas com 5 mL de solução do adubo N.P.K (10.10.10), na concentração de 1g/L, por vaso a cada 10 dias.

Após 20 dias da inoculação do *Metarhizium* no solo, as plantas de soja foram inoculadas com o patógeno no primeiro e no segundo trifólios na parte abaxial da folha, com uma suspensão de 10^4 urediniosporos mL^{-1} contendo 0,1% de Tween 20. Após a inoculação, as plantas foram transferidas para o interior da câmara úmida caseira, com condições favoráveis para o desenvolvimento do patógeno. A avaliação ocorreu 12 dias após a inoculação, mensurando-se a severidade de ferrugem por escala diagramática (Godoy; Koga; Canteri, 2006), nas três folhas dos dois trifólios.

Quando o experimento foi finalizado, com aproximadamente 35 dias, coletaram-se amostras de solo de quatro repetições de cada tratamento e fez-se o isolamento das espécies do *Metarhizium* a partir do substrato e da raiz em meio seletivo e avaliou-se, de forma qualitativa, a presença ou não dos fungos.

O experimento foi realizado duas vezes separadamente no tempo e em ambos os ensaios cada tratamento foi repetido oito vezes, e aleatorizado na casa de vegetação, de acordo com o delineamento em blocos (4 blocos). Cada repetição consistiu em um vaso com uma planta.

Para a análise dos graus médios de severidade em cada trifólio foram considerados modelos lineares de análise de variância com erros normais (Rencher & Schaalje 2008).

3.5.3. Análises de PCR quantitativo

As análises de qPCR (reação em cadeia da polimerase em tempo real), assim como a caracterização das moléculas biologicamente ativas presentes nos filtrados de cultura de *Metarhizium* spp. (item 3.5.11), foram desenvolvidas na Louisiana State University (LSU) nos Estados Unidos da América, sob supervisão do Prof. Dr. Zhi-Yuan Chen. Para ambos os experimentos foram utilizados esporos de *P. pachyrhizi* que estavam armazenados em ultrafreezer -80 °C, coletados em campos de soja em Baton Rouge, LA em 14/9/2017, com a germinação em torno de 60-70%.

Quanto aos isolados de *Metarhizium* utilizados nesses ensaios (qPCR e caracterização de metabólitos), os mesmos estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5. Descrição dos isolados de *Metarhizium* utilizados nos estudos envolvendo qPCR e caracterização de metabólitos.

Espécie fúngica	Código	Origem	Local de coleta
<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>M. anisopliae</i> BR-01/ [US-01]	<i>Deois flavopicta</i>	Boca da Mata- AL, Brasil
<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>M. anisopliae</i> US-02	Solo	Dakota do Sul, EUA
<i>Metarhizium robertsii</i>	<i>M. robertsii</i> US-03	<i>Curculio caryae</i>	Carolina do Sul, EUA
<i>Metarhizium robertsii</i>	<i>M. robertsii</i> US-04	Solo	Nebraska, EUA
<i>Metarhizium humberii</i>	<i>M. humberii</i> BR-03	Solo de vegetação	Rio Verde- GO, Brasil

Para o *M. humberii* BR-03, o filtrado foi produzido no Brasil, liofilizado e enviado para a LSU-EUA. O isolado *M. anisopliae* BR-01 foi obtido a partir da ATCC (*American Type Culture Collection*), sendo o mesmo utilizado em ensaios no Brasil. Os isolados *M. anisopliae* US-02, *M. robertsii* US-03 e *M. robertsii* US-04 foram utilizados a fim de se realizar os ensaios

com as mesmas espécies estudadas no Brasil, portanto utilizou-se dois isolados de cada espécie de *M. robertsii* e *M. anisopliae*. Para esses isolados, os filtrados foram produzidos na LSU conforme mencionado no item 3.4.2, utilizando-se filtros Corning® de 0,45 µm e 0,22 µm.

O experimento envolvendo qPCR, teve como objetivo quantificar a biomassa fúngica, com base em gene alvo, do agente causal da ferrugem-asiática presente em folhas de soja, tratadas com os filtrados de cultura de *Metarhizium* spp. Dessa maneira, foi possível comparar os resultados obtidos de biomassa fúngica com os dados estimados de severidade da ferrugem por escala diagramática. Assim, esse experimento foi similar com o ensaio de plantas mantidas em casa de vegetação realizado no Brasil.

3.5.3.1. Delineamento experimental, inoculação e coleta de amostras para o ensaio de qPCR

Para este experimento, foram utilizadas plantas de soja da cultivar Pioneer 93M60, cultivadas em substrato Miracle-Gro® Potting Mix 0.21-0.11-0.16, mantidas em câmaras de crescimento com temperatura de 24 °C ± 1 °C, umidade relativa de 80% e fotoperíodo de 14/10 horas (luz/escuro). Quando as plantas atingiram o estágio vegetativo V3 (aproximadamente 24 dias), as mesmas foram pulverizadas com as preparações dos tratamentos descritos na Tabela 6 no segundo trifólio das plantas de soja, em ambas as partes da folha até o ponto de escorrimento. Após 24 h, foram inoculadas com uma suspensão de 10⁵ uredíniosporos mL⁻¹ de *P. pachyrhizi* nas mesmas folhas que receberam os tratamentos. Todas as plantas foram incubadas por 24 h pós-inoculação (h.p.i), no escuro com alta umidade. Os tratamentos foram utilizados na concentração de 50% a fim de se evitar possível fitotoxicidade nas plantas de soja.

Tabela 6. Tratamentos com preparações de *Metharizium* pulverizadas em plantas de soja, mantidas em câmaras de crescimento, 24 horas antes da inoculação com os urediniósporos de *P. pachyrhizi*.

Tratamentos	
0 h	24 h
Controle água	Água
Controle água	Patógeno
Controle meio BD	Patógeno
Filtrado <i>M. anisopliae</i> BR-01	Patógeno
Filtrado <i>M. humberii</i> BR-03	Patógeno
Filtrado <i>M. robertsii</i> US-04	Patógeno

* Como controles negativo água-água, água-patógeno e meio BD (caldo batata dextrose)-patógeno.

** Utilizou-se o meio BD e os filtrados de *Metharizium*, todos com a fração < 10kDa, na concentração de 50%.

A avaliação da severidade da doença ocorreu 12 dias após a inoculação em função do aparecimento dos sintomas consistindo no monociclo, utilizando-se escala diagramática desenvolvida por Godoy; Koga; Canteri, (2006). No mesmo momento, foram coletadas duas folhas do segundo trifólio para quantificar a biomassa fúngica de *P. pachyrhizi* presente na folha de soja, por PCR em tempo real. Estas folhas foram mantidas no gelo e depois maceradas com nitrogênio líquido. Foram utilizados 10 mg da biomassa verde para a extração de DNA, sendo o restante mantido em ultrafreezer -80 °C. O estudo foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições cada tratamento (uma amostra = uma réplica biológica). O ensaio foi realizado uma vez.

Para as estimativas de severidades os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e a teste Tukey ($p \leq 0,05$).

3.5.3.2. Extração de DNA

A extração de DNA, a partir de folhas de soja, seguiu o protocolo CTAB com modificações (Doyle, J., and Doyle, 1987). Com a biomassa vegetal já obtida anteriormente, cerca de 10 mg, adicionou-se a mesma 750 µL do tampão de extração (tampão de sacarose: sacarose 0,35 M, tris-base 0,1 M, EDM 5 mM, pH 8,0 EDTA pH 8,0; lise nuclear: tris-base 0,2 M, 0,05 M EDTA pH 8,0, NaCl 2M, brometo de cetil triamônio a 2%; sarkosil a 5%), na proporção de 2,5:2,5:1 (v/v/v), adicionando-se 1% de meta-bissulfito de sódio (NaHSO₄). Os tubos foram colocados em banho-maria a 65 °C por 45 min. Posteriormente, 700 mL de CIA (clorofórmio 24:1 álcool isoamílico) foram adicionados ao mesmo tubo. Os microtubos foram

então invertidos manualmente por cerca de 5 minutos e depois centrifugados a 12.000 rpm por 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante, cerca de 500 μ L, foi transferido para um novo tubo, adicionou-se isopropanol gelado na mesma quantidade e centrifugou-se novamente (12.000 rpm por 10 min). Em seguida, o sobrenadante foi descartado e, 500 μ L de álcool etílico a 70% foram adicionados. As amostras foram centrifugadas novamente (5 min a 12.000 rpm), sendo esta etapa de lavagem realizada duas vezes. O sobrenadante foi removido e o *pellet* foi mantido em temperatura ambiente durante a noite para secar. Após a secagem, ressuspendeu-se em 100 μ L de tampão (5 ml de Tris 1M pH 8*, 1 ml de EDTA 0,5M pH 8 e dH₂O 496 ml) e centrifugou-se por 3 minutos a 12.000 rpm. Todas as amostras foram quantificadas usando-se um espectrofotômetro Nano-Drop ND-1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, Estados Unidos). A concentração final utilizada foi de 100 ng/mL de DNA.

3.5.3.3. Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)

De acordo com o protocolo descrito anteriormente, fez-se a extração de DNA de folhas contendo lesões de ferrugem-asiática. Em seguida, realizou-se a reação de qPCR com os primers descritos na Tabela 7.

Para tanto utilizou-se o volume final de 20 μ L contendo 1x Master Mix PCR Universal TaqMan (Applied Biosystems), 1 μ L de cada primer, 0,5 μ L de TaqMan probe, 5 μ L de água e 2,5 μ L da amostra de DNA. As condições de ciclagem térmica foram: 50 °C por 2 min, 95 °C por 10 min e 40 ciclos de amplificação de 95 °C por 15 segundos, e 55,7 °C para TaqMan e 54 °C para SYBR green por 1 min. Três repetições técnicas foram incluídas para cada amostra. As reações de qPCR foram realizadas usando-se o protocolo CFX Connect (Biorad®).

O método $\Delta\Delta$ Ct (*Cycle Threshold*) foi utilizado para se calcular o nível de expressão relativa do gene alvo de *P. pachyrhizi* à ubiquitina de soja (Schmittgen & Livak, 2008). Os dados apresentados são os valores médios \pm erro padrão de cinco repetições biológicas.

Tabela 7. Lista de primers usados no PCR quantitativo em tempo real para a quantificação da colonização de plantas de soja por *P. pachyrhizi*.

Gene alvo	Nome e sequência dos primers	Tamanho (bp)
<i>Glycine max</i>	U3F GTGTAATGTTGGATGTGTTCCC	107
Ubiquitin-3	U3R ACACAATTGAGTTCAACACAAACCG	
<i>Phakopsora</i>	TUBF CCAAGGCTTCTTCGTGTTTCA	67
<i>pachyrhizi</i> α -tubulin	TUBR CAAGAGAAGAGCGCCAAACC	
TaqMan probe	5' FAM-3' TCGTTTGGAGGCGGACTGGTTCA	

3.5.4. Caracterização dos metabólitos presentes nos filtrados de *Metarhizium*

Para se realizar a identificação das moléculas biologicamente ativas presentes nos filtrados de cultura de *Metarhizium* spp., alguns passos foram seguidos, a fim de se identificar a natureza química das moléculas. Para tanto foram realizados diversos testes de germinação *in vitro* conforme descrito no item 3.5.2.

Passo 1: Identificar em qual fração estavam presentes as moléculas com atividade antiferrugem. Assim, o filtrado foi fracionado em duas frações utilizando-se filtros de corte de 3k e 10k Daltons (*Ultra Centrifugal Filters*, Amicon®) e verificou-se o efeito dos mesmos sobre os urediniósporos. O primeiro ensaio foi utilizado com o "filtrado de fluxo" contendo moléculas menores do que 3 e 10kDa e, o segundo ensaio, foi realizado com o "filtrado retido", contendo moléculas maiores do que 3 e 10kDa, ambos tendo como controles negativos água e meio BD.

Para este ensaio utilizou-se somente o isolado *M. anisopliae* BR-01 obtido a partir da ATCC. Além das frações mencionadas acima, no primeiro ensaio utilizou-se também do filtrado de cultura em diferentes concentrações finais (25, 37,5 e 50%) e esses não foram fracionados, sendo somente efetuada a diluição do filtrado pela adição de água esterilizada. Para o fracionamento, utilizou-se o filtrado concentrado (100%).

Para a avaliação, além da germinação de 100 urediniósporos, também se mediu o comprimento do tubo germinativo, com o auxílio do software AmScope®, escolhendo-se aleatoriamente 20 esporos por repetição. A porcentagem de inibição foi calculada em relação ao controle água, utilizando-se a seguinte equação: % de inibição = $[(C-T)/C] \times 100$. C=Controle água; T – tratado.

Passo 2: Verificar se as moléculas com atividade antiferrugem eram estáveis ou lábeis ao calor e mantinham a atividade biológica após o aquecimento. Assim, o filtrado de cultura de *Metarhizium* foi aquecido a duas temperaturas diferentes, de 50 e 90°C durante cinco minutos em banho-maria. Após o aquecimento, o teste de germinação foi realizado.

Os isolados utilizados foram: *M. anisopliae* US-02, *M. robertsii* US-03 e *M. robertsii* US-04, *M. anisopliae* BR-01 e *M. humberii* BR-03. As preparações dos fungos *M. anisopliae* BR-01 e *M. humberii* BR-03 foram representadas nas frações < 10kDa. Para os controles negativos, utilizou-se água e meio BD.

Para a avaliação, além da germinação de 100 esporos, também se mediu o comprimento do tubo germinativo, com o auxílio do software AmScope®, escolhendo-se aleatoriamente 20 esporos por repetição. A porcentagem de inibição foi calculada em relação ao controle água, utilizando-se a mesma equação citada no passo 1.

Passo 3: Verificar a resistência das moléculas com atividade antiferrugem quanto a ação de enzimas proteolíticas. Neste ensaio, foi utilizada a proteinase K de *Tritirachium album* (≥ 30 unidades/mg de proteína; Sigma-Aldrich®). Assim, foram adicionados 3 mg de proteinase K em 200 μ L de tampão (tampão Tris-HCl 25 mM, pH 8,0, contendo cloreto de cálcio 2,5 mM). Depois disso, 4,4 μ L de proteinase K (equivalente a 2 unidades) foram adicionados em 500 μ L dos filtrados de *Metarhizium*. Em seguida, o material foi homogenizado e incubado a 37 °C por 1 hora em banho-maria, para se inativar as moléculas de natureza proteica presentes no filtrado.

O experimento consistiu de 8 tratamentos, representados por: *M. anisopliae* BR-01, *M. humberii* BR-03, *M. anisopliae* US-02, *M. robertsii* US-03, *M. robertsii* US-04 todos na fração < 10kDa. Como controle, utilizou-se água sem proteinase K, água + proteinase K e meio de cultura BD + proteinase K. Para a avaliação realizou-se a contagem de 100 esporos, como mencionado no passo 1.

4. RESULTADOS

4.1. Testes *in vitro*

4.1.1. Efeito direto dos agentes sobre a germinação de urediniósporos de *P. pachyrhizi*

Os testes *in vitro* foram divididos em três ensaios: I – suspensões de conídios 2×10^5 conídios mL⁻¹; II – filtrados de cultura livre de estruturas fúngicas; III – filtrados de cultura livre de estruturas fúngicas dividido em diferentes concentrações finais. Os testes foram realizados duas vezes, sendo descritos nas tabelas como experimentos I e II.

Os resultados obtidos para o efeito direto *in vitro* na germinação de urediniósporos, utilizando as suspensões de conídios de *Metarhizium* spp. (Ensaio I), estão apresentados na Tabela 8. Nenhum dos tratamentos com *Metarhizium* apresentou efeito direto sobre a germinação dos urediniósporos, sendo que em todos os tratamentos a germinação foi superior a 90% em ambos os experimentos. Não se observou diferença estatística entre os tratamentos em relação ao controle água.

Tabela 8. Germinação *in vitro* de urediniósporos de *P. pachyrhizi* após seis horas, submetidos aos tratamentos com suspensões de conídios de *M. robertsii* BR-02, *M. humberii* BR-03, *M. anisopliae* BR-01 e controle negativo água.

Tratamentos	Experimento I	Experimento II
	Germinação (%)*	Germinação (%)*
Controle água	97,6 a	95,2 a
<i>Metarhizium</i> BR-02	98,2 a	95,4 a
<i>Metarhizium</i> BR-03	93,5 a	96,2 a
<i>Metarhizium</i> BR-01	98,0 a	97,0 a

*Para o parâmetro germinação de urediniósporos, médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,01$).

Os resultados do ensaio II, utilizando-se os filtrados de cultura concentrado na germinação *in vitro* dos urediniósporos estão mostrados na Tabela 9. Verificou-se que todos os tratamentos com filtrado se diferem estatisticamente dos controles negativos água e meio BD (caldo de batata dextrose) e se igualam ao controle positivo fungicida em ambos os experimentos. No primeiro experimento, os filtrados de cultura dos isolados de *M. anisopliae* BR-01, *M. robertsii* BR-02 e *M. humberii* BR-03 mostraram valores altos de inibições, sendo 83, 86 e 95%, respectivamente.

Tabela 9. Germinação e inibição da germinação de urediniósporos de *P. pachyrhizi* *in vitro*, após seis horas, submetidos aos tratamentos com filtrados de cultura na concentração final de 50% de *M. anisopliae* BR-01, *M. robertsii* BR-02, *M. humberii* BR-03 e controle negativos água e meio BD (batata dextrose) e controle positivo com fungicida.

Tratamentos	Experimento I		Experimento II	
	Germinação (%)*	Inibição da germinação (%) **	Germinação (%)*	Inibição da germinação (%) **
Controle meio BD	93,5 a	-	73,7 a	-
Controle água	85,0 a	-	54,7 a	-
<i>Metarhizium</i> BR-01	13,8 bc	83	20,2 b	63
<i>Metarhizium</i> BR-02	11,5 bc	86	0,14 b	99
<i>Metarhizium</i> BR-03	3,6 c	95	0,14 b	99
Controle fungicida	16,0 b	81	0	100

*Para o parâmetro germinação de urediniósporos, médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey ($p \leq 0,01$).

** % de inibição = $[(C-T)/C] \times 100$. C=Controle água; T = teste.

No segundo experimento, os isolados *M. robertsii* BR-02 e *M. humberii* BR-03 inibiram 99% da germinação. No entanto, isso pode estar relacionado com a viabilidade dos esporos, pois até mesmo nos controles água e meio BD a germinação foi menor em comparação com o primeiro experimento. Entretanto, ficou evidente o efeito direto dos filtrados de cultura desses fungos entomopatogênicos sobre a redução da germinação dos urediniósporos de *P. pachyrhizi*.

Para o ensaio III, utilizando-se filtrados de cultura em diferentes concentrações finais (12,5, 25, 37,5 e 50%), verificou-se que a proporção de germinação decresceu igualmente para os filtrados das três espécies (BR-01, BR-03 e BR-02), a medida que a concentração dos mesmos foi aumentada (Figura 6). Para o isolado *M. humberii* BR-03, o comportamento foi um pouco diferente em relação aos testes mostrados anteriormente. Notou-se que até mesmo na concentração final de 50% houve germinação dos esporos em torno de 45,5%. Porém, aparentemente, com base em observação qualitativa, os comprimentos dos tubos germinativos para todas as concentrações foram inferiores ao dos controles (Figura 7). É possível observar a formação de apressórios nos controles, o que não foi visto com frequência na presença dos filtrados de *Metarhizium*. Portanto, embora tenha ocorrido germinação, os tubos germinativos apresentaram-se menos desenvolvidos, aparentemente com menor número de apressórios, evidenciando que os esporos sofreram a ação dos metabólitos presentes nos filtrados de *Metarhizium*. A condução de experimentos quantitativos acerca desses parâmetros seria interessante para se reforçar essas observações qualitativas.

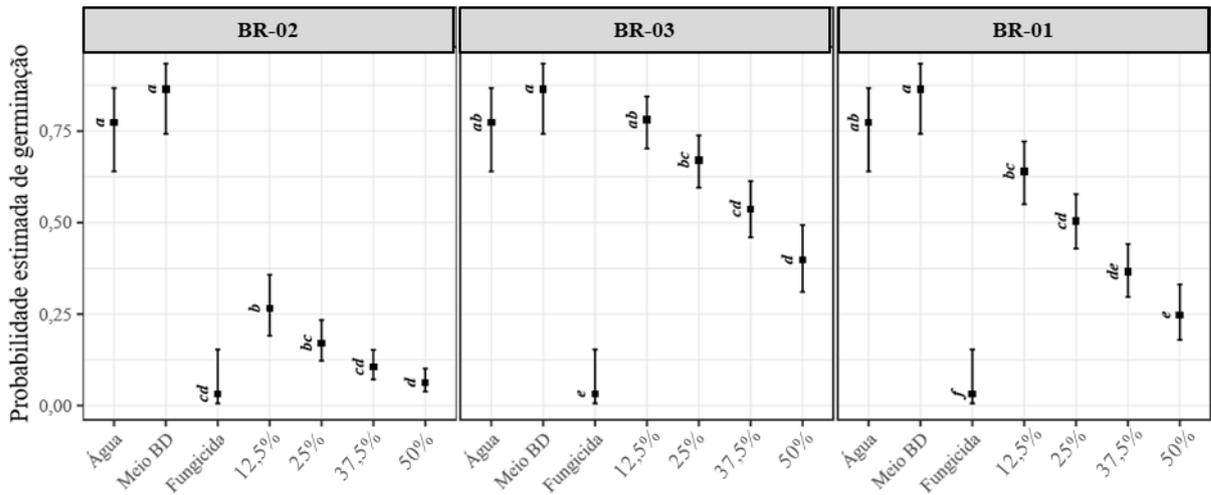


Figura 6. Germinação *in vitro* de urediniósporos de *P. pachyrhizi* após 6 horas, na presença de filtrados de cultura, em diferentes concentrações finais (12,5, 25, 37,5 e 50%), das espécies *M. robertsii* BR-02, *M. humberii* BR-03 e *M. anisopliae* BR-01. Controle negativo água e meio BD (batata-dextrose) e controle positivo com fungicida. As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

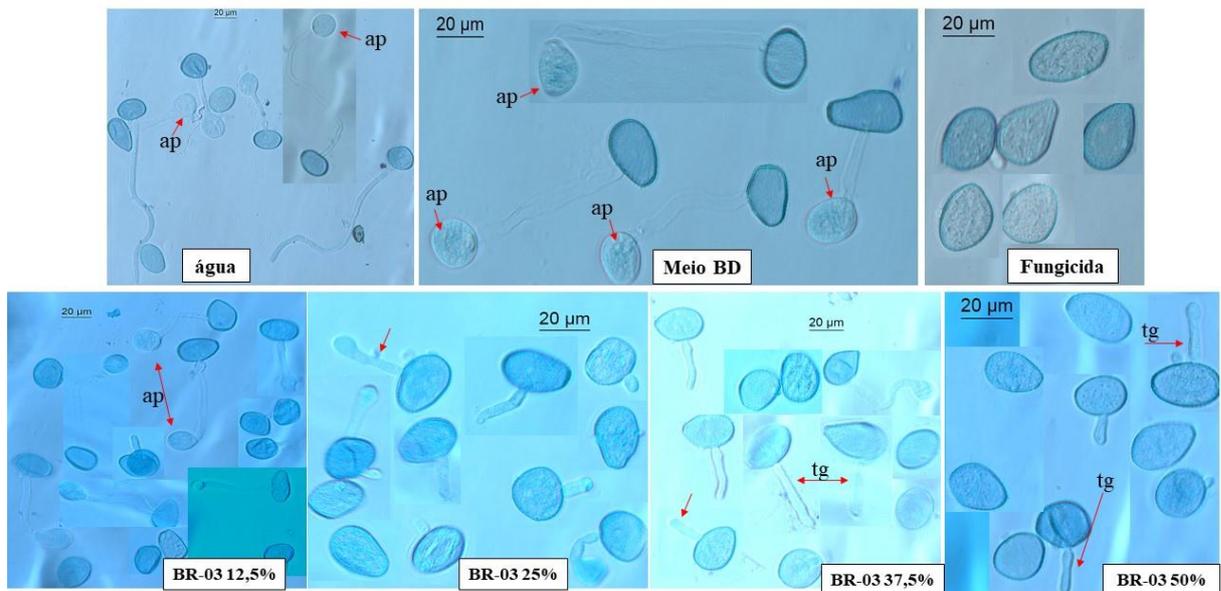


Figura 7. Germinação de urediniósporos de *P. pachyrhizi* após 6 horas, na presença do filtrado de *M. humberii* BR-03 em diferentes concentrações finais (12,5, 25, 37,5 e 50%). (ap – apressório, tg– tubo germinativo).

Para os outros isolados (*M. anisopliae* BR-01 e *M. robertsii* BR-02) o comportamento foi semelhante ao dos ensaios anteriores. Na concentração final de 50%, o isolado *M. robertsii* BR-02 apresentou 7,67% de germinação e *M. anisopliae* BR-01, 22,20% de germinação. Com base neste experimento foi possível determinar a EC_{50} (concentração dos filtrados de cultura necessária para reduzir em 50% a germinação dos esporos). Para o isolado *M. robertsii* BR-02,

a EC_{50} seria menor do que a concentração final de 12,5%, enquanto que para o isolado *M. anisopliae* BR-01 a concentração final de 25% foi capaz de reduzir em 50% a germinação e para o *M. humberii* BR-03 uma concentração final em torno de 40% seria necessária.

O controle água apresentou 77% de germinação e o controle meio BD (caldo de batata dextrose) 86,5% de germinação. Dessa maneira, comparando-se com os controles, os filtrados de cultura de *Metarhizium* exibem efeito inibitório na germinação de urediniosporos *in vitro*.

4.2. Testes *in vivo*

4.2.1. Efeito indireto dos agentes aplicados em folíolos destacados de soja no controle de ferrugem-asiática em condições de laboratório

Em relação aos experimentos de efeito indireto, envolvendo a possível indução de resistência em folíolos destacados de soja, primeiramente se tem os resultados quanto a utilização de conídios de *Metarhizium* spp. atuando como possíveis indutores (Figura 8). Os resultados demonstram que os valores em dois dos tratamentos testados foram melhores em relação aos demais na capacidade de reduzir o número de pústulas por cm^2 . Enquanto no controle água o número médio foi de 29,5 no tratamento com conídios de *M. anisopliae* BR-01 e *M. humberii* BR-03, o mesmo foi de 5,0 e 6,5 pústulas por cm^2 , respectivamente.

Na Figura 8 é possível verificar que no controle água, há uma grande variação nas observações (círculos), chegando até a 57 pústulas por cm^2 da folha. Na presença das suspensões de conídios de *Metarhizium* spp., a maioria das observações estão concentradas na faixa de 0 a 15, com algumas observações ao redor de 30 pústulas por cm^2 , até mesmo para o isolado *M. robertsii* BR-02, que não demonstrou diferença estatística em relação ao controle água. Por sua vez, o controle fungicida, como já mencionado, apresentou muitas observações com valores iguais a 0, evidenciando o controle da ferrugem em condições envolvendo o uso de folíolos destacados de soja.

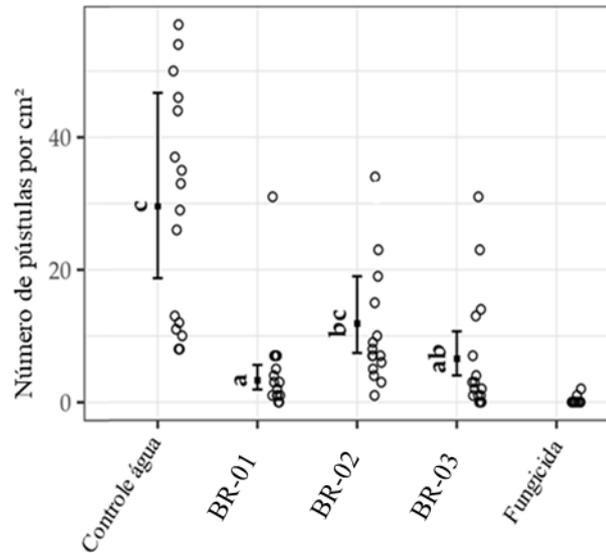


Figura 8. Número de pústulas causadas por *P. pachyrhizi* em folíolos destacados de soja, 12 dias após a inoculação. Os folíolos foram tratados com suspensão de conídios das espécies *M. anisopliae* BR-01, *M. robertsii* BR-02, *M. humberii* BR-03 (2×10^5 conídio mL⁻¹), 72 horas antes da inoculação do patógeno. Controles - água e fungicida. As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Círculos = contagens efetuadas.

Em relação ao uso dos filtrados de cultura de *Metarhizium* no controle da ferrugem em condições de folíolo destacado de soja, os resultados são mostrados na Figura 9. O isolado *M. humberii* BR-03 reduziu, de maneira significativa, o número de pústulas em relação aos controles em todas as concentrações usadas, mostrando seu potencial no controle da ferrugem. Por sua vez, os filtrados obtidos de *M. anisopliae* BR-01, causaram redução no número de pústulas somente na maior concentração (100%). No entanto, os filtrados na concentração de 100%, tanto do isolado *M. anisopliae* BR-01 quanto do isolado *M. humberii* BR-03, ocasionaram sintomas de fitotoxidez em alguns folíolos, o que levou ao descarte das mesmas. O isolado *M. robertsii* BR-02, não exibiu nenhum efeito no controle da ferrugem se igualando ao controle água.

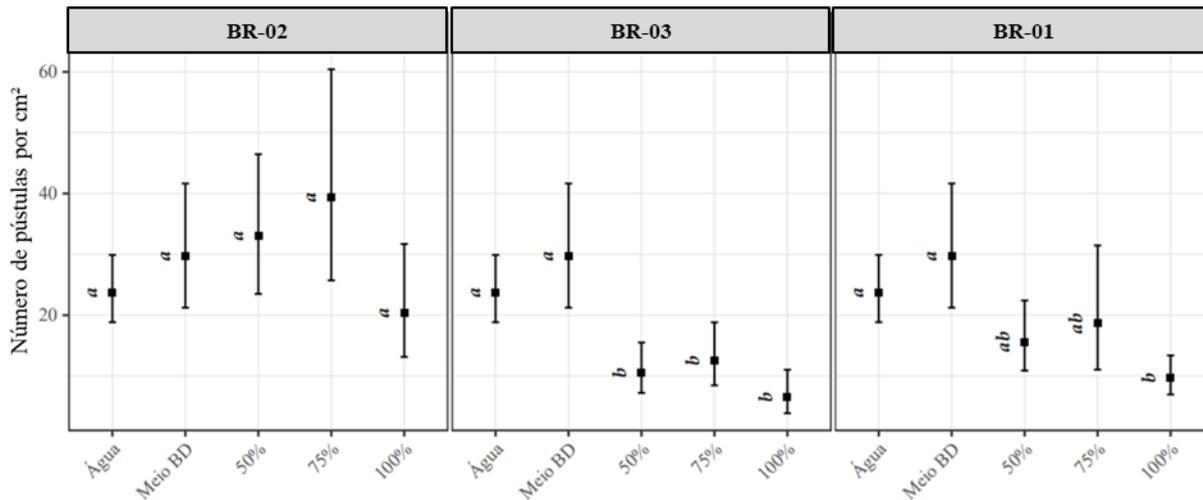


Figura 9. Número de pústulas causadas por *P. pachyrhizi* em folíolos destacados de soja, 12 dias após a inoculação. Os folíolos foram tratados com os filtrados de cultura das espécies *M. robertsii* BR-02, *M. humberii* BR-03 e *M. anisopliae* BR-01, nas concentrações de 50, 75 e 100%, 72 horas antes da inoculação. Controles - água e meio BD (caldo de batata dextrose). As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Nesses dois ensaios com folíolos destacados observou-se alta variabilidade dentro dos tratamentos, principalmente para o controle água no primeiro ensaio e para *M. robertsii* BR-02 no segundo ensaio, possivelmente decorrente da irregularidade na distribuição das pústulas na superfície foliar.

Os dados provenientes do tratamento com fungicida em ambos os ensaios, foram descartados da análise estatística, pois a maioria das contagens observadas foram iguais a zero.

4.2.2. Efeito indireto dos agentes aplicados via aérea em plantas de soja no controle de ferrugem-asiática em condições de casa de vegetação

Foram realizados dois ensaios independentes em diferentes datas, pelo uso da suspensão de conídios de *Metarhizium* ou filtrados de culturas dos fungos para avaliar a indução de resistência em plantas de soja em casa de vegetação.

No primeiro experimento, onde as plantas de soja foram pulverizadas com conídios de *Metarhizium* spp. (72 horas antes da inoculação do patógeno), os resultados estão apresentados na Figura 10. Apenas o acibenzolar-S-metílico se sobressaiu com severidade média de ferrugem de 0,5%, enquanto que nos tratamentos com suspensões de conídios de *Metarhizium* e controle água as médias foram ao redor de 2% de severidade. Por sua vez, não houve diferença estatística entre os tratamentos com *Metarhizium* spp., exceto para o acibenzolar-S-metílico em relação ao controle água. Entretanto, no segundo experimento, a severidade foi maior na maioria dos

tratamentos, inclusive no controle água. Por outro lado, os dois isolados *M. robertsii* BR-02 e *M. anisopliae* BR-01 mantiveram a mesma faixa de severidade, com médias de 1,69 e 1,78%, respectivamente. Ambos evidenciaram uma redução da severidade da ferrugem-asiática em comparação ao controle água, assemelhando-se ao controle positivo acibenzolar-S-metílico cujas plantas apresentaram uma severidade em torno de 1,38%.

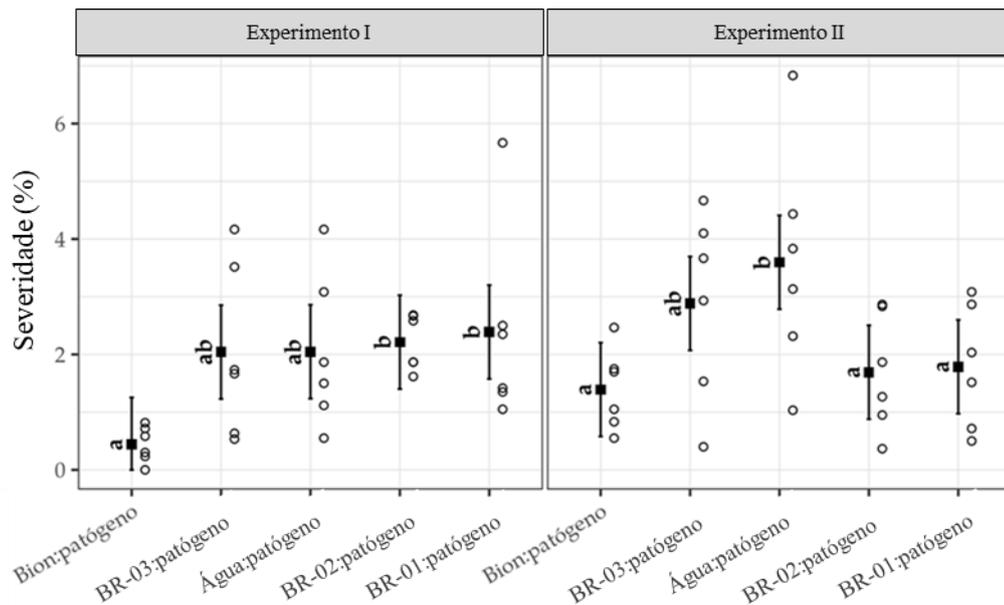


Figura 10. Severidade de ferrugem-asiática em plantas de soja mantidas em casa de vegetação, com tratamentos aplicados em dois trifólios 72 horas antes da inoculação do patógeno nos mesmos trifólios. Tratamentos com suspensão de 2×10^5 conídios mL^{-1} de *M. humberii* BR-03, *M. robertsii* BR-02 e *M. anisopliae* BR-01. Controles = água e acibenzolar-S-metílico (Bion®). Avaliações efetuadas 12 dias após a inoculação com *P. pachyrhizi*. As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Os círculos se referem aos graus de severidade médios dos dois trifólios de cada planta/repetição.

Embora as condições experimentais sejam completamente diferentes em folíolos destacados versus plantas mantidas em casa de vegetação, se compararmos os resultados da Figura 8 com os da Figura 10, onde também se utilizou a suspensão de conídios nas folhas, o isolado *M. anisopliae* BR-01 mostrou redução de severidade sobre *P. pachyrhizi*. Já para o isolado *M. robertsii* BR-02, apesar de ter havido uma diminuição no número de pústulas, o mesmo não apresentou diferença estatística com o controle água em folíolos destacados. Todavia, em plantas de soja o mesmo reduziu a severidade da ferrugem. Ao contrário, para o isolado *M. humberii* BR-03, os resultados encontrados em folíolos destacados não se mantiveram em plantas, portanto, não demonstrando nenhum efeito das preparações do mesmo na redução de ferrugem em condições de casa de vegetação em ambos os ensaios.

O efeito do uso dos filtrados de cultura, via aplicação aérea em plantas de soja no controle de ferrugem-asiática, foi avaliado por meio da severidade após 12 dias da inoculação com o patógeno nos três trifólios da planta (Figura 11). Neste caso, o terceiro trifólio não recebeu os tratamentos indutores, somente o patógeno, com o intuito de se avaliar o possível efeito sistêmico da indução.

O experimento foi realizado duas vezes, entretando, no primeiro os filtrados de cultura desencadearam alta fitotoxidez nas plantas de soja, o que dificultou a avaliação da severidade causada por *P. pachyrhizi*, razão pela qual os dados não são apresentados.

No segundo experimento com os filtrados, utilizou-se a mesma concentração de 75% para os três isolados, e adicionou-se três tratamentos somente para o isolado *M. humberii* BR-03, utilizando-se concentrações menores (25 e 50%), além de um terceiro teste pulverizando-se *M. humberii* BR-03 (50%), 24 h antes da inoculação com o patógeno. Esses tratamentos tinham a finalidade de se avaliar a fitotoxidez nas plantas de soja com os filtrados diluídos e o controle da ferrugem em dois tempos de aplicação dos indutores.

No segundo experimento, com relação aos resultados quanto a fitotoxidez, de maneira inesperada, verificou-se que os filtrados na concentração de 75% ocasionaram poucos sintomas, diferentemente do primeiro experimento. Logo, os filtrados mais diluídos de *M. humberii* BR-03 ocasionaram apenas algumas manchas de coloração fraca, o que possibilitou a avaliação da severidade.

Nas Figuras 11 e 12 abaixo, observaram-se que alguns tratamentos se destacaram na redução da severidade da ferrugem-asiática. Primeiramente, deve-se analisar os resultados na Figura 11 referentes aos trifólios 1 e 2, os quais receberam os possíveis indutores e o patógeno. Os isolados *M. humberii* BR-03 (nas concentrações de 50 e 75%) e *M. anisopliae* BR-01 (na concentração de 75%) se destacaram na redução da severidade nesses trifólios, exibindo diferenças estatísticas em relação ao controle água, e também em relação ao meio BD no trifólio 2. As médias da severidade dos dois trifólios para *M. humberii* BR-03 (50 e 75%) foram 1,08 e 0,83%, respectivamente. Para *M. anisopliae* BR-01 (75%) foi de 1,05%, sendo que o controle água apresentou 7,9%.

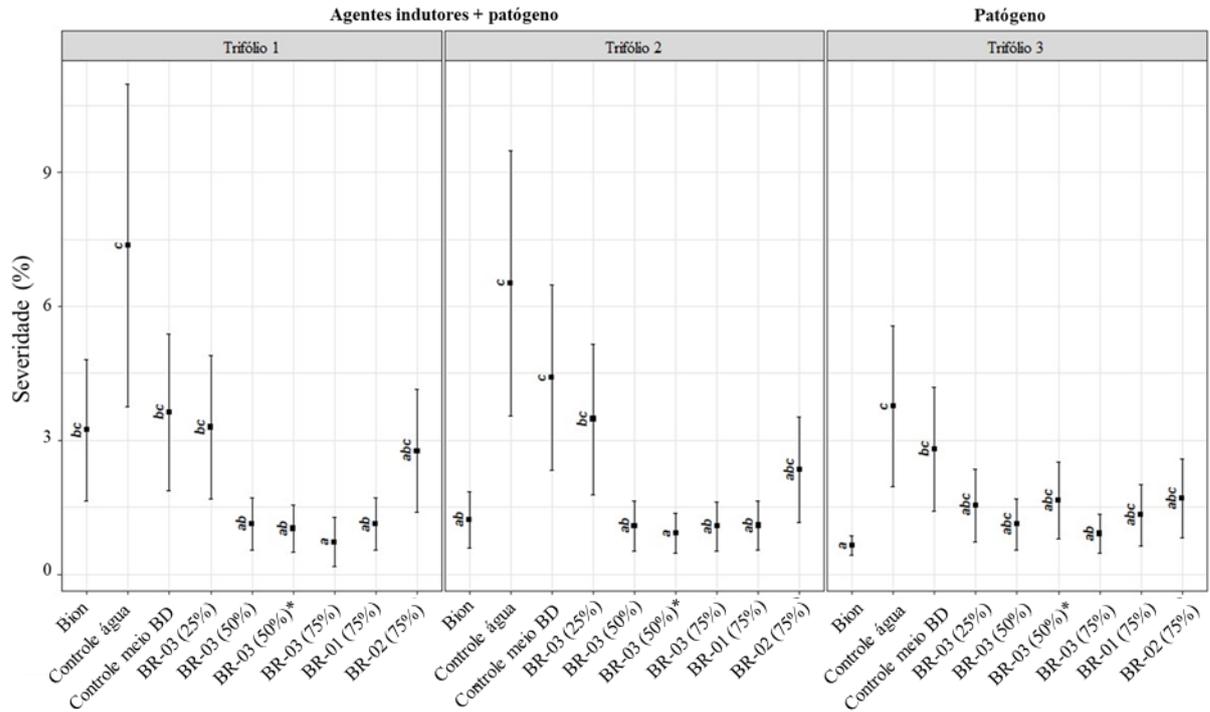


Figura 11. Severidade da ferrugem-asiática em cada trifólio das plantas de soja, com os agentes indutores aplicados nos dois trifólios (1 e 2), 72 horas antes da inoculação do patógeno nos mesmos trifólios. Trifólio 3 não recebeu os filtrados, somente água antes da inoculação com *P. pachyrhizi*. Tratamentos com filtrados de culturas de *M. anisopliae* BR-01 (75%), *M. robertsii* BR-02 (75%) e *M. humberii* BR-03 (75, 50, 25%). Controles - água, meio BD (batata-dextrose) e acibenzolar-S-metílico (Bion®). *BR-03 (50%) aplicado 24 h antes da inoculação. As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Os tratamentos adicionais com *M. humberii* BR-03, na concentração de 50%, aplicado em tempos distintos (24 h e 72 h antes da inoculação), exibiram resultados semelhantes, visto que em ambos os tempos se observa redução dos sintomas da doença. A média de severidade nos trifólios foi de 0,95 e 1,08% respectivamente para 24 e 72 h. Ambos os tratamentos diferiram do controle água nos dois trifólios, e do controle meio BD (batata-dextrose) somente no trifólio 2. Por outro lado, o filtrado na concentração de 25% não exibiu nenhum efeito no controle da ferrugem.

O isolado *M. robertsii* BR-02, com base nas análises estatísticas, não proporcionou nenhum efeito no controle da ferrugem-asiática da soja em nenhum trifólio.

Para o trifólio 3 que não recebeu o indutor, o tratamento com *M. humberii* BR-03 (75%) nos trifólios 1 e 2, superou os demais, com as plantas apresentando uma severidade de 1,12%, portanto, mostrando uma redução significativa dos sintomas quando comparado com o controle água (severidade 3,7%). Dessa maneira, esses resultados apontam uma possível

indução de resistência sistêmica, o que precisaria ser comprovado com base em análises bioquímicas e moleculares.

O tratamento com o acibenzolar-S-metílico (Bion[®]), ativador de plantas de uso comercial, foi o único em que as médias de severidade no primeiro e no segundo trifólios foram discordantes. Contudo, o mesmo ocasionou redução da severidade principalmente no segundo trifólio. No trifólio 3 das plantas de soja, o Bion[®] ocasionou uma redução significativa da ferrugem da soja em relação aos dois controles.

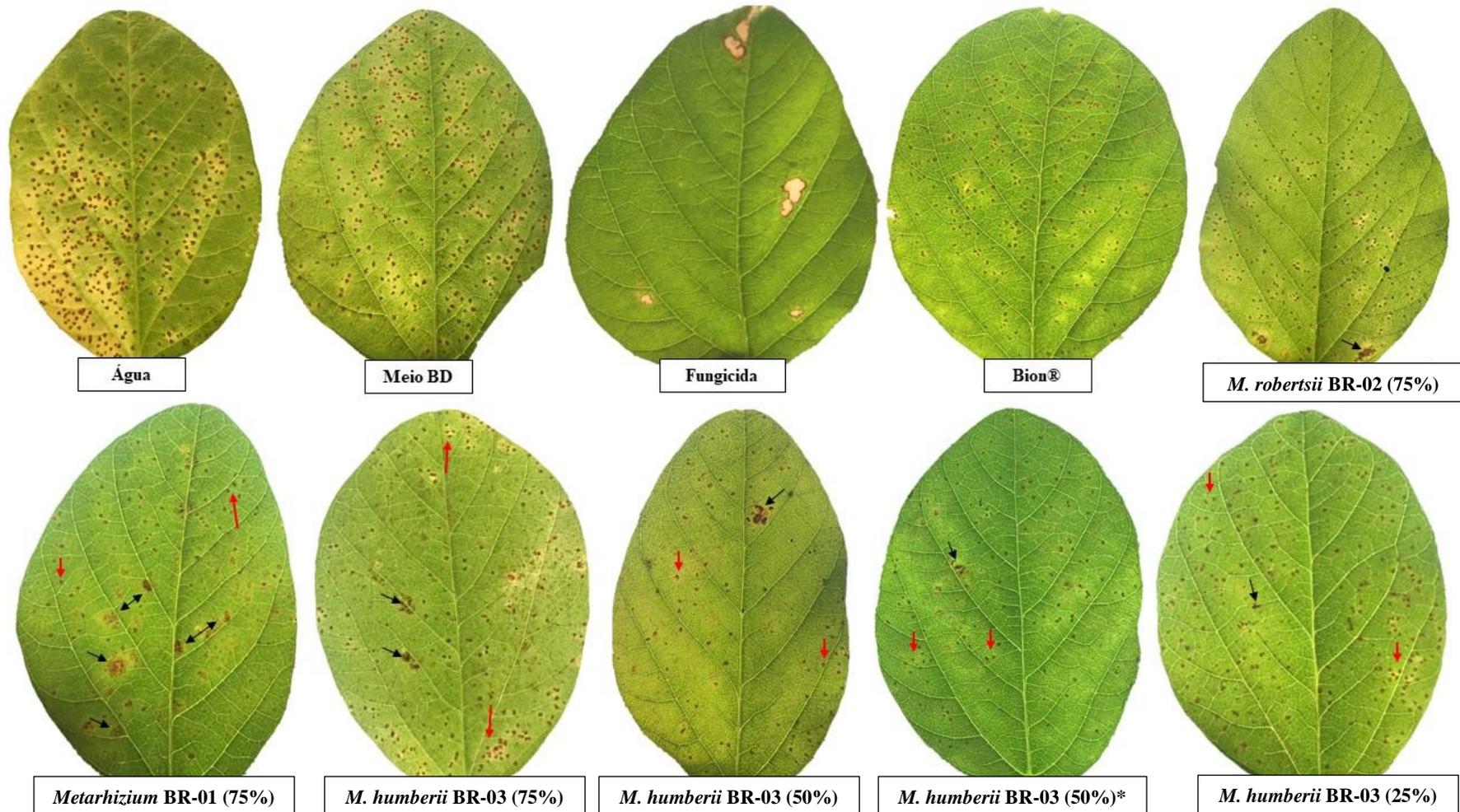


Figura 12. Severidade média da ferrugem-asiática dos dois trifólios que reberam os indutores e o patógeno 12 dias após a inoculação, em plantas de soja (DS 5916 IPRO) tratadas 72 horas antes da inoculação com filtrados de *M. anisopliae* BR-01 (75%), *M. robertsii* BR-02 (75%) e *M. humberii* BR-03 (75, 50, 25%). Controles - água, meio BD (batata-dextrose), acibenzolar-S-metílico (Bion®) e fungicida. *BR-03 (50%) aplicado 24 h antes da inoculação. Setas pretas indicam sintomas de fitotoxicidade. Setas vermelhas indicam lesões de ferrugem-asiática.

4.2.3. Efeito de suspensões de conídios de *Metarhizium* spp. inoculados no substrato, no controle de ferrugem-asiática em plantas de soja mantidas em casa de vegetação

Após 20 dias da inoculação dos conídios de *Metarhizium* no substrato em contato com a semente, inoculou-se o patógeno em dois trifólios na parte aérea e avaliou-se a severidade após 12 dias (Figura 13). Observou-se comportamento semelhante do isolado *M. anisopliae* BR-01 nos dois experimentos, com severidade média nos dois trifólios no experimento I de 1,08% e no experimento II de 1,7%. Dessa forma, o mesmo se sobressaiu diante dos demais, evidenciando-se diferença estatística em comparação ao controle água no segundo experimento, em que o mesmo apresentou 2,95% de severidade. Já os outros isolados *M. robertsii* BR-02 e *M. humberii* BR-03 não exibiram redução da ferrugem-asiática da soja em ambos os experimentos.

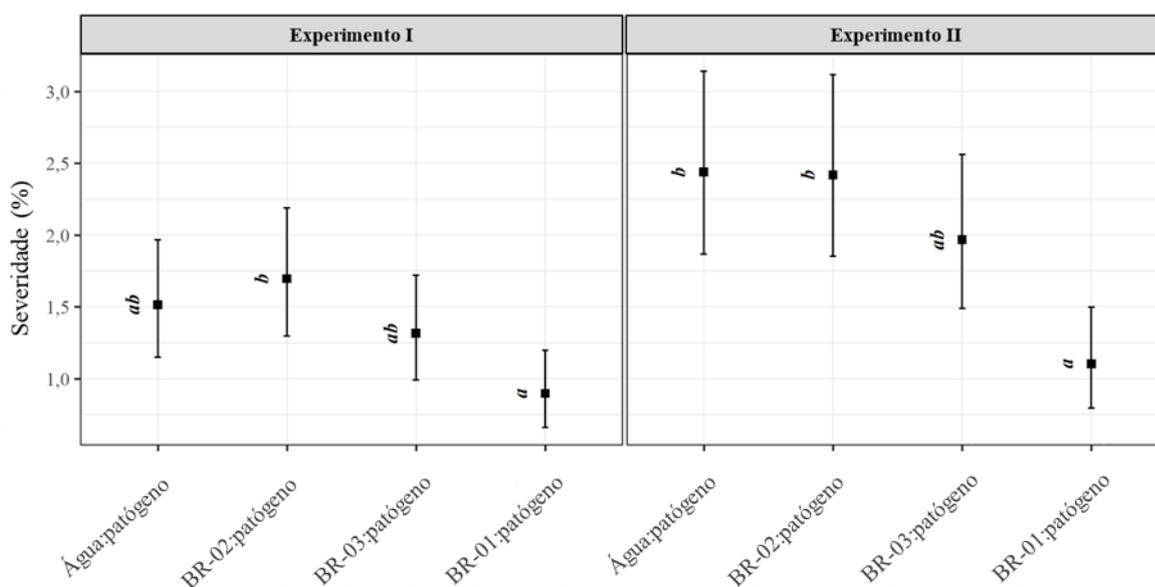


Figura 13. Severidade da ferrugem-asiática na parte aérea das plantas de soja, tratadas com suspensão de conídios de *M. robertsii* BR-02, *M. humberii* BR-03 e *M. anisopliae* BR-01 (1×10^8 conídio mL^{-1}) no substrato, 20 dias antes da inoculação com o patógeno. As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Como os experimentos foram realizados separadamente no tempo, talvez algum fator climático possa ter interferido de um ensaio para o outro, onde somente o isolado *M. anisopliae* BR-01, manteve comportamento semelhante nos dois experimentos.

Após a avaliação dos sintomas, foi realizado o re-isolamento dos fungos (três espécies) a partir do substrato e das raízes das plantas de soja, em meio de cultura seletivo. A avaliação

foi de forma qualitativa observando a presença ou não dos fungos e os mesmos estavam presentes na raiz e/ou no solo.

4.3. Biomassa de *P. pachyrhizi* em plantas de soja

Nas Figuras 14 e 15 estão apresentados os resultados do ensaio com plantas de soja (cultivar Pioneer 93M60), a fim de se avaliar a severidade da doença e se determinar a possível biomassa do fungo causador da ferrugem presente nas folhas de soja. Através do uso de qPCR foi possível observar uma redução na concentração de DNA do patógeno nas folhas (Figura 14b), o que se mostra condizente com os dados obtidos de severidade da doença (Figura 14a). Observou-se que as plantas de soja tratadas com os filtrados de cultura de *Metarhizium* dos três isolados, exibiram redução na expressão relativa do gene alvo de ferrugem, detectado por qPCR, em que a expressão do gene foi superior aos tratamentos inoculados apenas com o patógeno (controles).

O filtrado de cultura do isolado *M. anisopliae* BR-01 < 10kDa se destacou diante dos demais com uma severidade de 1,65% contra 3,5% no controle água, apresentando diferença estatística. Os isolados *M. humberii* BR-03 e *M. robertsii* US-04 não exibiram diferenças estatísticas quanto ao controle meio BD, mas sim quanto ao controle água.

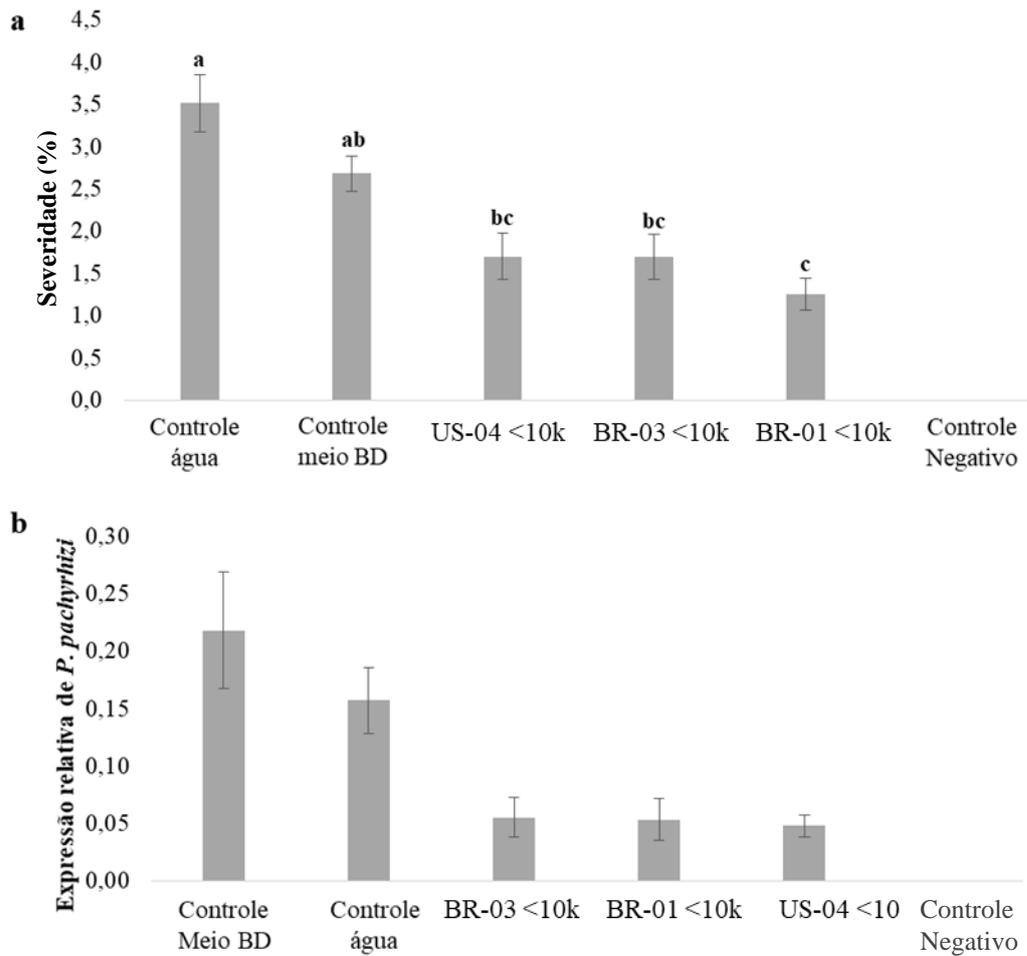


Figura 14. Respostas de plantas de soja (Pioneer 93M60), mantidas em câmaras de crescimento e, tratadas com filtrados de cultura de *M. robertsii* US-04, *M. humberii* BR-03 e *M. anisopliae* BR-01 (fração < 10kDa) a 50%, 24 horas antes da inoculação com *P. pachyrhizi*; Controles - água e meio BD-batata-dextrose. (a) Severidade da ferrugem nas plantas, estimada por escala diagramática; (b) Expressão relativa de α -tubulina de *P. pachyrhizi* à ubiquitina de soja, 12 dias após a inoculação de *P. pachyrhizi*. As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) e as barras indicam o erro padrão da média ($n=5$).

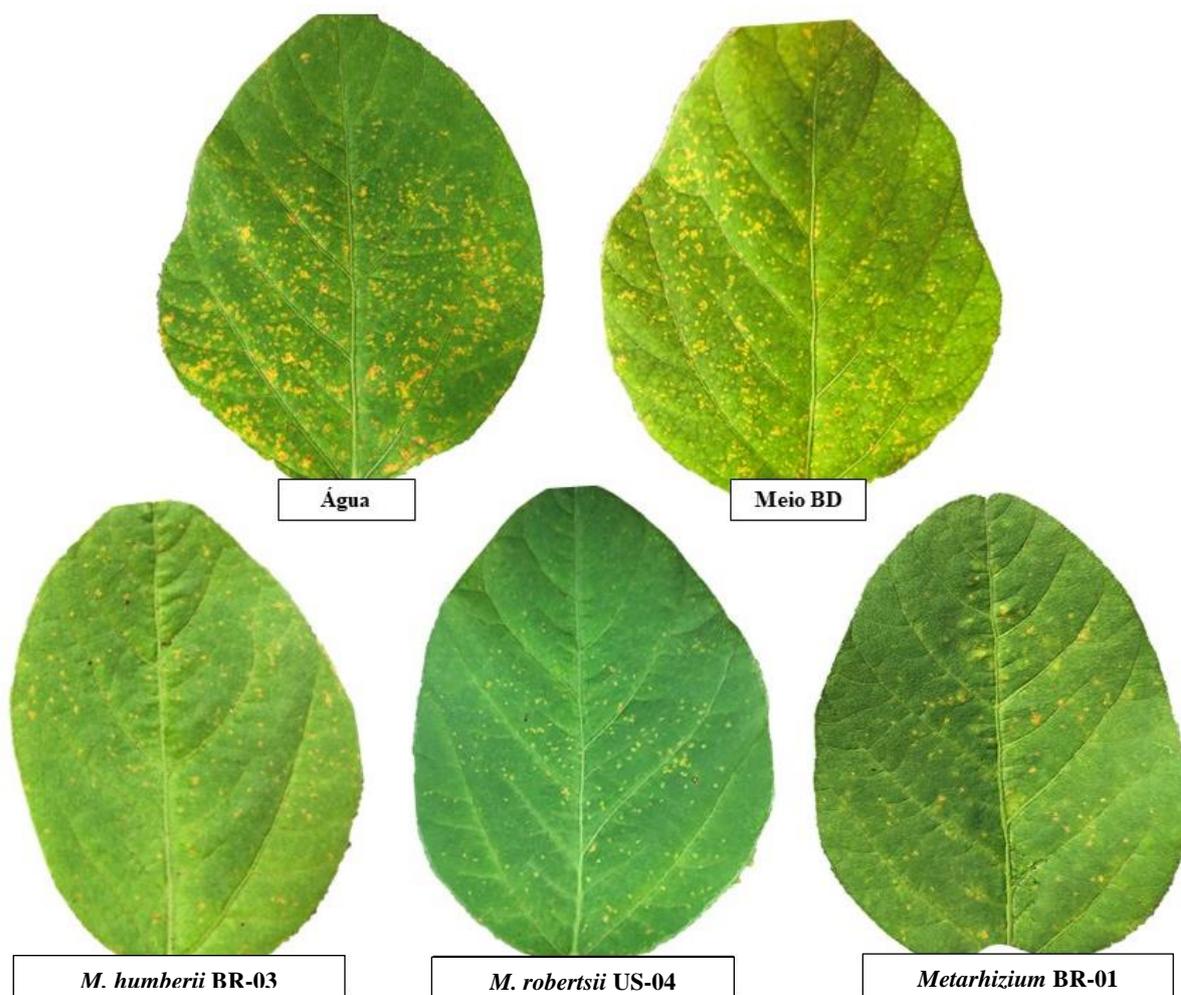


Figura 15. Severidade de ferrugem-asiática 12 dias após a inoculação, em plantas de soja (Pioneer 93M60), tratadas com filtrados de cultura de *M. humberii* BR-03, *M. robertsii* US-04 e *M. anisopliae* BR-01 (fração < 10kDa) a 50%, 24 horas antes da inoculação com *P. pachyrhizi*; Controles - água e meio BD-batata-dextrose.

4.4. Caracterização dos metabólitos presentes nos filtrados de *Metarhizium* spp.

Com base nos resultados obtidos com o uso dos filtrados de cultura de *Metarhizium*, objetivou-se realizar a identificação inicial das moléculas biologicamente ativas presentes, a fim de se conhecer a natureza química das mesmas, visando entender os mecanismos de ação pelos quais os filtrados exibem efeitos tanto *in vitro* como *in vivo*. Para esses experimentos de fracionamento utilizou-se somente o isolado *M. anisopliae* BR-01.

Primeiramente, analisou-se o tamanho das moléculas presentes nos filtrados. Para tanto, os filtrados foram fracionados em duas frações (3 e 10kDa), e avaliados quanto ao efeito direto sobre a germinação dos urediniósporos. Todos os tratamentos contendo o filtrado de

cultura de *M. anisopliae* BR-01 mostraram atividade antiferrugem com inibição da germinação dos esporos e menor comprimento do tubo germinativo diferindo dos controles (Tabela 10). O melhor desempenho foi demonstrado pelo filtrado de *Metarhizium* na concentração final de 37,5%, com 93% de inibição em comparação com o controle água.

Os resultados dos tratamentos com o filtrado fracionado em < 3k e < 10kDa mostraram que as moléculas biologicamente ativas presentes no filtrado são de baixa massa molecular. Embora o filtrado com moléculas menores do que 3kDa tenha mostrado atividade biológica reduzindo a germinação para 28,19%, o filtrado < 10kDa apresentou 6,59% de germinação, além de também ter reduzido o comprimento do tubo germinativo.

Tabela 10. Germinação e comprimento do tubo germinativo de esporos de *P. pachyrhizi* submetidos aos filtrados de cultura de *M. anisopliae* BR-01 em duas frações (< 3 e 10 kDa) e em diferentes concentrações. (Controles água e meio BD - batata-dextrose).

Tratamentos	Germinação (%)*	Comprimento do tubo germinativo (μm)*
Controle meio BD	77,65 a	57,18 b
Controle água	53,51 b	74,61 a
Filtrado <i>M. anisopliae</i> BR-01 < 3kDa	28,19 c	31,68 c
Filtrado <i>M. anisopliae</i> BR-01 < 10kDa	6,59 d	20,02 d
Filtrado <i>M. anisopliae</i> BR-01 25%	6,38 d	17,99 d
Filtrado <i>M. anisopliae</i> BR-01 50%	4,05 d	15,17 d
Filtrado <i>M. anisopliae</i> BR-01 37,5%	3,72 d	16,16 d

*Para o parâmetro de germinação dos urediniósporos, médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

No segundo ensaio, utilizou-se o material retido no filtro, contendo moléculas maiores do que 3 e 10k Daltons. A quantidade obtida de filtrado retido foi muito baixa, principalmente para o filtro de 10kDa (de 4 mL de filtrado apenas 70 μL ficou retido). Desse modo, foram completados para 2 mL de água esterilizada para se aumentar o volume e utilizar o mesmo no experimento *in vitro*. Obviamente, já se percebe que a maior parte das moléculas biologicamente ativas são menores do que 10kDa (Tabela 11).

O filtrado de cultura com moléculas maiores do que 3kDa exibiu efeito na germinação dos urediniósporos em comparação aos controles, no entanto, a inibição foi baixa (23%) (Tabela 10). Por sua vez, o filtrado de cultura com moléculas maiores do que 10kDa não diferiu estatisticamente do controle água. Portanto, com base nessas observações, é fortemente indicado que as moléculas biologicamente ativas, com ação na germinação de esporos do fungo

causador da ferrugem, não sejam maiores do que 10kDa, estando as mesmas na fração entre 3 e 10kDa.

Tabela 11. Germinação e inibição da germinação de urediniósporos de *P. pachyrhizi* submetidos ao tratamento com filtrados de cultura de *M. anisopliae* BR-01 em duas frações (> 3 e 10 kDa) em teste *in vitro*. (Controles água e meio BD - batata-dextrose).

Tratamentos	Germinação (%)*	Inibição da germinação (%)*
Controle meio BD	87,4 a	-
Controle água	79,4 ab	-
Filtrado <i>M. anisopliae</i> BR-01 > 10kDa	71,2 bc	10,30
Filtrado <i>M. anisopliae</i> BR-01 > 3kDa	61,0 c	23,17

*Para o parâmetro de germinação de urediniósporos (%), médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

** % de inibição = $[(C-T)/C] \times 100$. C=Controle água.

Na sequência, realizou-se o aquecimento dos filtrados, com o objetivo de verificar se os compostos com atividade biológica possuíam estabilidade ao calor. Dessa maneira, após aquecimento a 50 °C ou 90 °C, os filtrados de cultura de *M. anisopliae* US-02 e *M. humberii* BR-03 mantiveram a inibição total da germinação de esporos do fungo causador da ferrugem, mostrando que as moléculas biologicamente ativas são termoestáveis (Tabela 12). Outro isolado que se destacou foi *M. robertsii* US-04, onde os esporos apresentaram baixa germinação de 7,33 e 25,66, respectivamente, a 50 e 90 °C, além do menor desenvolvimento do tubo germinativo nas duas temperaturas.

Os isolados *M. anisopliae* BR-01 < 10kDa e *M. robertsii* US-03 foram semelhantes quando comparados com os controles água e meio de cultura BD, principalmente a 90 °C diminuindo o efeito da inibição. Isso mostra que os filtrados são instáveis a uma temperatura mais alta do que quando submetidos a 50 °C.

Tabela 12. Germinação, inibição da germinação e comprimento do tubo germinativo de esporos de *P. pachyrhizi* na presença de filtrados de cultura previamente aquecidos a 50 ou 90°C por 5 minutos. Filtrados de *M. anisopliae* BR-01 fração < 10kDa, *M. robertsii* US-03, *M. robertsii* US-04, *M. anisopliae* US-02 e *M. humberii* BR-03 fração < 10kDa em teste *in vitro*. (Controles água e meio BD – batata-dextrose).

50°C por 5 minutos			
Tratamentos	Germinação (%)*	% Inibição da germinação**	Comprimento do tubo germinativo (µm)*
Controle água	80,16 a	-	61,39 a
Controle meio BD	79,76 a	-	46,72 b
Filtrado <i>M. anisopliae</i> BR-01 <10kDa	34,48 b	56,98	27,58 c
Filtrado <i>M. robertsii</i> US-03	20,21 c	74,78	26,07 cd
Filtrado <i>M. robertsii</i> US-04	7,33 d	90,84	17,10 d
Filtrado <i>M. anisopliae</i> US-02	0	100	0
Filtrado <i>M. humberii</i> BR-03 <10kDa	0	100	0
90°C por 5 minutos			
Controle meio BD	84,49 a	-	77,63 a
Filtrado <i>M. robertsii</i> US-03	71,39 b	-	42,73 b
Controle água	70,67 b	-	75,70 a
Filtrado <i>M. anisopliae</i> BR-01 <10kDa	57,43 c	18,73	35,01 b
Filtrado <i>M. robertsii</i> US-04	25,66 d	63,68	16,11 c
Filtrado <i>M. anisopliae</i> US-02	0	100	0
Filtrado <i>M. humberii</i> BR-03 <10kDa	0	100	0

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

** % de inibição = $[(C-T)/C] \times 100$. C = Controle água.

Finalmente, visando continuar os estudos sobre a atividade biológica, os filtrados foram incubados na presença de enzima proteolítica (proteínase K). Observa-se na Figura 16 que todos os filtrados de cultura de *Metarhizium* mantiveram o efeito inibitório da germinação de urediniosporos após incubação com a proteínase K. É importante observar que a germinação dos esporos foi similar em todos os tratamentos controle, incluindo o controle da água sem a proteínase K, o que mostra que a enzima não tem efeito na germinação dos urediniosporos.

Em resumo, os filtrados dos isolados *M. robertsii* US-03, *M. robertsii* US-04 e *M. anisopliae* BR-01 <10 kDa foram mais resistentes à ação das enzimas proteolíticas do que estáveis a alta temperatura, principalmente a 90°C. Enquanto que os filtrados dos isolados *M. anisopliae* US-02 e *M. humberii* BR-03 demonstraram serem tanto termoestáveis quando resistentes a atividade da proteínase K. Isso mostra, que provavelmente há moléculas de diferentes classes químicas presentes nos filtrados e que variam conforme o isolado de *Metarhizium* spp.

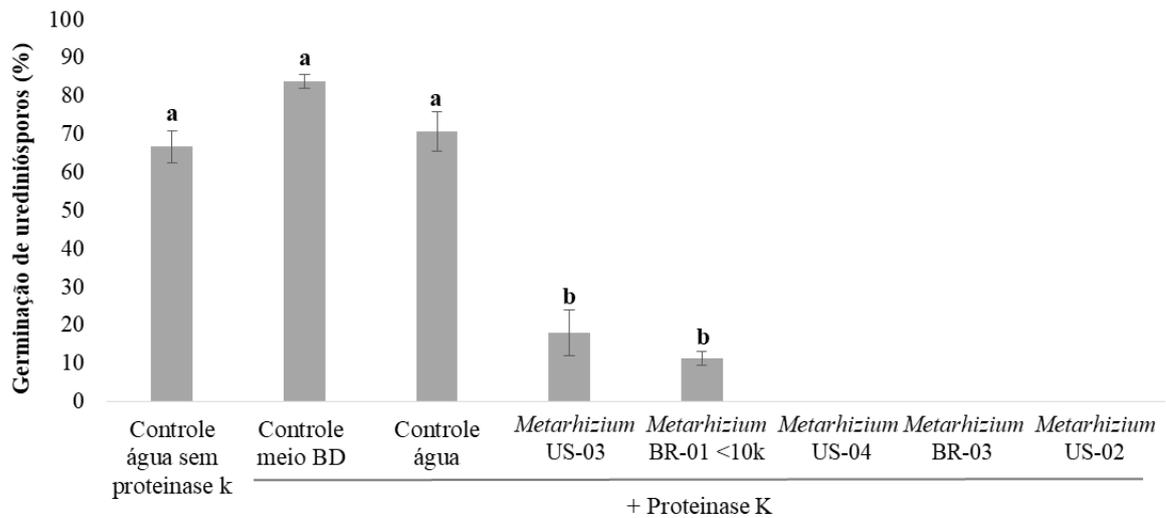


Figura 16. Germinação dos urediniósporos de *P. pachyrhizi*, submetidos a teste *in vitro* com os filtrados de cultura de *M. robertsii* US-03, *M. anisopliae* BR-01 < 10kDa, *M. robertsii* US-04, *M. humberii* BR-03 e *M. anisopliae* US-02 incubados na presença de proteinase K a 37°C por 1 hora. As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) e as barras indicam o erro padrão da média ($n=5$).

Outro ponto a destacar em relação ao trabalho realizado na LSU (EUA), é que os resultados se complementam com os do Brasil, apesar das condições experimentais serem diferentes como a população de *P. pachyrhizi* (isolado americano), cultivar de soja utilizada nos ensaios, condições de crescimento de plantas em câmaras de crescimento e condições de produção do filtrado. Além do mais, observou-se pelas porcentagens de inibições que o isolado *M. humberii* BR-03 demonstrou um efeito mais acentuado contra a ferrugem-asiática estudada no exterior (EUA), o que mostra que possivelmente o patógeno seja mais sensível. Por outro lado, ao usar outros isolados da mesma espécie de *Metarhizium* percebeu-se que o efeito dos filtrados de cultura sobre a ferrugem é uma característica específica do isolado e não da espécie de *Metarhizium*. Além disso, os isolados *M. anisopliae* US-02, *M. robertsii* US-03 e *M. robertsii* US-04 não são de ocorrência natural no Brasil, diferente de *M. humberii* BR-03 e *M. anisopliae* BR-01 isolados no país. Finalmente, é importante salientar que mesmo em outras condições experimentais, fica evidente o potencial dos filtrados de *Metarhizium* no controle de ferrugem-asiática da soja.

5. DISCUSSÃO

O fungo entomopatogênico *Metarhizium* é utilizado no controle biológico de pragas a muito tempo, sendo considerado uma alternativa segura e ambientalmente aceitável aos pesticidas químicos (Zimmermann, 2007). No entanto, estudos recentes exploram o potencial deste fungo na interação benéfica com plantas e no controle de fitopatógenos, neste caso, à ferrugem-asiática da soja.

Os esporos de *P. pachyrhizi* chamados de urediniósporos, são os esporos responsáveis pelas epidemias causadas pelo fungo no campo, gerando vários ciclos do patógeno dentro de um mesmo ciclo da cultura (Rupe & Sconyers, 2008). Dessa forma, os testes *in vitro* buscaram estudar o efeito inibitório direto de *Metarhizium* na germinação dos urediniósporos, visto a importância deles para a epidemia da doença.

Como já mencionado, as suspensões aquosas de conídios de *Metarhizium* não apresentaram efeito direto sobre a germinação dos urediniósporos. Para este experimento, ambos os esporos de *P. pachyrhizi* e *Metarhizium* foram colocados ao mesmo tempo na placa de Petri e o ensaio foi paralisado após 6 horas. Porém, verificou-se em testes preliminares, que os esporos de *Metarhizium* iniciavam a germinação a partir de 10 horas. Em estudos conduzidos por Matos (1988), *M. anisopliae* atingiu 85% de germinação com 12 horas em meio mínimo líquido + extrato de levedura, sob agitação. Por outro lado, foi observado que os urediniósporos atingem alta germinação em apenas 4 horas, portanto, germinando antes do que os conídios de *Metarhizium*. De acordo com Nascimento et al. (2016), os esporos de *P. pachyrhizi* atingiram 80% de germinação em 2 horas em substrato ágar-água. Dessa maneira, vale salientar que mesmo supondo que os conídios de *Metarhizium* tenham compostos inerentes ao esporo não germinado, os quais poderiam afetar o desenvolvimento dos urediniósporos, essa possibilidade não foi evidenciada. Quando na presença de um inseto hospedeiro suscetível, o *Metarhizium* inicia a infecção pelos conídios, envolvendo fatores químicos e físicos que permitem a penetração da hifa na cutícula (Wang et al., 2002; Lubeck et al., 2008; Boldo et al., 2009). Apesar de não haver a presença do hospedeiro neste ensaio, possivelmente muitos metabólitos produzidos pelo fungo poderiam ser liberados, quando do início do processo de germinação dos conídios *in vitro*.

Em vista do exposto, devido a precocidade na germinação dos urediniósporos, a alternativa que poderia ser realizada em próximos estudos, seria de se adicionar primeiro os conídios de *Metarhizium* e depois os esporos de *P. pachyrhizi* ou até mesmo se produzir um filtrado a partir de suspensão aquosa de conídios. Outro ponto a ser estudado envolveria

concentração dos conídios de *Metarhizium*. Por exemplo, Lopez (1991) evidenciou efeito inibitório na germinação dos conídios de *Colletotricum graminicola* incubados *in vitro* por 15 horas, com suspensões aquosas de conídios de *M. anisopliae* em concentrações iguais ou superiores a 2×10^6 conídios mL^{-1} , atingindo 64% de inibição com uma suspensão de 2×10^8 conídios mL^{-1} .

Ainda em estudos de Lopez (1991), relatou-se o efeito antagônico de *M. anisopliae in vitro* com 58% de inibição do crescimento micelial de *C. graminicola*. Por sua vez, Siqueira (2016) demonstrou o potencial de antagonismo de 24 isolados de *Metarhizium* spp. contra dois fitopatógenos da cultura da cana-de-açúcar (*Fusarium moniliforme* e *Colletotrichum falcatum*). Os destaques da inibição foram para *M. robertsii* (ESALQ-1635) e *M. robertsii* (ESALQ-1622) com 53% de inibição do patógeno *F. moniliforme*. Em ambos os trabalhos foi possível notar a vantagem dos fungos entomopatogênicos na competição pelo substrato.

Diferentemente dos resultados obtidos utilizando-se suspensões de conídios de *Metarhizium* spp., os filtrados de cultura livres de estruturas fúngicas exibiram efeito direto sobre a germinação dos urediniosporos, efeito esse variando em função de cada isolado. Com relação a possível composição dos filtrados, é sabido que os fungos em geral se destacam por serem uma fonte rica de compostos naturais biologicamente ativos, produzindo uma infinidade de metabólitos secundários, sendo estudados em muitas áreas, até mesmo na medicina humana (Hoeksma et al., 2019). Dessa maneira, cultivando-se os fungos em meios de cultura como caldo ou fermentação líquida, que favoreçam o desenvolvimento, muitos metabólitos deverão ser produzidos. Portanto, tendo isolados de *Metarhizium* como objeto de interesse, em um dos objetivos do presente trabalho procurou-se descobrir se esses compostos exibiam alguma atividade biológica tóxica contra *P. pachyrhizi*.

A atividade biológica de um filtrado de cultura pode variar em função do meio de cultivo, condições de cultivo e do isolado fúngico, o que pode determinar os tipos de metabólitos secundários produzidos, podendo até mesmo causar mudanças em suas vias biogênicas (Hallmann & Sikora, 1996; Chen et al., 2000; Verdejo Lucas et al., 2009). Dessa forma, os meios de cultura onde os fungos são cultivados, induzem a produção de certos metabólitos em resposta ao substrato. Assim, quando utilizam-se meios complexos como o BD (caldo de batata dextrose), obtidos a partir de constituintes vegetais, neste caso a batata, além da fonte de energia (dextrose), o mesmo resulta em um meio de cultura rico em nutrientes, fazendo com que se amplie a quantidade e tipos de metabólitos e enzimas que serão produzidos, porém com a desvantagem da composição exata ser desconhecida (Basu et al., 2015).

Resultados encontrados por Lopez (1991), utilizando filtrados de cultura de *M. anisopliae* cultivado em meio BDP (batata-dextrose-peptona), mostraram efeitos na inibição da germinação dos conídios de *C. graminicola* com filtrados nas concentrações variando de 10 a 100%, com inibições de 86% a 95%, sendo esse efeito reduzido após autolavagem do material. Desse modo, observou-se resultados semelhantes quanto ao uso dos filtrados de *Metharizium*, atuando de maneira deletéria na germinação de conídios de *Colletotrichum*, os quais se mostraram mais sensíveis do que os urediniósporos de *P. pachyrhizi* descritos neste trabalho.

Em todos os ensaios de germinação conduzidos *in vitro* nesta dissertação, observou-se que no controle meio BD (caldo de batata dextrose) a germinação foi maior quando comparada com a água, em função do meio de cultura ser rico em nutrientes. Manoj Kumar et al. (2006) também relataram o mesmo com a germinação de esporos de *Leveillula taurica*, agente causal do oídio. À medida em que a concentração do meio BD aumentava, a porcentagem média de germinação aumentava gradualmente e a máxima germinação registrada foi de 65,5% no meio BD não diluído, contra 30,5% de germinação dos conídios em água.

Há relatos na literatura sobre o efeito antagônico dos filtrados de cultura de *M. anisopliae* sobre fitopatógenos. Kang et al. (1996) relataram a inibição da germinação de conídios de *B. cinerea* em 75% e para *Fusarium oxysporum* em 32%. Outros autores, reportaram efeitos similares de atividade antifúngica de extratos de *M. anisopliae* na inibição do crescimento micelial de *Fusarium oxysporum*, *Cladosporium herbarum* e *Curvularia clavata* (Ravindran et al., 2014).

De acordo com Sarven et al. (2020), *M. anisopliae* demonstrou antagonismo ao fungo fitopatogênico *B. cinerea*, o qual apresentou ramificação excessiva, com hifas retorcidas, indicando a existência de metabólitos secundários fungistáticos. O filtrado de cultura também inibiu a germinação dos conídios, além de influenciar o comprimento do tubo germinativo. O mecanismo da inibição pelo filtrado foi estudado e notou-se 74% de danos na integridade da membrana plasmática do conídio após 8 horas de incubação em comparação com o controle, sendo que a integridade da membrana diminuiu rapidamente com o aumento do período de incubação. Além disso, pelo uso de microscopia eletrônica de transmissão, verificou-se que as organelas celulares das hifas de *B. cinerea* tratadas com o filtrado foram danificadas, sugerindo que *M. anisopliae* produz alguma substância ativa com ação de tóxica contra *B. cinerea*.

Embora nos trabalhos citados acima, existam metodologias diferentes das usadas neste estudo, fica evidente que os filtrados de cultura de *Metharizium* possuem metabólitos com atividade biológica contra patógenos de plantas, além de um possível mecanismo de ação pelo qual inibiu a germinação de esporos de *B. cinerea*. Ainda que não se tenha conhecimento de

quais são exatamente esses metabólitos presentes nestes filtrados de cultura, com base nos resultados deste trabalho, sabe-se que os mesmos apresentam atividade contra *P. pachyrhizi* tanto *in vitro* como *in vivo*. Porém, tem-se conhecimento de algumas características desses metabólitos, conforme já descrito nos resultados do *item 4.4*, o que ainda requer mais estudos. Entretanto, na literatura há muitos trabalhos relacionados com o metabolismo secundário de *Metarhizium*. Xu et al. (2016) realizaram estudos sobre o agrupamento de genes e metabólitos, a partir do metabolismo secundário do fungo. Trabalhos de Hu et al. (2014) também indicaram o potencial desse fungo em sintetizar uma infinidade de metabólitos secundários. Donzelli & Krasnoff (2016) reportaram a química secundária do fungo *Metarhizium*, com a identificação de metabólitos representados por moléculas de baixa massa molecular. Além de outras moléculas muito estudadas e produzida por estes fungos, deve-se citar os peptídeos destruxinas não ribossômicas (Dtxs) que atuam como inseticidas não seletivo, além das swainsonina e policetídeos (Molnar et al., 2010; Gibson et al., 2014).

No que se refere ao uso da suspensão de conídios de *Metarhizium* spp. e dos filtrados de cultura em folíolos destacados e em plantas de soja mantidas em casa de vegetação, os resultados obtidos neste estudo, corroboram com os de Lopez (1991), porém com outro patossistema, onde *M. anisopliae* mostrou proteção relativa em plantas de sorgo contra antracnose em condições de casa de vegetação. A suspensão aquosa de conídios foi pulverizada 24 h antes da inoculação com o patógeno e o fungo entomopatogênico reduziu a severidade da doença, quando utilizado nas concentrações de 2×10^6 conídios mL^{-1} e 2×10^7 conídios mL^{-1} , resultando na reação R (resistente), com base em escala de notas.

Como visto no trabalho de Lopez (1991), a autora também se utilizou de suspensão de conídios aplicada por aspersão na parte aérea das plantas. Embora não se tenha trabalhos evidenciando a germinação dos conídios na superfície foliar ou a colonização endofítica de *Metarhizium* nas folhas, a hipótese é que eles tenham germinado na superfície da área foliar e atuado como indutores de resistência, onde a planta reconhece algum padrão molecular do microrganismo e ativa os mecanismos de defesa.

Em ambos os ensaios conduzidos na presente dissertação, envolvendo folíolos destacados e plantas mantidas em casa de vegetação, os conídios de *M. anisopliae* BR-01 ocasionaram uma redução na severidade da ferrugem, sendo mais acentuado nos folíolos destacados. Por sua vez, as condições experimentais com folíolo destacado versus plantas mantidas em casa de vegetação foram diferentes. No caso dos folíolos destacados, os mesmos foram mantidos no interior de placas de Petri, onde a umidade foi mantida por mais tempo, o que pode ter auxiliado na germinação dos conídios de *Metarhizium* nas folhas. Em plantas

mantidas em casa de vegetação, apesar das mesmas estarem protegidas de condições externas, talvez as gotas tenham se evaporado mais rapidamente, porém existe a transpiração da própria folha que pode ter ajudado na manutenção da umidade para a possível germinação dos conídios. Portanto, se faz necessário o ajuste de um protocolo no sentido de se favorecer por mais tempo as condições ideais para a germinação dos conídios nos folíolos, além de estudos através de microscopia eletrônica de varredura, a fim de se verificar a germinação dos mesmos na superfície foliar.

Sobre o potencial dos filtrados de cultura de *M. anisopliae* no controle de doenças, Sarven (2020) relatou o controle de *B. cinerea* (mofo-cinzento) em testes com folhas destacadas, frutos e plantas de tomate. O filtrado foi capaz de reduzir a severidade da doença, sendo que nas folhas tratadas as lesões exibiam tamanho de 0,4 cm contra 2,7 cm nas folhas controle.

No presente trabalho, os resultados de redução de severidade da ferrugem com o uso dos filtrados de cultura, podem ter ocorrido devido a alguns fatores. Primeiro, a possível existência de um efeito residual dos filtrados na superfície foliar de soja, o que poderia ter afetado de maneira direta a germinação, quando o urediniósporo iniciou o processo de infecção. Por outro lado, o segundo fator poderia estar relacionado com o fenômeno da indução de resistência, onde constituintes dos conídios de *Metarhizium* ou os metabólitos presentes nos filtrados de cultura teriam sido reconhecidos pela planta e atuado como possíveis agentes indutores de resistência.

A indução de resistência em plantas é caracterizada pela ativação de genes responsáveis pela defesa, podendo ser local e/ou sistêmica. No caso da resposta sistêmica, algum tipo de sinal deve ser translocado do local de indução para outras partes da planta, induzindo reações de defesa a distância que irão proteger a planta contra os ataques subsequentes de patógenos (Mandal, 2010; Gozzo & Faoro, 2013; Oliveira et al., 2016). As vias de sinalização, para gerar respostas de defesa nas plantas, podem envolver o ácido salicílico (resistência sistêmica adquirida-SAR) ou o ácido jasmônico e etileno (resistência sistêmica induzida-ISR). Um dos requisitos para a indução de resistência é a dependência do intervalo de tempo entre o tratamento inicial e a inoculação do patógeno. A proteção é demonstrada após um período adequado o suficiente para acionar as respostas do tecido hospedeiro, ou seja, necessita-se de um estímulo primário para que ocorram mudanças específicas no metabolismo da planta, envolvendo a síntese ou acúmulo de substâncias (Pascholati & Dalio, 2018).

A aplicação exógena de indutores de resistência, capazes de ativar as defesas das plantas, é uma abordagem interessante para integrar o sistema de manejo fitossanitário, a fim

de se minimizar o uso de agentes químicos no controle de doenças (Bernonville et al., 2014). Assim, vê-se a importância na busca e identificação de agentes ou eliciadores para ativação dos mecanismos de defesa nas plantas. Muitos desses indutores envolvem produtos naturais, de origem fúngica ou vegetal, estímulos físicos ou químicos, microrganismos não patogênicos colonizadores de raízes, efetores e padrões moleculares associados aos microrganismos. Dessa maneira, geralmente o agente indutor é considerado qualquer composto ou fator capaz de ativar a defesa, enquanto que eliciador/elicitador a molécula presente em um indutor (Mandal, 2010; Mauch-Mani et al., 2017; Pascholati & Dalio, 2018). Nesse contexto, muitas moléculas já foram caracterizadas, incluindo-se polímeros de carboidratos, lipídios, glicopeptídeos e glicoproteínas, as quais sendo reconhecidas pela planta podem desencadear uma resposta de defesa. Após a percepção do eliciador, ocorre a ativação das vias de transdução de sinal e dos genes de resposta de defesa que, geralmente, levam à produção de espécies reativas de oxigênio, fitoalexinas, proteínas-RP entre outros compostos de ação antimicrobiana (Thakur & Sohal, 2013; Oliveira et al., 2016; Pascholati & Dalio, 2018).

Com base no exposto, estruturas do fungo propriamente dito (exemplo suspensão conidial) ou metabólitos presentes nos filtrados de cultura do *Metarhizium* poderiam atuar como moléculas eliciadores para gerar respostas de defesa nas plantas. Na Figura 11, em função da redução dos sintomas nos trifólios 1 e 2, há o indicativo de indução de resistência local. Porém, sinais podem ter sido translocados para partes distintas do sítio onde o indutor foi aplicado, o que pode ser evidenciado no terceiro trifólio com a redução da severidade, reforçando a ideia da indução de resistência sistêmica. Além disso, os resultados dos experimentos com plantas de soja tratadas com os filtrados de cultura de *Metarhizium* spp., realizados na Louisiana State University (EUA), mostram-se condizentes com os ensaios conduzidos no Brasil, evidenciando uma correlação na redução da severidade da doença com a quantidade de DNA do fungo *P. pachyrhizi* presente nas folhas, reforçando o potencial dos filtrados de cultura.

A indução de resistência pode ser monitorada através da verificação de alterações bioquímicas nas plantas, como as atividades de peroxidases, β -1,3 glucanases, quitinases, fenilalanina amônia liase e o acúmulo de compostos fenólicos, entre outros. Além disso, o monitoramento de genes marcadores para SAR e ISR também se mostra interessante. Porém, no presente estudo, o fenômeno não foi comprovado em bases bioquímicas/moleculares, o que necessita ser feito a fim de se esclarecer a ocorrência da indução de resistência.

Com relação aos controles positivos envolvendo acibenzolar-S-metílico e fungicida, ambos ocasionaram redução dos sintomas de ferrugem nas folhas de plantas de soja. O acibenzolar-S-metílico (produto comercial Bion[®]) é o indutor de resistência mais conhecido e

estudado. Na Figura 11 é possível observar a redução nos sintomas da ferrugem no trifólio 2, e mais evidentemente no trifólio 3, demonstrando a possível indução de resistência sistêmica ocasionada pelo uso do produto. Com base na literatura, verifica-se a existência de trabalhos sobre a atuação desse ativador de plantas em soja contra *P. pachyrhizi* (Dallagnol et al., 2006; Pereira et al., 2009; Duarte et al., 2009). Já para o fungicida Vessarya® (picoxistrobina + benzovindiflupir), na maioria dos experimentos a média de lesões foi praticamente igual 0, demonstrando sua efetividade no controle de *P. pachyrhizi*, estando esse fungicida registrado para esse patossistema. Além disso, em resultados dos ensaios cooperativos sobre a eficiência de fungicidas na safra 2018/19, o mesmo apresentou 67% de controle em relação às testemunhas (Godoy et al., 2019).

A respeito de outras características do fungo entomopatogênico *Metarhizium*, sabe-se que o mesmo não é apenas um patógeno de insetos, mas também coloniza a rizosfera das plantas (Hu e St. Leger, 2002; Bruck, 2010). Esse estilo de vida bifuncional é ainda mais exemplificado na expressão de diferentes genes, quando o mesmo age como patógeno de insetos ou na presença de exsudatos das raízes das plantas (Pava-Ripoll et al., 2011). Várias espécies de fungos entomopatogênicos desempenham vários papéis na natureza, variando de antagonistas de patógenos vegetais, endófitos a agentes de crescimento de plantas (Ownley et al., 2008; Vega, 2008; Sasan & Bidochka, 2012; Jaber & Enkerli, 2017). Portanto, neste trabalho também objetivou-se avaliar o controle da ferrugem-asiática (doença foliar), através da colonização endofítica ou da rizosfera da planta, com preparações de *Metarhizium*. Como já discutido anteriormente, as preparações de *Metarhizium* aplicadas na parte aérea podem ter atuado tanto no controle biológico (efeito direto) como na indução de resistência (efeito indireto). Porém, o protocolo mais tradicional no uso dos fungos entomopatogênicos é via inoculante, por estarem em seu habitat natural e interagirem de forma benéfica com as plantas. Assim, o possível controle de doenças na parte aérea das plantas, sendo distante do local onde o *Metarhizium* se encontra, demonstra potencial na indução de resistência sistêmica.

Os resultados obtidos neste trabalho indicam uma redução na severidade da ferrugem, ocasionada pelo isolado *M. anisopliae* BR-01, após 20 dias da inoculação dos conídios no substrato em contato com a semente. Como já mencionado, após a avaliação dos sintomas, foi realizado o re-isolamento dos fungos (três isolados) a partir do substrato e das raízes das plantas de soja, em meio de cultura seletivo e os fungos estavam presentes na raiz e/ou no solo. A hipótese é de que a colonização por *Metarhizium* ocorreu na rizosfera e endofiticamente, pois no momento do isolamento, fez-se a desinfestação superficial das raízes, sugerindo que o

crescimento do fungo foi a partir de tecidos internos, apontando para uma possível associação endofítica.

Na literatura há relatos a respeito da colonização tecidual preferencial nos hospedeiros pelos endofíticos. A localização de *B. bassiana* e *M. robertsii* em plantas de feijão inoculadas com conídios, mostrou que ambos foram mais abundantes na seção radicular abaixo do hipocótilo da planta. No entanto, *Metarhizium* foi encontrado em níveis mais altos na seção R1 das raízes, enquanto que *B. bassiana* foi observada no hipocótilo, no caule e nas folhas. Por sua vez, o *Metarhizium* foi predominantemente isolado dos tecidos radiculares e não foi encontrado no caule e nas folhas em condições de campo (Behie, Jones, & Bidochka, 2015).

Outros autores relataram o uso de *Metarhizium* como inoculante no controle de doenças, mas em outro patossistema. Sasan & Bidochka (2013) reportaram que plantas de feijão colonizadas por *M. robertsii* e depois expostas a *F. solani*, se mostraram com crescimento mais saudável e menores índices de doenças em comparação com plantas não colonizadas pelo fungo entomopatogênico. Em estudos, utilizando outro fungo entomopatogênico, a *B. bassiana*, relatou-se redução na severidade da doença causada por *Xanthomonas* através da resistência sistêmica induzida, 13 dias após a inoculação do fungo em mudas de algodão (Griffin, 2007; Ownley et al., 2008). Em outro trabalho, com a colonização de tamareiras por *B. bassiana* e *Lecanicillium* spp., demonstrou-se o acúmulo de proteínas envolvidas na defesa de plantas e na resposta de condicionamento (Gómez-Vidal et al., 2009), induzindo assim um "estado de priming", pelo qual as plantas seriam capazes de alcançar uma ativação mais rápida e mais forte de uma resistência de amplo espectro a patógenos, insetos e estresses abióticos (Conrath et al., 2006).

Por outro lado, além da indução de resistência, a colonização de plantas com fungos endofíticos pode estimular a planta a produzir metabólitos secundários bioativos (Hartley et al., 2015), como as fitoalexinas com propriedades antifúngicas, antibacterianas e antivirais que ajudam a proteger as mesmas contra patógenos. A quantidade de fitoalexinas tipo isoflavonóides foi significativamente aumentada em plantas de soja inoculadas com *M. anisopliae* quando comparadas com as plantas controle (Khan et al., 2012). A indução de resistência sistêmica através da colonização endofítica foi também demonstrada por outros autores (Vega et al., 2009; Ownley et al., 2010). Dessa maneira, a hipótese de controle de *P. pachyrhizi* através da sinalização de vias de defesa da planta, resultando na resistência sistêmica é reforçada, porém o fenômeno precisa ser melhor esclarecido.

Outro ponto interessante, envolve a produção de destruxinas (DTXs) em plantas colonizadas endofiticamente. As destruxinas são os mais prevalentes dos metabólitos

secundários produzidos por *M. anisopliae* na fermentação e apresentam atividades inseticidas, antivirais e fitotóxicas (Koiri et al., 2017). As mesmas já foram detectadas em feijão-caupi colonizado por *M. robertsii* ARSEF-2575 (isolado que produz DTXs *in vitro* e também em planta), 12 dias após a inoculação do fungo. No entanto, é relatado no estudo que a produção de DTXs em plantas não depende apenas do isolado fúngico, mas também das espécies vegetais. Portanto, mais um fator desses fungos entomopatogênicos a ser explorado, caracterizando uma multifuncionalidade a ser aplicada no manejo de pragas e doenças de plantas. Nesse sentido, experimentos adicionais são necessários para se reforçar o possível uso de fungos entomopatogênicos inoculados em sementes de culturas para o controle de pragas (Golo et al., 2014).

Outra parte dos estudos constantes na presente dissertação, realizado na Louisiana State University (EUA) envolveu a caracterização das moléculas biologicamente ativas presentes nos filtrados. Primeiramente, nota-se que os filtrados de cultura foram obtidos a partir de outras cepas de *Metarhizium* e confirmaram a atividade biológica contra *P. pachyrhizi*.

Quando a estabilidade ao calor, Sasan & Bidochka (2013) também relataram que após a autoclavagem, o filtrado de cultura de *M. robertsii* continuou a exibir efeito inibitório sobre *F. solani*. O mesmo encontrado por Sarven et al. (2020), utilizando filtrados de cultura de *M. anisopliae* aquecido a diferentes temperaturas (40, 60, 80 e 100°C) e adicionado ao meio de cultura BDA, onde *B. cinerea* foi cultivado. O efeito inibitório foi igual ao observado com o filtrado controle sem tratamento térmico, demonstrando mais uma vez que substâncias antifúngicas produzidas por *M. anisopliae* mantem sua atividade em altas temperaturas. No presente estudo, principalmente *M. anisopliae* US-02 e *M. humberii* BR-03 demonstraram estabilidade a altas temperaturas, enquanto que nos outros isolados esse efeito foi variável em relação aos tratamentos a 50 e 90 °C.

A proteinase K é uma enzima proteolítica (uma serino-protease altamente reativa que cliva as ligações peptídicas nas proteínas), obtida a partir do fungo *Tritirachium album*. Em solução, a mesma é estável a uma ampla gama de situações como pHs de 4,0 a 12,5 (pH ótimo pH 8,0), temperaturas de 25 à 65 °C, sais e detergentes (tipo SDS) (Farrell, 2010). Dessa maneira, os filtrados de *Metarhizium* após serem submetidos à atividade da proteinase K, mantiveram os efeitos inibitórios na germinação dos esporos de *P. pachyrhizi*. Portanto, esses resultados podem indicar que os metabólitos presentes nos filtrados e que apresentam atividade biológica podem não ser de natureza proteica. Uma hipótese é que esses compostos possam ser de outra natureza química, como glicoproteínas, glicopeptídeos, lipídeos ou até mesmo um conjunto de metabólitos, visto à estabilidade a altas temperaturas, principalmente por parte de

M. anisopliae US-02 e *M. humberii* BR-03. Por outro lado, *M. robertsii* US-03, *M. robertsii* US-04 e *M. anisopliae* BR-01 < 10kDa foram mais resistentes à ação das enzimas proteolíticas do que estáveis as altas temperaturas, principalmente a 90 °C, o que pode sugerir a existência de diferentes compostos, sendo os mesmos específicos para cada isolado. Portanto, os estudos demonstraram que os compostos ativos presente nos filtrados estão na faixa de 3 a 10kDa, são estáveis ao calor e, provavelmente, de natureza não proteica básica. Além disso, estudos preliminares foram iniciados na LSU (EUA), por meio do uso de LC-MS (Cromatografia líquida com espectrômetro de massa) visando a caracterização dos metabólitos.

Finalmente, a partir do exposto, observa-se o potencial do fungo *Metarhizium* spp., no controle alternativo da ferrugem-asiática da soja, por meio do possível controle biológico e da indução de resistência. Esse potencial vem em suporte das dificuldades atuais encontradas para o manejo da ferrugem na soja, bem como em função do crescimento nas pesquisas em direção ao uso de produtos biológicos, visando auxiliar no uso racional dos defensivos químicos tradicionais. Na literatura consultada, não existem relatos anteriores quanto ao uso específico de *Metarhizium* no controle de *P. pachyrhizi*. Dessa forma, os resultados constantes da presente dissertação mostram-se inovadores, abrindo portas para uma nova área de pesquisa a ser expandida no que diz respeito ao uso de fungos entomopatogênicos no controle da ferrugem-asiática da soja.

6. CONCLUSÃO

Os filtrados de cultura de *M. anisopliae* BR-01, *M. robertsii* BR-02 e *M. humberii* BR-03 mostraram-se eficazes no controle *in vitro* de *P. pachyrhizi*, inibindo a germinação dos urediniósporos. O efeito não foi confirmado quando suspensões de conídios de *Metarhizium* foram usadas nessas condições experimentais.

Em ensaios com folíolos destacados e com plantas de soja mantidas em casa de vegetação, os filtrados de cultura de *M. humberii* BR-03 e *M. anisopliae* BR-01 reduziram o número de pústulas e a severidade de ferrugem-asiática. Já, *M. robertsii* BR-02 não exibiu efeito sobre a doença.

O isolado *M. humberii* BR-03 reduziu os sintomas da ferrugem-asiática distante do sítio onde a planta recebeu o filtrado de cultura, indicando a possível indução de resistência sistêmica.

O uso do *M. anisopliae* BR-01, como inoculante aplicado no solo com plantas de soja, também sugere o potencial na indução de resistência sistêmica para o controle de ferrugem da soja.

Os resultados obtidos em ensaios realizados na Louisiana State University (EUA) com plantas de soja, foram condizentes quanto a redução da severidade de ferrugem e da expressão relativa do gene alvo de *P. pachyrhizi*, com os isolados do Brasil e dos Estados Unidos. Mesmo em condições experimentais diferentes, os filtrados de cultura de *Metarhizium* spp. demonstraram potencial no controle de ferrugem. As moléculas biologicamente ativas presente nos filtrados, estão na faixa entre 3 a 10 kDa, são estáveis ao calor e provavelmente de natureza não proteica.

REFERÊNCIAS

- Agrios, G. (2005). *Plant pathology*. (S. D. Elsevier, ed.). Academic Press Inc.
- Alves, S. B.; Lopes, R. B.; Vielra, S. A.; Tamai, M. A. (2008). Fungos entomopatogênicos usados no controle de pragas na América Latina. In *Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios*. (pp. 69–110). Piracicaba: FEALQ.
- Bagga, S., Hu, G., Screen, S. E., & St. Leger, R. J. (2004). Reconstructing the diversification of subtilisins in the pathogenic fungus *Metarhizium*. *Gene*, *324*, 159–169. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2003.09.031>
- Basu, S., Bose, C., Ojha, N., Das, N., Das, J., Pal, M., & Khurana, S. (2015). Evolution of bacterial and fungal growth media. In *Bioinformation* (Vol. 11). Retrieved from www.bioinformation.net
- Beckers, G. J., & Conrath, U. (2007). Priming for stress resistance: from the lab to the field. *Current Opinion in Plant Biology*, *10*(4), 425–431. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2007.06.002>
- Behie, S. W., Jones, S. J., & Bidochka, M. J. (2015). Plant tissue localization of the endophytic insect pathogenic fungi *Metarhizium* and *Beauveria*. *Fungal Ecology*, *13*, 112–119. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2014.08.001>
- Bernonville T.D., Marolleau B., Staub, J., Gaucher, M., & Brisset, M.-N. (2014). Using Molecular Tools To Decipher the Complex World of Plant Resistance Inducers: An Apple Case Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *62*(47), 11403–11411. <https://doi.org/10.1021/jf504221x>
- Bezerra, A. R. G. (2015). Importância Econômica. In A. Sedyama, T.; Silva, F.; Borém (Ed.), *Soja: do plantio a colheita*. Viçosa, MG: Ed. UVF.
- Boldo, J. T., Junges, A., do Amaral, K. B., Staats, C. C., Vainstein, M. H., & Schrank, A. (2009). Endochitinase CHI2 of the biocontrol fungus *Metarhizium* affects its virulence toward the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus*. *Current Genetics*, *55*(5), 551–560. <https://doi.org/10.1007/s00294-009-0267-5>
- Cavalcanti, L. S. et al. (2005). Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida. In L. S. et al. Cavalcanti (Ed.), *Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos* (Piracicaba, pp. 81–124). FEALQ.
- Chen, S. Y., Dickson, D. W., & Mitchell, D. J. (2000). Viability of *Heterodera glycines* Exposed to Fungal Filtrates. *Journal of Nematology*, *32*(2), 190–197. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19270965>

- CONAB. (2019). Acompanhamento da Safra Brasileira. *Companhia Nacional de Abastecimento*, 5(4), 1–113.
- Conrath, U., Beckers, G. J. M., Flors, V., García-Agustín, P., Jakab, G., Mauch, F., ... Mauch-Mani, B. (2006). Priming: Getting Ready for Battle. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(10), 1062–1071. <https://doi.org/10.1094/MPMI-19-1062>
- Costamilan, L. M.; Bertagnolli, P. F.; Yorinori, J. T. (2002). Perda de rendimento de grãos de soja causada por ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*). *Fitopatologia Brasileira*, 27.
- Dallagnol, L. J., Navarini, L., Ugalde, M. G., Balardin, R. S., & Catellam, R. (2006). Utilização de Acibenzolar-S-Methyl para controle de doenças foliares da soja. *Summa Phytopathologica*, 32(3), 255–259. <https://doi.org/10.1590/s0100-54052006000300007>
- Dorighello, D. V., Bettioli, W., Maia, N. B., & de Campos Leite, R. M. V. B. (2015). Controlling Asian soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) with *Bacillus* spp. and coffee oil. *Crop Protection*, 67, 59–65. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2014.09.017>
- Doyle, J., and Doyle, J. (1987). A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissues. *Phytochem Bull*, 19, 11–15.
- Duarte, H. da S. S., Zambolim, L., Rodrigues, F. de Á., Rios, J. A., & Lopes, U. P. (2009). Silicato de potássio, acibenzolar-S-metil e fungicidas no controle da ferrugem da soja. *Ciencia Rural*, 39(8), 2271–2277. <https://doi.org/10.1590/s0103-84782009000800001>
- Elsharkawy, M. M., Shimizu, M., Takahashi, H., Ozaki, K., & Hyakumachi, M. (2013). Induction of systemic resistance against *Cucumber mosaic virus* in *Arabidopsis thaliana* by *Trichoderma asperellum* SKT-1. *Plant Pathology Journal*, 29(2), 193–200. <https://doi.org/10.5423/PPJ.SI.07.2012.0117>
- Embrapa. (2016). Vazio sanitário é medida importante contra ferrugem asiática. Retrieved from <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/13556333/vazio-sanitario-e-medida-importante-contr-ferrugem-asiatica>
- Embrapa Soja. (2013). Tecnologias de produção de soja - Região Central do Brasil. *Londrina: Embrapa Soja*, 265.
- Engelberth, J., Alborn, H. T., Schmelz, E. A., & Tumlinson, J. H. (2004). Airborne signals prime plants against insect herbivore attack. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(6), 1781–1785. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308037100>
- Faria, M. R. de, & Wraight, S. P. (2007). Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control*, 43(3), 237–256. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.08.001>

- Farouk S. & Osman M. A. (2011). The effect of plant defense elicitors on common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) growth and yield in absence or presence of spider mite (*Tetranychus urticae* Koch) infestation. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, 7, 05–22.
- Farrell, R. E. (2010). Resilient Ribonucleases. In *RNA Methodologies* (pp. 155–172). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374727-3.00007-3>
- Fiallos, F. R. G. (2011). A ferrugem asiática da soja causada por *Phakopsora pachyrhizi* Sydow e Sydow. *Ciencia y Tecnología*, 4(2)(1999), 45–60.
- FRAC. (2017). Informação sobre carboxamidas em ferrugem da soja. *Frac-Brasil*, 1–3. Retrieved from http://docs.wixstatic.com/ugd/85b1d3_060a6876562140b693f03708057acff2.pdf
- FRAC. (2019). *Comitê de Ação a Resistência a Fungicidas-FRAC-Brasil*. d, 2–3. Retrieved from www.frac-br.org
- Gallo, D. et al. (2002). *Entomologia agrícola*. Piracicaba: FEALQ.
- Gauthier, N. W., Maruthachalam, K., Subbarao, K. V., Brown, M., Xiao, Y., Robertson, C. L., & Schneider, R. W. (2014). Mycoparasitism of *Phakopsora pachyrhizi*, the soybean rust pathogen, by *Simplicillium lanosoniveum*. *Biological Control*, 76, 87–94. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.05.008>
- Godoy, C. V.; Almeida, A. M. R.; Costamilan, M. C.; Meyer, W. P. E. A. (2016). Doenças da soja. Cap. 67. In L. E. A. Amorim, L.; Rezende, J. A. M.; Bergamin Filho, A.; Camargo (Ed.), *Manual de fitopatologia. V.2. Doenças das plantas cultivadas*. (5th ed.). Ouro Fino, MG: Agronômica Ceres,.
- Godoy, C., Seixas, C., Soares, R., Meyer, M., Costamilan, L., & Adegas, F. (2017). *Boas práticas para o enfrentamento da ferrugem-asiática da soja*. 1–6.
- Godoy, C., Utiamada, C., Meyer, M., Campos, H., Lopes, I., Forcelini, C., ... Venancio, W. (2012). *Eficiência de fungicidas para o controle da ferrugem-asiática da soja, Phakopsora pachyrhizi, na safra 2011/12: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos*.
- Godoy, C., Utiamada, C., Meyer, M., Campos, H., Lopes, I., Forcelini, C., ... Venancio, W. (2019). Eficiência de fungicidas para o controle da ferrugem-asiática da soja, *Phakopsora pachyrhizi*, na safra 2018/19: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. *Embrapa Soja. Circular Técnica 148.*, 10.
- Godoy, C. V., Seixas, C. D. S., Soares, R. M., Marcelino-Guimarães, F. C., Meyer, M. C., & Costamilan, L. M. (2016). Asian soybean rust in Brazil: Past, present, and future. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 51(5), 407–421. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2016000500002>

- Godoy, C. V., Koga, L. J., & Canteri, M. G. (2006). Diagrammatic scale for assessment of soybean rust severity. *Fitopatologia Brasileira*, 31(1), 63–68. <https://doi.org/10.1590/S0100-41582006000100011>
- Godoy, C. V., & Canteri, M. G. (2004). Efeitos protetor, curativo e erradicante de fungicidas no controle da ferrugem da soja causada por *Phakopsora pachyrhizi*, em casa de vegetação. *Fitopatologia Brasileira*, 29(1), 97–101. <https://doi.org/10.1590/S0100-41582004000100016>
- Goellner, K., Loehrer, M., Langenbach, C., Conrath, U., Koch, E., & Schaffrath, U. (2010). *Phakopsora pachyrhizi*, the causal agent of Asian soybean rust: Pathogen profile. *Molecular Plant Pathology*, 11(2), 169–177. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2009.00589.x>
- Golo, P. S., Gardner, D. R., Grilley, M. M., Takemoto, J. Y., Krasnoff, S. B., Pires, M. S., ... Roberts, D. W. (2014). Production of Destruxins from *Metarhizium* spp. Fungi in Artificial Medium and in Endophytically Colonized Cowpea Plants. *PLoS ONE*, 9(8), e104946. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104946>
- Gómez-Vidal, S., Salinas, J., Tena, M., & Lopez-Llorca, L. V. (2009). Proteomic analysis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) responses to endophytic colonization by entomopathogenic fungi. *Electrophoresis*, 30(17), 2996–3005. <https://doi.org/10.1002/elps.200900192>
- Gozzo, F., & Faoro, F. (2013). Systemic acquired resistance (50 years after discovery): Moving from the lab to the field. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(51), 12473–12491. <https://doi.org/10.1021/jf404156x>
- Griffin, M. R. (2007). *Beauveria bassiana*, a cotton endophyte with biocontrol activity against seedling disease. *ProQuest Dissertations and Theses*, 180. Retrieved from http://search.proquest.com/docview/304810695?accountid=10906%5Cnhttp://zsfx.lib.iastate.edu:3410/sfxlcl41?url_ver=Z39.88-2004&rft_val_fmt=info:ofi/fmt:kev:mtx:dissertation&genre=dissertations+%26+theses&id=ProQ:ProQuest+Dissertations+%26+Theses+Global&at
- Hallmann, J., & Sikora, R. A. (1996). Toxicity of fungal endophyte secondary metabolites to plant parasitic nematodes and soil-borne plant pathogenic fungi. *European Journal of Plant Pathology*, 102(2), 155–162. <https://doi.org/10.1007/BF01877102>
- Hartley, S. E., Eschen, R., Horwood, J. M., Gange, A. C., & Hill, E. M. (2015). Infection by a foliar endophyte elicits novel arabidopsid-based plant defence reactions in its host, *Cirsium arvense*. *New Phytologist*, 205(2), 816–827. <https://doi.org/10.1111/nph.13067>

- Hartman, G. L.; Rupe, J. C.; Sikora, E. J., Domier, L. L., Davis J. A., and K. L. Steffey, E. (2015). Compendium of Soybean Diseases and Pests, Fifth Editio. *The American Phytopathological Society*, 167–173. <https://doi.org/10.1094/9780890544754.005>
- Hartman, G. (2011). Interaction of soybean and *Phakopsora pachyrhizi*, the cause of soybean rust. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, 6(025). <https://doi.org/10.1079/PAVSNNR20116025>
- Hartman, G. L.; J. B. Sinclair; J. C. Rupe. (1999). Compendium of Soybean Diseases. *APS Press, Minnesota*. 128.
- Hartman, G. L., Hill, C. B., Twizeyimana, M., Miles, M. R., & Bandyopadhyay, R. (2011). Interaction of soybean and *Phakopsora pachyrhizi*, the cause of soybean rust. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, 6(025). <https://doi.org/10.1079/PAVSNNR20116025>
- Hartman, Glen L., West, E. D., & Herman, T. K. (2011). Crops that feed the World 2. Soybean-worldwide production, use, and constraints caused by pathogens and pests. *Food Security*, 3(1), 5–17. <https://doi.org/10.1007/s12571-010-0108-x>
- Hennings, V. P. (1903). [A few new Japanese Uredinaceae]. *Hedwigia* 42, 107–108.
- Hoeksma, J., Misset, T., Wever, C., Kemmink, J., Kruijtzter, J., Versluis, K., ... den Hertog, J. (2019). A new perspective on fungal metabolites: identification of bioactive compounds from fungi using zebrafish embryogenesis as read-out. *Scientific Reports*, 9(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54127-9>
- Hooker, A. L., & Yarwood, C. E. (1966). Culture of *Puccinia sorghi* on detached leaves of corn and *Oxalis corniculata*. *Phytopathology*, 56, 536–539.
- Hymowitz, T. (1970). On the domestication of thw soybean. *Economic Botany*, 24 (4).
- Index Fungorum. (2018a). *Metarhizium* (Metschn.) Sorokĭn. *Entomophthora* Metschn. 1879. Retrieved from <http://www.indexfungorum.org/names/NamesRecord.asp?RecordID=121037>
- Index Fungorum. (2018b). *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd., *Annls mycol.* 12(2): 108 (1914). Retrieved April 7, 2020, from <http://www.indexfungorum.org/names/NamesRecord.asp?RecordID=121037>
- Jaber, L. R., & Ownley, B. H. (2018). Can we use entomopathogenic fungi as endophytes for dual biological control of insect pests and plant pathogens? *Biological Control*, 116, 36–45. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.01.018>
- Judd, W. S.; Campbell, C. S.; Kellogg, E. A.; Donoghue, M. J. (2009). *Sistemática vegetal, um enfoque filogenético*. (3rd ed.). Porto Alegre: Artmed.

- Kang, S.-C., Bark, Y.-G., Lee, D.-G., & Kim, Y.-H. (1996). Antifungal Activities of *Metarhizium* against *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, and *Alternaria solani*. *The Korean Journal of Mycology*, Vol. 24, pp. 49–55.
- Kawashima, C. G., Guimarães, G. A., Nogueira, S. R., MacLean, D., Cook, D. R., Steuernagel, B., ... Brommonschenkel, S. H. (2016). A pigeonpea gene confers resistance to Asian soybean rust in soybean. *Nature Biotechnology*, 34(6), 661–665. <https://doi.org/10.1038/nbt.3554>
- Khan, A. L., Hamayun, M., Khan, S. A., Kang, S.-M., Shinwari, Z. K., Kamran, M., ... Lee, I.-J. (2012). Pure culture of *Metarhizium* LHL07 reprograms soybean to higher growth and mitigates salt stress. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 1483–1494. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0950-9>
- Klosowski, A. C., May De Mio, L. L., Miessner, S., Rodrigues, R., & Stammler, G. (2016). Detection of the F129L mutation in the cytochrome b gene in *Phakopsora pachyrhizi*. *Pest Management Science*, 72(6), 1211–1215. <https://doi.org/10.1002/ps.4099>
- Koiri, R. K., Naik, R. A., Rawat, D., Chhonker, S. K., & Ahi, J. D. (2017). Bioecological Perspective of Entomopathogenic Fungi with Respect to Biological Control. *Journal of Applied Microbiological Research*, 1(1), 7–14. Retrieved from www.innovationinfo.org
- Lacey, L. A., Grzywacz, D., Shapiro-Ilan, D. I., Frutos, R., Brownbridge, M., & Goettel, M. S. (2015). Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. *Journal of Invertebrate Pathology*, 132, 1–41. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.009>
- Li, W. L., Faris, J. D., Muthukrishnan, S., Liu, D. J., Chen, P. D., & Gill, B. S. (2001). Isolation and characterization of novel cDNA clones of acidic chitinases and β -1,3-glucanases from wheat spikes infected by *Fusarium graminearum*. *Theoretical and Applied Genetics*, 102(2–3), 353–362. <https://doi.org/10.1007/s001220051653>
- Lopez, A. M. Q. (1991). *Controle alternativo da antracnose causada por Colletotrichum graminicola (Ces.) Wils. em sorgo (Sorgum bicolor L. (Moench.)*. Unesp, Rio Claro.
- Lubeck, I., Arruda, W., Rbara, B., Souza, K., Uaski, F. S., Carlini, C. R., ... Vainstein, M. H. (2008). *Evaluation of Metarhizium strains as potential biocontrol agents of the tick Rhipicephalus (Boophilus) microplus and the cotton stainer Dysdercus peruvianus*. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2008.09.002>
- Luz, C., Rocha, L. F. N., Montalva, C., Souza, D. A., Botelho, A. B. R. Z., Lopes, R. B., ... Delalibera, I. (2019). *Metarhizium humberi* sp. nov. (Hypocreales: Clavicipitaceae), a new member of the PARB clade in the *Metarhizium* complex from Latin America. *Journal of Invertebrate Pathology*, 166. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2019.107216>

- Lyon, G. D., & Newton, A. C. (1997). Do resistance elicitors offer new opportunities in integrated disease control strategies? *Plant Pathology*, 46(5), 636–641. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.1997.d01-63.x>
- M.M. Clark, K.D. Gwinn, B. H. O. (2006). Biological control of *Pythium myriotylum*. *Phytopathology*, 96, S25.
- Mandal, S. (2010). Induction of phenolics, lignin and key defense enzymes in eggplant (*Solanum melongena* L.) roots in response to elicitors. *African Journal of Biotechnology*, 9(47), 8038–8047. <https://doi.org/10.5897/AJB10.984>
- Manoj Kumar, A., Reddy, K. N., Sundaresha, S., & Ramachandra, Y. L. (2006). Compatibility of fungal antagonists filtrates against germination of powdery mildew spores, *Leveillula taurica* (Lev.) Arn. of bell pepper. *Plant Pathology Journal*, 5(2), 248–252. <https://doi.org/10.3923/ppj.2006.248.252>
- MAPA. (2016). *Relatório Consolidado de Produtos Formulados*. 1–6.
- Martins-Corder, M. P., & Melo, I. S. de. (1998). Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp. A *Verticillium dahliae* KLEB. *Scientia Agricola*, 55(1), 1–7. <https://doi.org/10.1590/S0103-90161998000100002>
- Matos, A. J. A. de. (1988). Germinação conidial em *Metarhizium* (Metsch.) Sorokin.
- Matsuo, E.; Lopes, E. A. . S. (2015). Manejo de doenças. In A. Sedyama, T.; Silva, F.; Borém (Ed.), *Soja: do plantio a colheita*. UFV.
- Mauch-Mani, B., Baccelli, I., Luna, E., & Flors, V. (2017). Defense priming: An adaptive part of induced resistance. *Annual Review of Plant Biology*, 68(1), 485–512. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042916-041132>
- Medeiros, F. H. V.; Silva, J. C. P.; Pascholati, S. F. (2018). Controle biológico de doenças de plantas. In A. Amorim, L.; Rezende, J.A.M.; Bergamin-Filho (Ed.), *Manual de fitopatologia. Vol.1. Princípios e conceitos*. (5th ed., pp. 261–272). São Paulo: Agr. Ceres.
- Mehl, A. (2009). *Phakopsora pachyrhizi*: sensitivity monitoring and resistance management strategies for DMI and QoI fungicides. *Anais. Congresso Brasileiro de Soja*.
- Morel Paiva, W. (2001). *Roya de la soja. Itapúa: Ministério de Agricultura y Ganaderia, Subsecretaria de Agricultura, Dirección de Investigación Agrícola: Centro Regional de Investigación Agrícola - CRIA,*.
- Murithi, H. M., Beed, F., Tukamuhabwa, P., Thomma, B. P. H. J., & Joosten, M. H. A. J. (2016). Soybean production in eastern and southern Africa and threat of yield loss due to soybean rust caused by *Phakopsora pachyrhizi*. *Plant Pathology*, 65(2), 176–188. <https://doi.org/10.1111/ppa.12457>

- Nascimento, J. M. do, Gavassoni, W. L., Bacchi, L. M. A., & Melo, E. P. de. (2016). Germinação de uredinósporos de *Phakopsora pachyrhizi* e *Puccinia kuehnii* sob diferentes adjuvantes. *Arquivos Do Instituto Biológico*, 82(0), 1–6. <https://doi.org/10.1590/1808-1657001242013>
- O'Brien, P. A. (2017). Biological control of plant diseases. *Australasian Plant Pathology*, 46(4), 293–304. <https://doi.org/10.1007/s13313-017-0481-4>
- Oliveira, M. D. M., Varanda, C. M. R., & Félix, M. R. F. (2016). Induced resistance during the interaction pathogen x plant and the use of resistance inducers. *Phytochemistry Letters*, 15(October 2017), 152–158. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2015.12.011>
- Ownley, B. H., Griffin, M. R., Klingeman, W. E., Gwinn, K. D., Moulton, J. K., & Pereira, R. M. (2008). *Beauveria bassiana*: Endophytic colonization and plant disease control. *Journal of Invertebrate Pathology*, 98(3), 267–270. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2008.01.010>
- Ownley, B. H., Gwinn, K. D., & Vega, F. E. (2010). Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: Ecology and evolution. *BioControl*, 55(1), 113–128. <https://doi.org/10.1007/s10526-009-9241-x>
- Ownley, B. H., Pereira, R. M., Klingeman, W. E., Quigley, N. B., & Leckie, B. M. (2004). *Beauveria bassiana*, a dual purpose biocontrol organism, with activity against insect pests and plant pathogens. In: Lartey RT, Caesar A (Eds) *Emerging Concepts in Plant Health Management. Research Signpost, Kerala*, (August 2016), 255–269.
- Pal, K. K. and B. M. G. (2006). Biological control of plant pathogens. *The Plant Health Instructor*, 1–25. <https://doi.org/10.1094/PHI-A-2006-1117-02>.
- Pal, S., St. Leger, R. J., & Wu, L. P. (2007). Fungal peptide destruxin a plays a specific role in suppressing the innate immune response in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Biological Chemistry*, 282(12), 8969–8977. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605927200>
- Parsa, S., Ortiz, V., & Vega, F. E. (2013). Establishing fungal entomopathogens as endophytes: towards endophytic biological control. *Journal of Visualized Experiments*, (74). <https://doi.org/10.3791/50360>
- Pascholati, S. F.; Dalio, R. J. D. (2018). Fisiologia do parasitismo: Como as plantas se defendem dos patógenos. In A. Amorim, L.; Rezende, J.A.M.; Bergamin-Filho (Ed.), *Manual de fitopatologia. Vol.1. Princípios e conceitos* (5th ed., pp. 424–450). São Paulo: Agr. Ceres.
- Paxton, J. D. (1981). Phytoalexins — A Working Redefinition. *Journal of Phytopathology*, 101(2), 106–109. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1981.tb03327.x>

- Pereira, S., A. Rodrigues, F., Carré-Missio, V., Goreti A. Oliveira, M., & Zambolim, L. (2009). Aplicação foliar de silício na resistência da soja à ferrugem e na atividade de enzimas de defesa. *Tropical Plant Pathology*, 34(3). <https://doi.org/10.1590/S1982-56762009000300005>
- Pinheiro, J. C. & Bates, D. M. (2000). Mixed-effects models in s and splus, springer series in statistics and computing, New York.
- Ravindran, K., Chitra, S., Wilson, A., Sivaramakrishnan, S. (2014). Evaluation of antifungal activity of *Metarhizium* against plant phytopathogenic fungi. In *Microbial Diversity and Biotechnology in Food Security* (pp. 251–255). https://doi.org/10.1007/978-81-322-1801-2_22
- Reis, E. M., A. C. R. Bresolin, e M. C. (2006). Doenças da soja I: Ferrugem asiática. *Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo*.
- Reis, E. M., O. Scheer, e J. R. (2005). Kudzú (*Pueraria lobata*) hospedeiro secundário de *Phakopsora pachyrhizi*, no Brasil. *Fitopatologia Brasileira (Resumo)*, S130.
- Rencher, A. C., & Schaalje, G. B. (2007). *Linear Models in Statistics*. <https://doi.org/10.1002/9780470192610>
- Rigby, R. A., & Stasinopoulos, D. M. (2005). Generalized additive models for location, scale and shape (with discussion). *Journal of the Royal Statistical Society: Series C (Applied Statistics)*, 54(3), 507–554. <https://doi.org/10.1111/j.1467-9876.2005.00510.x>
- Rossi, R. L. (2003). First report of *Phakopsora pachyrhizi*, the causal organism of soybean rust in the province of Misiones, Argentina. *Plant Disease*, 87(1), 102–102. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.1.102A>
- Rupe, J. and L. S. (2008). Soybean rust. *Plant Health Instructor*. <https://doi.org/10.1094/phi-i-2008-0401-01>
- Saboki, E., Usha, K., & Singh, B. (2011). Pathogenesis related (PR) proteins in plant defense mechanism age-related pathogen resistance. *Curr. Res. Technol. Adv.*, (January), 1043–1054.
- Sarven, M. S., Hao, Q., Deng, J., Yang, F., Wang, G., Xiao, Y., & Xiao, X. (2020). Biological control of tomato gray mold caused by *Botrytis Cinerea* with the entomopathogenic fungus *Metarhizium*. *Pathogens*, 9(3), 213. <https://doi.org/10.3390/pathogens9030213>
- Sasan, R. K., & Bidochka, M. J. (2012). The insect-pathogenic fungus *Metarhizium* (Clavicipitaceae) is also an endophyte that stimulates plant root development. *American Journal of Botany*, 99(1), 101–107. <https://doi.org/10.3732/ajb.1100136>

- Sasan, R. K., & Bidochka, M. J. (2013). Antagonism of the endophytic insect pathogenic fungus *Metarhizium* against the bean plant pathogen *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 35(3), 288–293. <https://doi.org/10.1080/07060661.2013.823114>
- Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 3(6), 1101–1108. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>
- Schmitz, H. K., Medeiros, C.-A., Craig, I. R., & Stammeler, G. (2014). Sensitivity of *Phakopsora pachyrhizi* towards quinone-oxidoreductase inhibitors and demethylation-inhibitors, and corresponding resistance mechanisms. *Pest Management Science*, 70(3), 378–388. <https://doi.org/10.1002/ps.3562>
- Schneider, R. W., Hollier, C. A., Whitam, H. K., Palm, M. E., McKemy, J. M., Hernández, J. R., ... DeVries-Paterson, R. (2005). First report of soybean rust caused by *Phakopsora pachyrhizi* in the Continental United States. *Plant Disease*, 89(7), 774–774. <https://doi.org/10.1094/PD-89-0774A>
- Schwan-Estrada, K. R. F., Stangarlin, J. R., & Cruz, M. E. D. S. (2000). Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos. *Floresta*, 30(12), 129–137. <https://doi.org/10.5380/rf.v30i12.2361>
- Shah, P. A., & Pell, J. K. (2003). Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61(5–6), 413–423. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1240-8>
- Siqueira, A. C. O. (2016). *Uso de Metarhizium spp. na produção de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar e seus efeitos na planta, em pragas e doenças* (Universidade de São Paulo). <https://doi.org/10.11606/D.11.2016.tde-25042016-183101>
- Small, C.-L. N., & Bidochka, M. J. (2005). Up-regulation of Pr1, a subtilisin-like protease, during conidiation in the insect pathogen *Metarhizium*. *Mycological Research*, 109(3), 307–313. <https://doi.org/10.1017/S0953756204001856>
- St Leger, R., Joshi, L., Bidochka, M. J., & Roberts, D. W. (1996). Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(13), 6349–6354. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.13.6349>
- Thakur, M., & Sohal, B. S. (2013). Role of elicitors in inducing resistance in plants against pathogen infection: A Review. *ISRN Biochemistry*, 2013, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2013/762412>
- Tremblay, A. (2011). Soybean rust: five years of research. In A. Sudaric (Ed.), *Soybean - Molecular Aspects of Breeding* (pp. 293–334). <https://doi.org/10.5772/15121>

- USDA. (2020). Soybeans. Data & Analysis. Retrieved April 7, 2020, from <https://www.fas.usda.gov/commodities/soybeans>
- Valicente, F. H. (2009). Controle biológico de pragas com entomopatógenos. In *Informe Agropecuario* (Vol. 30).
- Vega, F. E., Goettel, M. S., Blackwell, M., Chandler, D., Jackson, M. A., Keller, S., ... Roy, H. E. (2009). Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. *Fungal Ecology*, 2(4), 149–159. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2009.05.001>
- Verdejo Lucas, S., Viera, A., Stchigel, A. M., & Sorribas, F. J. (2009). Screening culture filtrates of fungi for activity against *Tylenchulus semipenetrans*. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 7(4), 896. <https://doi.org/10.5424/sjar/2009074-1103>
- Wang, C., Typas, M. A., & Butt, T. M. (2002). *Detection and characterisation of pr1 virulent gene deçciencies in the insect pathogenic fungus Metarhizium* . Retrieved from www.fems-microbiology.org
- Ward, N. A., Robertson, C. L., Chanda, A. K., & Schneider, R. W. (2012). Effects of *Simplicillium lanosoniveum* on *Phakopsora pachyrhizi* , the soybean rust pathogen, and its use as a biological control agent. *Phytopathology*, 102(8), 749–760. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-01-11-0031>
- Yamaoka, Y., Yamanaka, N., Akamatsu, H., & Suenaga, K. (2014). Pathogenic races of soybean rust *Phakopsora pachyrhizi* collected in Tsukuba and vicinity in Ibaraki, Japan. *Journal of General Plant Pathology*, 80(2), 184–188. <https://doi.org/10.1007/s10327-014-0507-5>
- Yarwood, C. E. (1946). Detached leaf culture. *Botanical Review*, 12, 1–56.
- Yorinori, J. T.; Nunes Junior, J.; Lazzarotto, J. J. (2004). Ferrugem “asiática” da soja no Brasil: evolução, importância econômica e controle. *Embrapa Soja*, 36.
- Yorinori, J. T.; Paiva, W. M.; Frederick, R. D.; Fernandez, P. F. T. (2002). Ferrugem da soja (*Phakopsora pachyrhizi*) no Brasil e no Paraguai, nas safras 2001/01 e 2001/02. *Anais Congresso Brasileiro de Soja 2002:94 (Resumo)*.
- Yorinori J. T. (2008). Soybean germplasm with resistance and tolerance to Asian rust and screening methods. In A. Kudo, H.; Suenaga, K.; Soares, R. M.; Toledo (Ed.), *Facing the Challenge of Soybean Rust in South America*. (pp. 70–87). Tsukuba, Japan: JIRCAS.
- Yorinori, J. T., Paiva, W. M., Frederick, R. D., Costamilan, L. M., Bertagnolli, P. F., Hartman, G. E.; Nunes, J. (2005). Epidemics of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Brazil and Paraguay from 2001 to 2003. *Plant Disease*, 89(6), 675–677. <https://doi.org/10.1094/PD-89-0675>

- Zhang, C., & Xia, Y. (2009). Identification of genes differentially expressed *in vivo* by *Metarhizium* in the hemolymph of *Locusta migratoria* using suppression-subtractive hybridization. *Current Genetics*, 55(4), 399–407. <https://doi.org/10.1007/s00294-009-0254-x>
- Zimmermann, G. (1993). The entomopathogenic fungus *Metarhizium* and its potential as a biocontrol agent. *Pesticide Science*, 37(4), 375–379. <https://doi.org/10.1002/ps.2780370410>
- Zimmermann, G. (2007). Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium* . *Biocontrol Science and Technology*, 17(9), 879–920. <https://doi.org/10.1080/09583150701593963>