

ARTIGO ORIGINAL

Associação de *Bacillus subtilis* BV02 e produto à base de cobre no controle da ferrugem asiática na soja

Camila Rebelatto Muniz¹, Hiago Lima Paniago¹, Guilherme Braga Pereira Braz², Hercules Diniz Campos², Eduardo Souza Freire²

¹Engenheiro(a) Agrônomo(a) egresso da Faculdade de Agronomia da Universidade de Rio Verde (UniRV). Fazenda Fontes do Saber, Campus Universitário, Caixa Postal 104, Rio Verde, GO, Brasil. CEP: 75901-970; ²Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal da UniRV, Faculdade de Agronomia da Universidade de Rio Verde (UniRV). Fazenda Fontes do Saber, Campus Universitário, Caixa Postal 104, Rio Verde, GO, Brasil. Autor para correspondência: Guilherme Braga Pereira Braz (guilhermebrag@gmail.com)

Data de chegada: 20/07/2020. Aceito para publicação em: 24/06/2023

10.1590/0100-5405/241169

RESUMO

Muniz, C.R.; Paniago, H.L.; Braz, G.B.P.; Campos, H.D.; Freire, E.S. Associação de *Bacillus subtilis* BV02 e produto à base de cobre no controle da ferrugem asiática na soja. *Summa Phytopathologica*, v.49, p.1-9, 2023.

O fungo causador da ferrugem asiática na soja, *Phakopsora pachyrhizi*, apresenta resistência cruzada e múltipla aos três grupos químicos (triazóis, estrobilurinas e carboxamidas) de fungicidas sítio-específicos. Este fato torna evidente a necessidade da implementação de estratégias para o manejo de prevenção da resistência. Uma alternativa pode ser a utilização de microrganismos com capacidade de interferir no desenvolvimento de patógenos, bem como atuarem como indutores da resistência das plantas. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a eficácia de produto biológico à base de *Bacillus subtilis* BV02 isolado ou associado à produto à base de cobre no controle de ferrugem asiática, bem como desempenho agrônômico da soja. Para tanto, foram instalados dois experimentos, sendo um no campo e outro em laboratório. Para o experimento conduzido em campo, o delineamento utilizado foi o de blocos ao acaso, estando os tratamentos dispostos em arranjo fatorial (5x2)+1, com quatro repetições. O primeiro fator correspondeu a aplicação, em pós-emergência da soja, de cinco doses de *B. subtilis* BV02 (0, 0,5, 1,0, 2,0 ou 4,0 L p.c. ha⁻¹). O segundo fator correspondeu a associação ou não com produto

à base de cobre. O tratamento adicional consistiu na aplicação da associação entre os fungicidas [azoxystrobina + benzovindiflupir] + mancozebe. No experimento em laboratório foi avaliada a germinação dos uredósporos de *P. pachyrhizi* em placas Elisa, no delineamento inteiramente casualizado com oito repetições. Foram utilizados os mesmos tratamentos do experimento do campo, diferenciando-se apenas o fungicida químico, o qual não foi adicionado mancozebe a calda aplicada. O aumento de dose de *B. subtilis* BV02, aplicado isoladamente, proporcionou reduções na severidade de ferrugem, não sendo visualizado este comportamento quando associado ao produto à base de cobre. Para a associação entre *B. subtilis* BV02 e produto à base de cobre, os melhores resultados para o controle de ferrugem asiática foram visualizados em doses iguais ou inferiores a 1,0 L p.c. ha⁻¹. A produtividade da soja foi superior ao tratamento contendo fungicidas com a utilização de *B. subtilis* BV02 isolado (1,0 e 2,0 L p.c. ha⁻¹), com aplicação apenas de produto à base de cobre e com utilização deste micronutriente em associação ao *B. subtilis* BV02 (2,0 L p.c. ha⁻¹).

Palavras-chave: controle biológico, doenças foliares, *Glycine max*, *Phakopsora pachyrhizi*.

ABSTRACT

Muniz, C.R.; Paniago, H.L.; Braz, G.B.P.; Campos, H.D.; Freire, E.S. Association between *Bacillus subtilis* BV02 and a copper-based product in controlling Asian soybean rust. *Summa Phytopathologica*, v.49, p.1-9, 2023.

The fungus that causes Asian soybean rust, *Phakopsora pachyrhizi*, shows crossed and multiple resistance to the three chemical groups of site-specific fungicides (triazoles, strobilurins and carboxamides). This fact evidences the need to implement strategies for the preventive management of resistance. An alternative can be the use of microorganisms capable of interfering in the development of pathogens, as well as of acting as resistance inducers in the plants. The objective of the present study was to evaluate the efficacy of a biological product based on *Bacillus subtilis* BV02, alone or in association with a copper-based product, on Asian soybean rust control, as well as the agronomic performance of soybean. Thus, two experiments were developed, one in the field and another one in the laboratory. For the experiment conducted in the field,

a randomized block design was used with (5x2)+1 factorial arrangement of treatments, including four replicates. The first factor corresponded to application, during post-emergence of soybeans, of five *B. subtilis* BV02 doses (0, 0.5, 1.0, 2.0 or 4.0 L c.p. ha⁻¹). The second factor corresponded to association or not with a copper-based product. The additional treatment consisted of applying the fungicide association [azoxystrobin + benzovindiflupyr] + mancozeb. In the laboratory experiment, germination of *Phakopsora pachyrhizi* uredospores in Elisa plates was evaluated in a completely randomized design with eight replicates. Treatments were the same as those adopted in the field experiment, except for the chemical fungicide, since mancozeb was not added to the sprayed broth. Increasing doses of *B. subtilis* BV02, applied alone, provided reductions

in Asian soybean rust severity, and this behavior was not observed when it was applied in association with the copper-based product. Considering the association between *B. subtilis* BV02 and the copper-based product, the best Asian rust control results were found with doses equal or inferior to 1.0 L c.p.

ha⁻¹. Soybean yield was superior to that of the treatment containing fungicides with the use of *B. subtilis* BV02 alone (1.0 and 2.0 L c.p. ha⁻¹), with application of only a copper-based product and with the combination of this micronutrient with *B. subtilis* BV02 (2.0 L c.p. ha⁻¹).

Keywords: biological control, leaf diseases, *Glycine max*, *Phakopsora pachyrhizi*.

O Brasil consolidou-se como o maior produtor mundial de soja (4). Para que este aumento na produção de soja fosse obtido, diversos fatores foram preponderantes, destacando-se o melhoramento genético, que contribuiu para a criação de materiais adaptados as regiões de cultivo e o aprimoramento de práticas de manejo, tanto as relacionadas à nutrição da cultura, como para o controle fitossanitário.

Mesmo com o aprimoramento nos sistemas de produção de soja, invariavelmente é comum a ocorrência de fatores de origem biótica que interferem negativamente no desenvolvimento da cultura, causando redução na produtividade. Neste sentido, pode-se afirmar que o principal desafio fitossanitário na cultura da soja no Brasil, tem sido a ferrugem asiática, que tem como agente causal o fungo biotrófico *Phakopsora pachyrhizi* Sydow & Sydow (10). O principal dano verificado na ocorrência desta doença consiste na desfolha precoce das plantas, reduzindo a produção de fotoassimilados que seriam redistribuídos para o processo de enchimento dos grãos, causando quedas na produtividade da cultura que podem chegar à 90% (24).

Desde o primeiro relato de ocorrência da ferrugem asiática em lavouras de soja no Brasil (24), diversas pesquisas vêm sendo realizadas para buscar melhores estratégias de manejo. Ao longo destes anos, foi constatada a suscetibilidade diferencial de cultivares de soja para a doença (16), foram desenvolvidas cultivares que apresentaram tolerância genética ao fungo (13), bem como identificada a necessidade de aplicações preventivas, para diminuir a severidade em áreas com semeaduras mais tardias (11).

Apesar de todos os esforços visando aprimoramento nas práticas de manejo, por vezes os produtores acabam optando apenas pelo controle químico da ferrugem asiática utilizando fungicidas sítio específico, criando grande pressão seletiva na população do fungo. A redução da sensibilidade do fungo *P. pachyrhizi* a fungicidas do grupo dos inibidores da desmetilação (IDM - triazóis), inibidores da quinona externa (IQe - estrobilurina) e inibidores da succinato desidrogenase (ISDH - carboxamidas) já foi relatada no Brasil (14, 21, 22), sendo esses os três principais grupos que compõem todos os fungicidas registrados em uso no controle da doença (19).

É fundamental a busca por alternativas de controle e que não envolvam apenas o uso de fungicidas químicos, as quais podem ser inseridas em programas de manejo integrado de doenças na cultura da soja. Uma das opções é o uso de microrganismos que apresentam capacidade de interferir no desenvolvimento de outros fitoparasitas. Neste contexto, bactérias do gênero *Bacillus* sp. apresentam capacidade de inibir o crescimento e evolução de outros patógenos (15, 20), sendo alternativas para serem avaliadas para uso futuro no manejo integrado de ferrugem asiática na soja.

Adicionalmente, bactérias do gênero *Bacillus* sp. atuam como “multissítios biológicos”, pois possuem ação antifúngica e antibacteriana (ação direta), além de serem capazes de promover o crescimento de plantas e induzir mecanismos de resistência das plantas às doenças (ação indireta) (3, 18). Dentre essas práticas, cita-se a utilização de produtos à base de cobre, micronutriente o qual já teve sua eficácia relatada para uso no manejo de doenças em diversas

culturas (7).

A utilização de multissítios biológicos e inorgânicos são fundamentais para a sustentabilidade do controle químico de doenças. Neste sentido, a hipótese formulada no presente trabalho é de que a associação entre agentes de biocontrole associados à produto à base de cobre pode servir de alternativa para ser implementada em sistemas de controle de doenças na cultura da soja em associação aos fungicidas químicos. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a eficácia do controle de *B. subtilis* BV02 isolado ou associado à produto contendo cobre no controle de ferrugem asiática, bem como desempenho agrônomo da soja.

MATERIAL E MÉTODOS

Experimento no campo

O experimento foi conduzido na área experimental da Universidade de Rio Verde - UniRV, localizada no município de Rio Verde (GO) (17°47'18.50"S; 50°57'26.43"W; 745 m acima do nível do mar). O período de condução do experimento foi de dezembro de 2018 a março de 2019.

Segundo classificação Köppen, o clima para a localidade é do tipo Aw, que recebe o nome de clima tropical com estação seca, apresentando como principal característica a ocorrência de chuvas mais intensas no verão em comparação com o inverno (23). Os dados climáticos durante a condução do experimento foram obtidos de uma estação meteorológica da UniRV, localizada próximo ao experimento. Durante o período de condução do experimento, foi registrado volume acumulado de precipitação equivalente a 676,2 mm, temperatura média 23,9°C e umidade relativa do ar média 74,1%.

Precedendo a instalação do experimento, foi realizada coleta de amostras de solo (camada de 0-20 cm) na área experimental, as quais foram homogeneizadas para avaliação das características físicas e químicas do solo. Após análise, estas revelaram os seguintes valores: pH (H₂O) = 5,2, P = 6,72 mg dm⁻³, matéria orgânica = 35,6 g kg⁻¹, argila = 48,5 g kg⁻¹, silte = 12 g kg⁻¹ e areia = 39,5 g kg⁻¹ (textura argilosa).

O delineamento experimental foi de blocos ao acaso dispostos em arranjo fatorial (5x2)+1, com quatro repetições. O primeiro fator correspondeu a aplicação em pós-emergência da soja de cinco doses de *B. subtilis* BV02 (código Sigen: ACF02CA, Bio-Imune[®], Vittia, São Joaquim da Barra - SP), incluindo uma testemunha sem aplicação: 0, 0,5, 1,0, 2,0 e 4,0 L p.c. ha⁻¹. O segundo fator correspondeu a aplicação do *B. subtilis* BV02 associado ou não com produto à base de cobre (NHT[®] Cobre Super, Vittia, São Joaquim da Barra - SP), na dose de 0,15 L p.c. ha⁻¹ (41,75% de Cu). O tratamento adicional consistiu na aplicação da associação de fungicidas químicos: azoxistrobina + benzovindiflupir (Elatus[®], Syngenta) + mancozebe (Unizeb Gold[®], UPL), na dose de 90 + 45 + 2250 g i.a. ha⁻¹, respectivamente.

Ao longo do ciclo da soja, foram realizadas quatro aplicações em cada tratamento. A unidade experimental constituiu-se de oito fileiras de soja, espaçadas a 0,5 m entre fileiras, com cinco metros de comprimento. A área útil utilizada foi de quatro fileiras centrais da

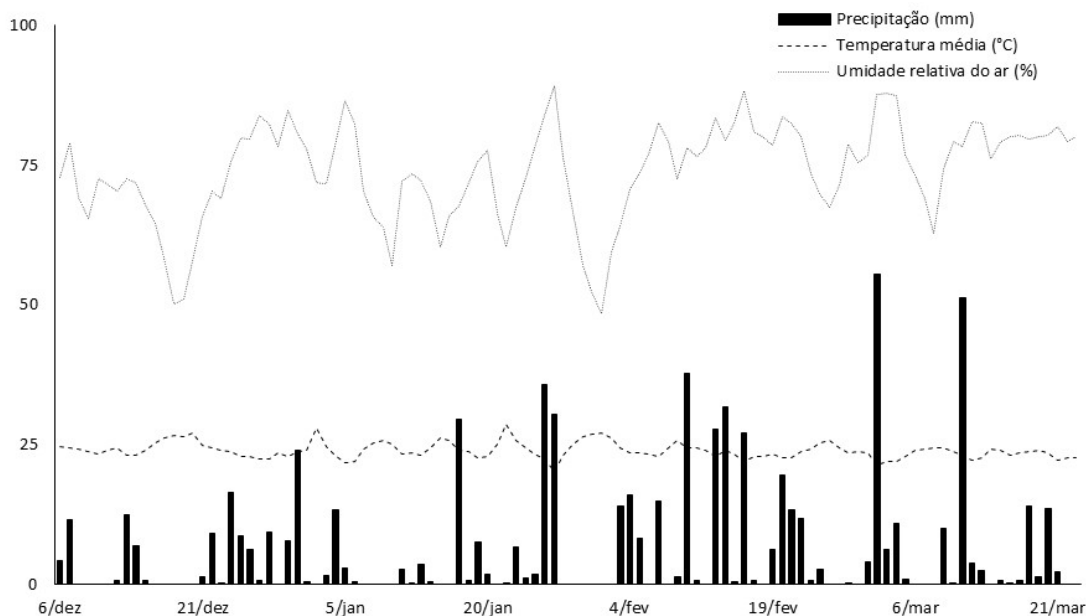


Figura 1. Temperatura média e precipitação pluvial registrada durante o período de condução do experimento

Fonte: INMET - Instituto Nacional de Meteorologia – Rio Verde – GO.

unidade experimental, com bordadura de 0,5 m em cada extremidade, totalizando área equivalente a 8 m².

A semeadura foi realizada em 06 de dezembro de 2018, utilizando sementes da cultivar M7739 IPRO[®], com densidade de semeadura de 18 sementes por metro (17). As sementes de soja foram tratadas com 1,2 mL p.c. kg⁻¹ de semente do inoculante *Bradyrhizobium* SEMIA 5079 e 5080 (Biomax[®] Premium Líquido, Vittia, São Joaquim da Barra - SP).

Durante o desenvolvimento da soja foram realizados tratos culturais de acordo com os recomendados pela Embrapa (8), procedendo ao controle de plantas daninhas e pragas sem deixar que estes influenciassem negativamente no desenvolvimento da cultura. Todas as aplicações de manutenção foram realizadas por meio de pulverizador de arrasto, adotando-se volume de calda aplicada equivalente a 150 L ha⁻¹.

As aplicações dos tratamentos foram realizadas com pulverizador costal pressurizado à CO₂, com uma barra de contendo cinco pontas espaçadas a 0,5 m. As regulagens do pulverizador, bem como velocidade de operação, proporcionaram taxa de pulverização de 200 L ha⁻¹. Na Tabela 1 estão apresentados os dados climáticos na ocasião de cada aplicação, bem como o estágio fenológico em que as plantas de soja se encontravam. Em todas as aplicações foi adicionado adjuvante Naft[®] (Vittia, São Joaquim da Barra - SP) na dose de 0,1 L p.c. ha⁻¹.

Para mensurar o desempenho dos tratamentos no controle de ferrugem asiática, foi avaliada a severidade e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD). A ocorrência de ferrugem asiática na área experimental foi tardia, fato que fez com que as avaliações de

severidade e AACPD fossem realizadas aos 7 e 14 dias após a terceira (69 e 76 dias após a emergência - DAE) e quarta aplicação (85 e 92 DAE). A avaliação da severidade foi baseada na escala diagramática proposta por Godoy et al. (12), procedendo a amostragem de cinco folhas do terço inferior e cinco folhas do terço médio das plantas por unidade experimental.

A colheita, foi realizada em 23/03/2019, obtendo a produtividade em kg ha⁻¹ e massa de 100 grãos. A determinação da produtividade foi realizada por meio da colheita manual de todas as plantas presentes na área útil das unidades experimentais e trilhadas, pesadas e realizada a correção da umidade dos grãos para 13%.

Experimento em laboratório

No experimento conduzido no laboratório para avaliar a germinação de uredósporos de *P. pachyrhizi* em placas Elisa, utilizaram-se concentrações crescentes de produto à base de *B. subtilis* BV02 isolado ou associado ao cobre. O referido trabalho foi instalado no delineamento inteiramente casualizado com oito repetições, sendo o experimento repetido por duas vezes. Para este experimento utilizou-se os mesmos tratamentos utilizados no trabalho realizado em campo, diferenciando-se apenas o fungicida químico, no qual não foi adicionada à calda aplicada o ingrediente ativo mancozebe.

Os uredósporos de *P. pachyrhizi* foram coletados de folhas de soja naturalmente infectadas, obtendo-se uma suspensão de inóculo contendo concentração ajustada para 10.000 uredósporos mL⁻¹,

Tabela 1. Dados climáticos e estágio fenológico da soja na ocasião das aplicações na cultura visando ao manejo de ferrugem asiática

	Data da aplicação			
	10/01/2019	26/01/2019	11/02/2019	27/02/2019
Temperatura (°C)	29,3	22,2	30,4	20,7
Umidade relativa do ar (%)	41	87	48	93
Velocidade do vento (km h ⁻¹)	2,2	3,0	2,3	0,4
Estádio fenológico da soja	V6	R1	R3	R5

adicionado de uma solução do dispersante Tween 80 a 1% (5). Foram colocados 100 µL da calda de cada tratamento por célula da placa Elisa. Em seguida, pipetou-se 100 µL da suspensão de esporos em cada célula. As placas com os tratamentos foram mantidas em incubadora a $\pm 22^{\circ}\text{C}$.

O efeito dos tratamentos foi avaliado pela germinação dos esporos às 6, 12, 24, 36 e 48 horas após a aplicação dos tratamentos em microscópio de objetiva invertida. Considerou-se como germinado, o esporo com o comprimento do tubo germinativo duas vezes maior que o diâmetro do esporo.

Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada no software SISVAR (9). Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F ($p \leq 0,05$) e quando constatado efeito significativo entre os fatores, ou entre os níveis de cada fator, as médias do fator qualitativo (associação ao produto à base de cobre) foram comparadas pelo teste F ($p \leq 0,05$) e para o fator quantitativo (dose de *B. subtilis* BV02), foi empregada a análise de regressão ($p \leq 0,05$). A comparação do tratamento adicional com os demais foi realizada por meio do intervalo de confiança ($p \leq 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento no campo

Os resultados das quatro avaliações de severidade, AACPD para ferrugem asiática na soja e produtividade de grãos, encontram-se na Tabela 2. Na primeira avaliação de severidade (69 DAE), constatou-se que as plantas de soja que não foram tratadas com *B. subtilis* BV02 apresentaram maiores valores de severidade de ferrugem asiática quando comparadas àquelas que receberam produto à base de cobre.

O uso de produto à base de cobre no experimento proporcionou redução na severidade de 62% em comparação com a testemunha. O desempenho verificado pela adição de produto à base de cobre na redução da severidade já foi comprovado na literatura que este micronutriente proporciona ativação de enzimas que atuam na defesa da planta contra patógenos (7).

Ainda em relação à primeira avaliação de severidade, nota-se que independentemente da dose de *B. subtilis* BV02, não foi visualizado melhor desempenho dos tratamentos quando adicionado o produto à base de cobre. Nas avaliações subsequentes de severidade (76, 85 e 92 DAE), o benefício da associação de cobre ao *B. subtilis* BV02 na redução de severidade de ferrugem asiática passou a ser constatado, nos tratamentos em que foram utilizadas doses do produto contendo microrganismos iguais ou inferiores a 1,0 L p.c. ha⁻¹ (Tabela 2).

Ao longo das quatro avaliações da severidade, quando se procedeu a comparação dos tratamentos contendo *B. subtilis* BV02 isolado ou associado ao cobre com aquele em que foi utilizado a associação fungicida [azoxistrobina + benzovindiflupir] + mancozebe, constatou-se que em 97,5% dos casos, sempre a severidade onde se empregou controle químico foi menor em relação aos demais tratamentos. A visualização deste comportamento pode ser explicada pelo fato de tanto o *B. subtilis* BV02 como o cobre, podem atuar como multissítios (biológico e inorgânico, respectivamente), os quais agem em processos morfológicos e bioquímicos visando indução da resistência das plantas ao processo de infecção de patógenos (2, 3, 6, 17).

Por outro lado, a associação entre fungicidas químicos empregada no presente trabalho apresenta ação curativa e protetora (preventiva) sobre o fungo causador da ferrugem asiática (1), o que assegura a eficácia destes no manejo da doença.

Quanto a AACPD, o comportamento verificado foi semelhante nas diferentes datas em que estas foram realizadas, sendo constatado que a associação de cobre se faz interessante quando utilizadas doses de *B. subtilis* BV02 iguais ou inferiores à 1,0 L p.c. ha⁻¹ (Tabela 2). Para as duas maiores doses de *B. subtilis* BV02, não foram constatadas diferenças no progresso da doença quando houve a adição ou não do produto à base de cobre. Em relação à comparação entre os tratamentos contendo *B. subtilis* BV02, isolado ou associado ao cobre, e com aplicação dos fungicidas [azoxistrobina + benzovindiflupir] + mancozebe, verifica-se que sempre as plantas que receberam como medida de controle o método químico, apresentaram uma curva de progresso da ferrugem asiática inferior.

Para a massa de mil grãos, não foi observado efeito significativo dos tratamentos utilizados. Para produtividade de grãos, procedendo a comparação entre a utilização ou não de produto à base de cobre, verifica-se que a única situação foi no tratamento sem aplicação de *B. subtilis* BV02 (Tabela 2). O acréscimo na produtividade foi de 24% quando se utilizou apenas produto à base de cobre em relação à testemunha.

Em relação à comparação de todos os tratamentos contendo *B. subtilis* BV02, isolado ou associado ao cobre, com o composto pela aplicação da associação [azoxistrobina + benzovindiflupir] + mancozebe, verifica-se que o *B. subtilis* BV02 isolado, nas doses de 1,0 e 2,0 L p.c. ha⁻¹, *B. subtilis* BV02 (2,0 L p.c. ha⁻¹) associado ao cobre, bem como produto à base de cobre isolado, apresentaram produtividade superior tratamento com uso de fungicidas químicos. No entanto, o *B. subtilis* BV02 na maior dose (4,0 L p.c. ha⁻¹), independentemente da associação com cobre, apresentou menor produtividade em relação ao tratamento químico.

Nas Figuras 2, 3 e 4 estão apresentados, respectivamente os resultados das avaliações da severidade e da AACPD, bem como de produtividade de grãos, levando em consideração o comportamento do fator doses de *B. subtilis* BV02 avaliadas. Para severidade de ferrugem asiática, independentemente da época em que a avaliação foi realizada, verifica-se que todas as doses de *B. subtilis* BV02, quando o produto foi aplicado isoladamente, proporcionaram redução dos sintomas. Provavelmente, tal comportamento pode ser atribuída ação dos lipopeptídeos (fengicinas, iturinas e surfactinas) presentes no *Bacillus* sp. e que comprovadamente atuam no controle de doenças (18). Na última avaliação de severidade (92 DAE) não foi observado efeito significativo das doses de *B. subtilis* BV02 influenciando esta variável-resposta, seja para aplicação deste microrganismo isolada ou associada ao cobre.

Em nenhuma das avaliações foi observado efeito das doses de *B. subtilis* BV02, quando aplicado em associação com produto à base de cobre, influenciando a severidade de ferrugem asiática, o que expressa nesta situação que não há benefícios de redução na severidade da doença com o aumento de dose do biocontrole quando se adiciona o micronutriente (Figura 2). Em relação ao efeito dos fungicidas químicos, verifica-se em todas as avaliações menores valores de severidade de ferrugem asiática em comparação com os demais tratamentos.

Ao longo de todas as avaliações de AACPD, o comportamento observado em relação ao incremento de dose de *B. subtilis* BV02, em aplicações isoladas, foi semelhante, havendo redução na evolução dos sintomas da ferrugem asiática em todas as doses aplicadas do agente de biocontrole quando comparadas à testemunha (Figura 3). Estes resultados indicam potencial de inserção do *B. subtilis* BV02 em programas de manejo integrado de doenças na soja.

Ainda em relação à avaliação de AACPD de ferrugem asiática,

Tabela 2. Severidade e AACPD da ferrugem asiática e produtividade de grãos de soja submetida a aplicação de doses crescentes *B. subtilis* BV02 isolado e associado ao cobre

<i>B. subtilis</i> BV02 (L p.c. ha ⁻¹)	Severidade - 69 DAE (%)				Severidade - 76 DAE (%)			
	Sem cobre		Com cobre		Sem cobre		Com cobre	
0,0	4,43	b ⁽⁺⁾	1,87	a ⁽⁺⁾	6,94	a ⁽⁺⁾	6,47	a ⁽⁺⁾
0,5	3,73	a ⁽⁺⁾	2,09	a ⁽⁺⁾	4,36	b ⁽⁺⁾	1,58	a
1,0	2,31	a ⁽⁺⁾	1,53	a ⁽⁺⁾	6,26	b ⁽⁺⁾	2,28	a ⁽⁺⁾
2,0	3,27	a ⁽⁺⁾	1,79	a ⁽⁺⁾	3,86	a ⁽⁺⁾	3,83	a ⁽⁺⁾
4,0	1,39	a ⁽⁺⁾	1,78	a ⁽⁺⁾	4,68	a ⁽⁺⁾	2,64	a ⁽⁺⁾
Químico	0,79 (±0,20)				1,42 (±0,44)			
CV (%)	56,44				33,03			
	Severidade - 85 DAE (%)				Severidade - 92 DAE (%)			
	Sem cobre		Com cobre		Sem cobre		Com cobre	
0,0	21,73	b ⁽⁺⁾	10,94	a ⁽⁺⁾	29,85	b ⁽⁺⁾	17,25	a ⁽⁺⁾
0,5	16,16	b ⁽⁺⁾	9,28	a ⁽⁺⁾	15,88	a ⁽⁺⁾	12,95	a ⁽⁺⁾
1,0	10,84	a ⁽⁺⁾	8,45	a ⁽⁺⁾	27,96	b ⁽⁺⁾	13,70	a ⁽⁺⁾
2,0	12,72	a ⁽⁺⁾	9,47	a ⁽⁺⁾	22,40	a ⁽⁺⁾	17,81	a ⁽⁺⁾
4,0	11,46	a ⁽⁺⁾	11,69	a ⁽⁺⁾	23,66	a ⁽⁺⁾	25,01	a ⁽⁺⁾
Químico	4,92 (±1,82)				4,72 (±2,32)			
CV (%)	33,52				33,07			
	AACPD - 69 DAE (%)				AACPD - 76 DAE (%)			
	Sem cobre		Com cobre		Sem cobre		Com cobre	
0,0	39,77	b ⁽⁺⁾	29,19	a ⁽⁺⁾	100,35	b ⁽⁺⁾	60,93	a ⁽⁺⁾
0,5	28,32	b ⁽⁺⁾	12,83	a ⁽⁺⁾	71,82	b ⁽⁺⁾	38,00	a ⁽⁺⁾
1,0	30,02	b ⁽⁺⁾	13,33	a ⁽⁺⁾	59,88	b ⁽⁺⁾	37,55	a ⁽⁺⁾
2,0	24,93	a ⁽⁺⁾	19,67	a ⁽⁺⁾	58,01	a ⁽⁺⁾	46,55	a ⁽⁺⁾
4,0	21,22	a ⁽⁺⁾	15,47	a ⁽⁺⁾	56,45	a ⁽⁺⁾	50,17	a ⁽⁺⁾
Químico	7,72 (±1,81)				22,17 (±6,09)			
CV (%)	28,63				25,66			
	AACPD - 85 DAE (%)				AACPD - 92 DAE (%)			
	Sem cobre		Com cobre		Sem cobre		Com cobre	
0,0	180,53	b ⁽⁺⁾	98,66	a ⁽⁺⁾	320,65	b ⁽⁺⁾	188,78	a ⁽⁺⁾
0,5	112,11	a ⁽⁺⁾	77,81	a ⁽⁺⁾	212,25	b ⁽⁺⁾	128,63	a ⁽⁺⁾
1,0	135,80	b ⁽⁺⁾	77,53	a ⁽⁺⁾	225,69	b ⁽⁺⁾	128,41	a ⁽⁺⁾
2,0	122,92	a ⁽⁺⁾	95,47	a ⁽⁺⁾	205,85	a ⁽⁺⁾	161,69	a ⁽⁺⁾
4,0	122,89	a ⁽⁺⁾	128,47	a ⁽⁺⁾	200,57	a ⁽⁺⁾	194,12	a ⁽⁺⁾
Químico	33,73 (±10,55)				63,62 (±12,62)			
CV (%)	23,45				19,36			
	Produtividade (kg ha ⁻¹)							
	Sem cobre				Com cobre			
0,0	1957,25		b		2428,66		a ⁽⁺⁾	
0,5	1945,26		a		2098,14		a	
1,0	2193,39		a ⁽⁺⁾		2071,34		a	
2,0	2263,76		a ⁽⁺⁾		2197,21		a ⁽⁺⁾	
4,0	1918,81		a ⁽⁻⁾		1884,45		a ⁽⁻⁾	
Químico	2040,76 (±99,41)							
CV (%)	9,79							

⁽⁺⁾; ⁽⁻⁾ Média superior e inferior, respectivamente, ao tratamento químico pelo intervalo de confiança ($p \leq 0,05$). * Médias seguidas por letras distintas na linha diferem entre si pelo teste F ($p \leq 0,05$).

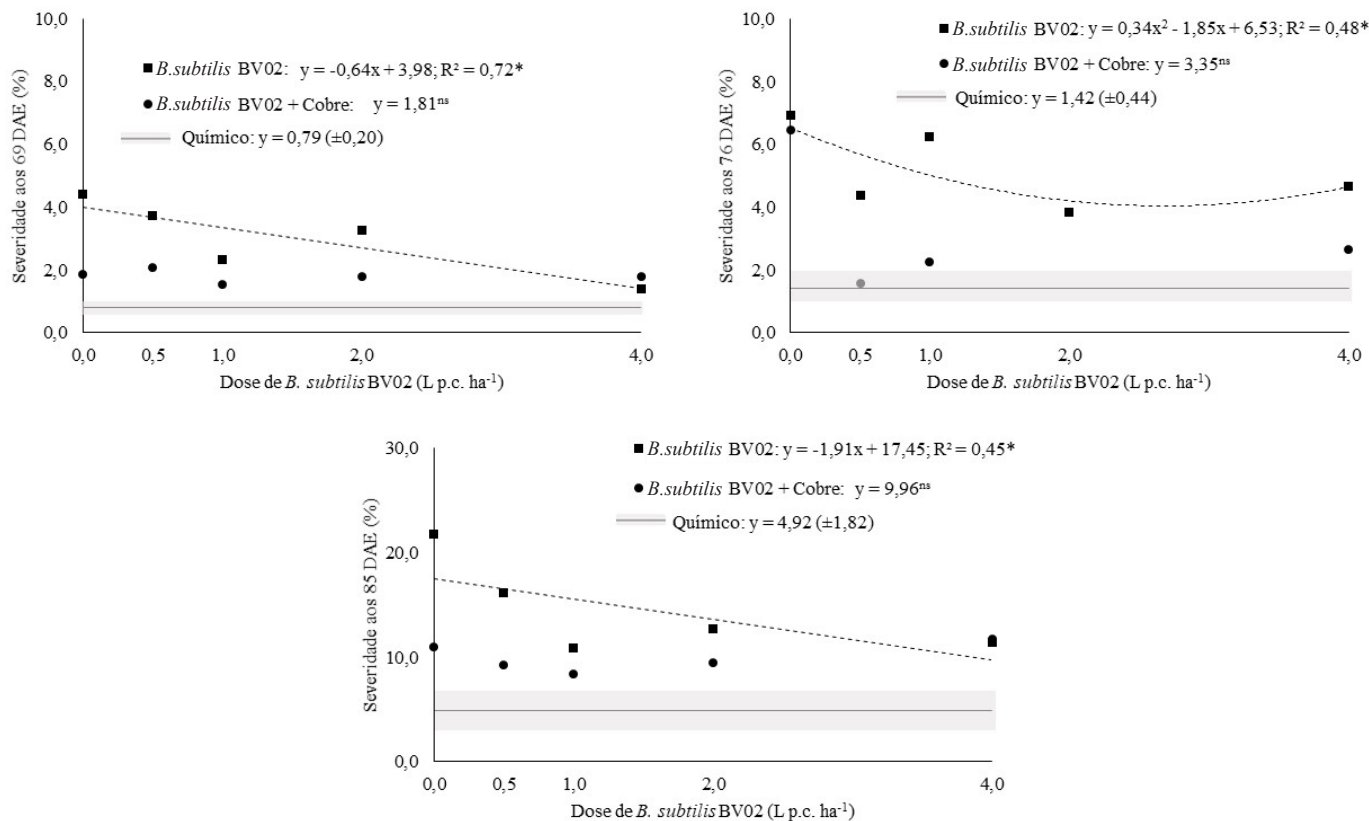


Figura 2. Severidade de ferrugem asiática em plantas de soja submetidas a aplicação de doses crescentes *B. subtilis* BV02 isolado e associado ao cobre

* Equação significativa ($p \leq 0,05$). Químico: sobreposição na área sombreada indicada semelhança estatística para a dose utilizada por intervalo de confiança ($p \leq 0,05$).

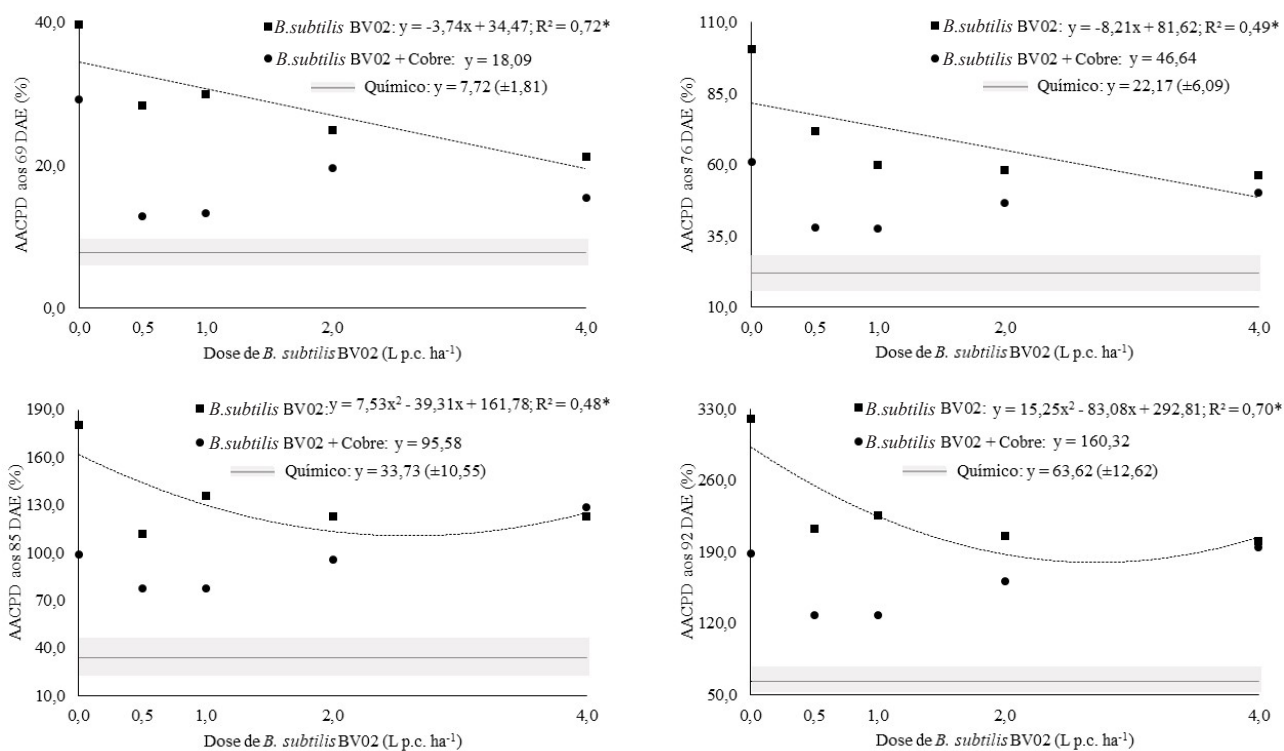


Figura 3. AACPD de ferrugem asiática em plantas de soja submetidas a aplicação de doses crescentes *B. subtilis* BV02 isolado e associado ao cobre

* Equação significativa ($p \leq 0,05$). Químico: sobreposição na área sombreada indicada semelhança estatística para a dose utilizada por intervalo de confiança ($p \leq 0,05$).

verifica-se que quando se procede a associação do *B. subtilis* BV02 ao produto à base de cobre, o fator dose do agente de biocontrole passa a ser indiferente, uma vez que em nenhuma das épocas de avaliação foi observado ajustes de modelos que expliquem o comportamento dos tratamentos influenciando a variável-resposta analisada. Para o tratamento com aplicação de fungicidas, verifica-se que este foi o que apresentou menores valores de AACPD ao longo das quatro avaliações quando comparado aos demais tratamentos.

Os dados de produtividade de soja influenciados pelas doses de *B. subtilis* BV02 aplicadas isoladas ou em associação com produto à base de cobre estão apresentados na Figura 4. Em relação ao *B. subtilis* BV02 isolado, não foi verificado efeito direto na produtividade da soja em função do acréscimo de dose aplicada, observando valor de produtividade equivalente a 2055,69 kg ha⁻¹ na média de todas as doses avaliadas.

Quando se procedeu a aplicação de *B. subtilis* BV02 associado ao produto à base de cobre, verificou-se tendência de redução na produtividade de soja à medida que se procedeu o incremento de dose aplicada. Este comportamento indica que visando associar *B. subtilis* BV02 ao cobre para programas de manejo de doenças na soja, ajustes de dose são necessários, uma vez que o aumento de concentração do agente de biocontrole aplicado, conjuntamente com o micronutriente, proporcionou efeito deletério na produtividade da cultura.

Em relação à aplicação exclusiva de fungicidas para o manejo de doenças na soja, verifica-se que a média de produtividade deste tratamento foi de 2040,76 kg ha⁻¹, não havendo diferenças estatísticas deste quando comparado com *B. subtilis* BV02 aplicado isolado na dose de 0,5 L p.c. ha⁻¹, bem como do *B. subtilis* BV02 associado ao cobre nas doses de 0,5 e 1,0 L p.c. ha⁻¹ (Figura 4). Por outro lado, os tratamentos compostos pela aplicação isolada de *B. subtilis* BV02 nas doses de 1,0 e 2,0 L p.c. ha⁻¹, bem como tratamento com aplicação apenas de produto à base de cobre e deste micronutriente associado ao *B. subtilis* BV02 na dose de 2,0 L p.c. ha⁻¹, proporcionaram acréscimo de produtividade em comparação ao tratamento com aplicação de fungicidas.

Experimento em laboratório

Na avaliação de germinação dos esporos no ensaio *in vitro*, seis horas após a exposição, as doses de 2,0 e 4,0 L p.c. ha⁻¹ de *B. subtilis* BV02 combinado ao produto à base de cobre obtiveram os melhores índices de redução, apresentando controle de 94% em relação à testemunha, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos, inclusive da testemunha química (Figura 5).

Os tratamentos *B. subtilis* BV02 e produto à base de cobre apresentaram melhor índice de controle quando aplicados em associação do que quando utilizados isoladamente, podendo-se afirmar um possível efeito aditivo dos tratamentos. Além disso, o tratamento composto pelo micronutriente isolado (produto à base de cobre) apresentou maior eficiência no experimento realizado em condições controladas do que no trabalho desenvolvido à campo. Neste caso, ao que tudo indica, os esporos tiveram um contato prolongado e direto com o produto, favorecendo sua ação de controle. No caso dos tratamentos com *B. subtilis* BV02, propõe-se que há uma ação indireta no manejo, com proteção no filopiano da planta e/ou indução de resistência, e uma ação direta sobre os urediniósporos, atrasando e/ou impedindo sua germinação.

Com base nos resultados, a utilização de produtos biológicos (*B. subtilis* BV02) com ação de multissítios e inorgânicos (produtos à base de cobre) são alternativas na estratégia de prevenção da resistência em *P. pachyrhizi* à fungicidas na soja, pois além de diminuir a severidade de doença, quando comparadas à testemunha, também atuam na indução de resistência (6). Contudo, tais estratégias devem ser consideradas como ferramentas para manejo integrado de doenças e são fundamentais para manutenção do sistema de cultivo produtivo da soja e sustentável ao longo dos anos.

O aumento de dose de *B. subtilis* BV02, aplicado isoladamente, proporciona reduções na severidade de ferrugem asiática da soja;

A aplicação de doses crescentes de *B. subtilis* BV02 em associação com produto à base de cobre não reduz a severidade da doença;

A associação entre *B. subtilis* BV02 e produto à base de cobre apresenta melhores resultados quando utilizadas doses iguais ou inferiores a 1,0 L p.c. ha⁻¹ do agente de biocontrole;

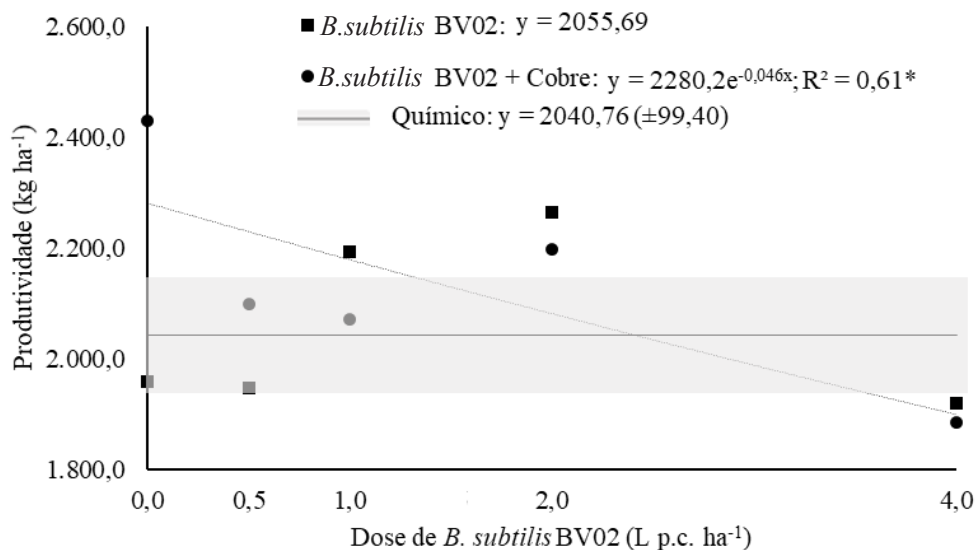


Figura 4. Produtividade de soja submetida a aplicação de doses crescentes *B. subtilis* BV02 isolado e associado ao cobre

* Equação significativa ($p \leq 0,05$). Químico: sobreposição na área sombreada indicada semelhança estatística para a dose utilizada por intervalo de confiança ($p \leq 0,05$).

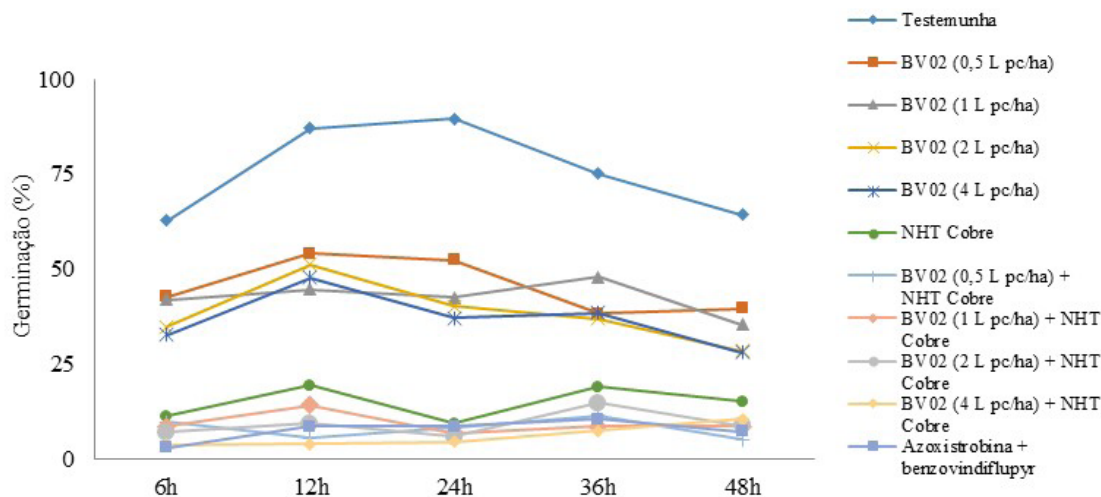


Figura 5. Avaliação da germinação de esporos de *P. pachyrhizi* em diferentes períodos de exposição aos tratamentos contendo doses crescentes *B. subtilis* BV02 isolado e associado ao cobre

A produtividade de grãos da soja foi superior ao tratamento contendo fungicidas com a utilização de *B. subtilis* BV02 isolado nas doses de 1,0 e 2,0 L p.c. ha⁻¹, com aplicação apenas de produto à base de cobre e com utilização deste micronutriente em associação ao *B. subtilis* BV02 na dose de 2,0 L p.c. ha⁻¹.

AGRADECIMENTOS

À Universidade de Rio Verde, pela disponibilização de recursos financeiros por meio do Edital de Bolsa Pesquisador. À Vittia pela cessão dos produtos utilizados no presente trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves, V.M.; Juliatti, F.C. Fungicidas no manejo da ferrugem da soja, processos fisiológicos e produtividade da cultura. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.44, n.3, p.245-251, 2018.
- Andersen, E.J.; Ali, S.; Byamukama, E.; Yen, Y.; Nepal, M.P. Disease resistance mechanisms in plants. **Genes**, Basel, v.9, n.7, e339, 2018.
- Araújo, F.F.; Menezes, D. Indução de resistência a doenças foliares em tomateiro por indutores biótico (*Bacillus subtilis*) e abiótico (acibenzolar-s-metil). **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.35, n.3, p.169-172, 2009.
- Artuzo, F.D.; Foguesatto, C.R.; Souza, A.R.L.; Silva, L.X. Gestão de custos na produção de milho e soja. **Revista Brasileira de Gestão de Negócios**, São Paulo, v.20, n.2, p.273-294, 2018.
- Bigaton, D.; Bacchi, L.M.A.; Formagio, A.S.N.; Gavassoni, W.L.; Zanella, C.S. Avaliação da atividade fungicida de extratos e óleos essenciais sobre ferrugem asiática da soja. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v.44, n.4, p.757-763, 2013.
- Borges, N.O.; Solino, A.J.S.; Franciscchini, R.; Campos, H.D.; Oliveira, J.S.B.; Schwan-Estrada, K.R.F. Induction of soybean resistance mechanisms to anthracnose by biocontrol agents. **Revista Caatinga**, Mossoró, v.35, n.2, p.265 – 275, 2022.
- Bruzamarello, J.; Franceschi, V.T.; Dalacosta, N.L.; Gonçalves, I.; Mazaro, S.M.; Reis, E. Potencial de fosfitos na indução da resistência em plantas de soja. **Cultura Agronômica**, Ilha Solteira, v.27, n.3, p.263-273, 2018.
- EMBRAPA SOJA. **Tecnologias de produção de soja**: Região Central do Brasil, 2011. Londrina: embrapa Soja, 2010. 247p.
- Ferreira, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.35, n.6, p.1039-1042, 2011.
- Fiallos, F.R.G.; Forcelini, C.A. Progresso temporal da ferrugem e redução sobre a área foliar e os componentes do rendimento de grãos em soja. **Acta Agronômica**, Palmira, v.60, n.2, p.147-157, 2011.

- Godoy, C.V.; Flausino, A.M.; Santos, L.C.M.; Del Ponte, E.M. Eficiência do controle da ferrugem asiática da soja em função do momento de aplicação sob condições de epidemia em Londrina, PR. **Tropical Plant Pathology**, Viçosa, v.34, n.1, p.56-61, 2009.
- Godoy, C.V.; Koga, L.J.; Canteri, M.G. Diagrammatic scale for assessment of soybean rust severity. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.31, n.1, p.63-68, 2006.
- Kawashima, C.G.; Guimarães, G.A.; Nogueira, S.R.; MacLean, D.; Cook, D.R.; Steuernagel, B.; Baek, J.; Bouyioukos, C.; Melo, B.V.A.; Tristão, G.; Oliveira, J.C.; Rauscher, G.; Mittal, S.; Panichelli, L.; Bacot, K.; Johnson, E.; Iyer, G.; Tabor, G.; Wulff, B.B.H.; Ward, E.; Rairdan, G.J.; Broglie, K.E.; Wu, G.; Esse, H.P.; Jones, J.D.G.; Brommonschenkel, S.H. A pigeonpea gene confers resistance to Asian soybean rust in soybean. **Nature Biotechnology**, Londres, v.34, n.6, p.661-665, 2016.
- Klosowski, A.C.; May de Mio, L.L.; Miessner, S.; Rodrigues, R.; Stammler, G. Detection of the F129L mutation in the cytochrome b gene in *Phakopsora pachyrhizi*. **Pest Management Science**, Nova Jersey, v.72, p.1211-1215, 2016.
- Lanna Filho, R.; Ferro, H.M.; Pinho, R.S.C. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas**, Chapadinha, v.4, n.2, p.12-20, 2010.
- Melo, C.L.P.; Roese, A.D.; Goulart, A.C.P. Tolerância de genótipos de soja à ferrugem-asiática. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.45, n.8, p.1353-1360, 2015.
- MONSOY. **Variedades: M7739 IPRO**. São Paulo: Monsoy, 2020. Disponível em: <http://www.monsoy.com.br/variedades_2_monsoy/m7739-ipro/>. Acesso em: 23 maio 2020.
- Ongena, M.; Jacques, M. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v.16, n.3, p.115-125, 2008.
- Reis, E.M.; Reis, A.C.; Zanatta, M. Reflexo econômico e desenvolvimento da resistência de *Phakopsora pachyrhizi* a fungicidas em função do número de aplicações. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.44, n.3, p.289-292, 2018.
- Rios, F.A.; Schwan, K.R.F.E.; Contiero, R.L.; Braz, G.B.P.; Roman, R.; Belani, R.B.; Catapan, V. Agronomic performance of soybean treated with *Bacillus amyloliquefaciens*. **African Journal of Microbiology Research**, Lagos, v.12, n.45, p.1020-1027, 2018.
- Schmitz, H.K.; Medeiros, A.C.; Craig, I.R.; Stammler, G. Sensitivity of *Phakopsora pachyrhizi* towards quinone-oxidase-inhibitors and demethylation-inhibitors, and corresponding resistance mechanisms. **Pest Management Science**, Nova Jersey, v.7, p.378-88, 2014.
- Simões, K.; Hawlik, A.; Rehfus, A.; Gava, F.; Stammler, G. First detection of a SDH variant with reduced SDHI sensitivity in *Phakopsora pachyrhizi*. **Journal of Plant Diseases and Protection**, Brunsvique, v.125, p.21-26, 2018.

23. WEATHERBASE. **Rio Verde, Goiás**. Great Falls: Wheaterbase, 2019. Disponível em: <<https://www.weatherbase.com/weather/weather.php3?s=597703&cityname=Rio-Verde-Goias-Brazil>>. Acesso em: 20 jul. 2020.
24. Yorinori, J.T.; Paiva, W.M.; Frederick, R.D.; Costamilan, L.M.; Bertagnolli, P.F.; Hartman, G.E.; Godoy, C.V.; Nunes Jr., J. Epidemics of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Brazil and Paraguay from 2001 to 2003. **Plant Disease**, Saint Paul, v.89, n.6, p.675-677, 2005.

Editor associado para este artigo: Wagner Bettiol