



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ANDRÉ RIEDI BARAZETTI

**AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE BIOPRODUTOS E DA
INOCULAÇÃO MICORRÍZICA NO CONTROLE DA
FERRUGEM ASIÁTICA DA SOJA E NO DESEMPENHO DA
CULTURA**

Londrina
2020

ANDRÉ RIEDI BARAZETTI

**AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE BIOPRODUTOS E DA
INOCULAÇÃO MICORRÍZICA NO CONTROLE DA
FERRUGEM ASIÁTICA DA SOJA E NO DESEMPENHO DA
CULTURA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Galdino Andrade Filho

Londrina
2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

A555 Barazetti, André .
AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE BIOPRODUTOS E DA INOCULAÇÃO MICORRÍZICA NO CONTROLE DA FERRUGEM ASIÁTICA DA SOJA E NO DESEMPENHO DA CULTURA / André Barazetti. - Londrina, 2020.
82 f. : il.

Orientador: Galdino Andrade.
Tese (Doutorado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2020.
Inclui bibliografia.

1. Compostos naturais - Tese. 2. Rhizophagus clarus - Tese. 3. Phakopsora pachyrhizi. - Tese. 4. Metabólitos - Tese. I. Andrade, Galdino. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

CDU 579

ANDRÉ RIEDI BARAZETTI

**AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE BIOPRODUTOS E DA
INOCULAÇÃO MICORRÍZICA NO CONTROLE DA
FERRUGEM ASIÁTICA DA SOJA E NO DESEMPENHO DA
CULTURA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Microbiologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Galdino Andrade Filho
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Luciana Grange
Universidade Federal do Paraná – UFPR

Profa. Dra. Martha Viviana Torres Cely
Universidade Federal do Mato Grosso – UFMT

Prof. Dr. Miguel Octávio Pérez Navarro
Universidade Nacional da Colombia – UNAL

Prof. Dr. Marcelo Giovanetti Canteri
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 27 de novembro de 2020.

Dedico este trabalho a minha mãe Silvani, por acreditar neste sonho e sempre incentivar.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Galdino Andrade, por me acolher em sua equipe, por acreditar e me incentivar ao longo dessa empreitada.

A Profa. Dra. Martha Viviana Torres Cely, minha mestra, por todos os ensinamentos passados, pela paciência, pelos conselhos, por patilhar momentos de alegria e de trabalho, e por fazer parte deste momento de conclusão de mais uma etapa.

A Profa. Dra. Bárbara Gionco Cano, por todas as sugestões que contribuem para o enriquecimento deste trabalho.

A Profa. Dra. Denise Brentan da Silva e ao Laboratório de Produtos Naturais e Espectrometria de Massas pelo auxílio com a análise metabolômica e processamento dos dados obtidos.

A minha querida amiga Ane, pela incrível pessoa que é sempre disposta a ajudar, compartilhar ideias, por estar presente nos momentos de trabalho, nas horas de lazer, nas comemorações, uma pessoa que admiro e respeito.

Ao meu amigo Igor, com quem tive o prazer de discutir ideias, estudar, se divertir, além de ter ajudado muito em todas as etapas do nosso projeto.

A todos os membros do Laboratório de Ecologia Microbiana, em especial, Miguel, Matheus, Erika, Fluvio, Janaina, Kathlen, Leandro, Mickely, Martha.

Ao Departamento de Microbiologia e a Universidade Estadual de Londrina pela formação.

A CAPES, pelo apoio financeiro que permitiu o desenvolvimento desse trabalho.

“O desejo profundo da humanidade pelo conhecimento é justificativa suficiente para nossa busca contínua.”

(Stephen Hawkin)

APRESENTAÇÃO

O presente trabalho de tese foi dividido em dois artigos. O artigo I intitulado “Evaluation of Bioproducts and Mycorrhizal Inoculation in Asian Soybean Rust Control, Nutrient Leaf Contents and Yield Under Field Conditions” foi publicado em formato de capítulo no livro *Microbial Probiotics for Agricultural Systems*, Springer, doi:10.1007/978-3-030-17597-9_13. O artigo II, intitulado: “Indução de resistência por bioativos de *Pseudomonas aeruginosa* cepa LV no manejo (ou controle) da Ferrugem Asiática da Soja”, está no modelo da revista *New Phytologist*.

BARAZETTI, André Riedi. **Avaliação da eficiência de bioprodutos e da inoculação micorrízica no controle da ferrugem asiática da soja e no desempenho da cultura.** 2020. 74 f. Tese de Doutorado em Microbiologia – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

RESUMO

A soja é a principal cultura no Brasil, no entanto seu cultivo é prejudicado pela Ferrugem Asiática da Soja (FAS), doença causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*, que pode levar a perda de plantas inteiras. Para que altas produtividades sejam atingidas uma série de manejos são realizados, dentre eles o uso de defensivos agrícolas e fertilizantes minerais. Apesar de trazer benefícios, essas medidas também causam uma série de impactos ambientais e à saúde, como seleção de microrganismos resistentes e contaminação do solo, água subterrânea e rios. Para contornar esses problemas uma alternativa é a pesquisa de novos compostos de origem natural com potencial antimicrobiano e utilização de inoculantes agrícolas para melhor aproveitamento dos nutrientes do solo. Bactérias do gênero *Pseudomonas* sp. possuem grande potencial de produção de metabólitos secundários, do mesmo modo, fungos micorrízicos arbusculares (FMA) são conhecidos por desenvolverem associações simbióticas com raízes de plantas e auxiliarem na absorção de nutrientes do solo, em especial o fósforo. Os objetivos desse trabalho foram avaliar a utilização da fração F4A, produzida pelo metabolismo secundário da cepa de *P. aeruginosa* LV, no controle biológico e na indução de resistência da FAS e, seus efeitos na morfologia e na colonização rizosférica do FMA *Rhizophagus clarus* bem como no desenvolvimento agrônomo da cultura da soja. Sementes foram inoculadas com o FMA e semeadas em área experimental da fazenda escola da Universidade Estadual de Londrina, Brasil. Após os primeiros sintomas da FAS as plantas foram tratadas com duas concentrações da fração semi-purificada F4A ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $10 \mu\text{g mL}^{-1}$), misturadas ou não com fungicidas comerciais (Unizeb Gold® ou Sphere Max®). Após 24 horas de aplicação, folhas foram colhidas e preparadas para avaliação. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia óptica (MO) revelaram alterações ultraestruturais em hifas e esporos de *P. pachyrhizi*, similarmente aos fungicidas comerciais. A colonização micorrízica, massa seca, altura e produtividade foram maiores nas plantas tratadas com F4A $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ e F4A 1 e $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ + Sphere max®. Através de análise metabolômica foi possível observar que nas plantas tratadas com F4A 1 e $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ e nas plantas tratadas com Sphere max® houve incremento na produção flavonóides, compostos com propriedades antioxidantes, possivelmente uma resposta da planta à produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) induzidas pela aplicação de fenazinas, presentes na fração F4A.

Palavras-chave: compostos naturais; *Rhizophagus clarus*; *Phakopsora pachyrhizi*; associação mutualística; metabólitos.

BARAZETTI, André Riedi. **Efficiency evaluation of bioproducts and mycorrhizal inoculation to control asian soybean rust and crop performance.** 2020. 74 p. Thesis (PhD in Microbiology) - State University of Londrina, Londrina, 2020.

ABSTRACT

Soybean is the Brazil main crop, however its is affected by Asian Soybean Rust (ASR), a disease caused by the fungus *Phakopsora pachyrhizi*, which can lead to the loss of entire plantations. In order for achieved high yields, a series of managements are carried out, including the pesticides and mineral fertilizers use. Despite bringing benefits, these measures also cause a series of environmental and health impacts, such as selection of resistant microorganisms and soil and river contamination. To overcome these problems, a solution is to search for new compounds of natural origin with antimicrobial potential and agricultural inoculants use for better soil nutrients utilization. Bacteria of the *Pseudomonas* genus have a great potential for secondary metabolites production with these characteristics, in the same way, arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) are known to develop associations with plant roots and assist in the soil nutrients absorption, especially phosphorus. The objectives of this work were to evaluate the use of the F4A fraction, produced by the secondary metabolism of the *P. aeruginosa* LV strain, in the biological control and resistance induction of FAS, and its effects on the rhizospheric morphology and colonization of FMA *Rhizophagus clarus* as well as in the agronomic development of the soybean crop. Seeds were inoculated with the FMA and sown in an experimental area of the school farm at the State University of Londrina, Brazil.. The seeds were inoculated with the FMA and sown. After the first symptoms of ASR, the plants were treated with two concentrations of the semi-purified fraction F4A (1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$), mixed or not with commercial fungicides (Unizeb Gold® or Sphere Max®). 24 hours after application, leaves were harvested and prepared for evaluation. Scanning electron microscopy (SEM) and optical microscopy images revealed ultrastructural changes in hyphae and spores of *P. pachyrhizi*, similar to commercial fungicides. Mycorrhizal colonization, growth, height and yield were higher in plants treated with F4A 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and F4A 1 and 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ + Sphere max®. In addition, through metabolomic analysis it was possible to observe in plants treated with F4A 1 and 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, and plants treated with Sphere max® that there was an increase in flavonoid production, compounds with antioxidant properties, possibly a response of the plant to production reactive oxygen species (ROS) induced by the application of phenazines present in the F4A fraction.

Keywords: natural compounds; *Rhizophagus clarus*; *Phakopsora pachyrhizi*; mutualistic association; metabolites

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Folha de soja infectado com *Phakopsora pachyrhizi*. Em destaque urédias contendo esporos (2000x)..... 19

ARTIGO I

- Fig. 13.1** – Area under the disease progress curve of treatments for Asian soybean rust, field conditions 50
- Fig. 13.2** – Light microscopy images of *Phakopsora pachyrhizi* spore development under different F4A doses. Treatments are: control (a), F4A at 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (b), F4A at 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (c) and F4A at 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ 50
- Fig. 13.3** – Scanning electron microscopy images of soybean leaf's infected with *Phakopsora pachyrhizi* under different treatments. Treatments are: control (a), Uni + Sphe (b), F4A1 (c), F4A1 + Uni (d), F4A1 + Sphe (e), F4A10 (f), F4A10 + Uni (g) and F4A10 + Sphe (h). Scale bars: 200 μm (insights magnification = 4 \times) 51

ARTIGO II

- Figura 1** – Análise metabolômica de folhas de soja infectadas com *P. pachyrhizi* após diferentes tratamentos. (A) Dendograma ilustrando a diferença entre os tempos de amostragem A1 e A2. (B) Análise dos componentes principais entre A1 e A2..... 72
- Figura 2** – Análise metabolômica de folhas de soja infectadas com *P. pachyrhizi* após diferentes tratamentos. (A) Dendograma ilustrando a diferença entre os tratamentos na amostragem A1. (B) Dendograma ilustrando a diferença entre os tratamentos na amostragem A2..... 73
- Figura 3** – Análise dos componentes principais da amostragem A2 de folhas de soja infectadas com *P. pachyrhizi* após diferentes tratamentos 74
- Figura 4** – Dendograma ilustrando a diferença entre os tratamentos Unizeb gold® + Sphere max® e F4A10 + Sphere max® nas amostragens A1 e A2 75
- Figura 5** – Heatmap dos componentes principais identificados de Unizeb gold® + Sphere max® e F4A10 + Sphere max® nas amostragens A1 e A2 76

Figura 6 – Análise dos componentes principais entre os tratamentos F4A10 e F4A10 + Sphere max® na amostragem A2.....	77
Figura 7 – Heatmap dos componentes principais identificados de F4A10 e F4A10 + Sphere max® na amostragem A2.....	78
Figura 8 – Dendograma ilustrando a diferença entre os tratamentos F4A1 e F4A10 nas amostragens A1 e A2	79
Figura 9 – Heatmap dos componentes principais identificados de F4A1 e F4A10 nas amostragens A1 e A2.....	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Molécula de Fenazina e seus diferentes radicais.....27

ARTIGO I

Table 13.1 –Parameters evaluated under field conditions per treatment: Arbuscular mycorrhizal colonization (AM); nitrogen and phosphorus foliar contents; seed proteins; plant height and shoot dry weight; yield49

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	14
2.	DESENVOLVIMENTO	16
2.1.	AGRICULTURA NO BRASIL.....	16
2.2.	CULTURA DA SOJA	16
2.3.	FERRUGEM ASIÁTICA DA SOJA.....	17
2.3.1.	Triazóis.....	19
2.3.2.	Estrobilurinas.....	20
2.3.3.	Carboxamidas	20
2.4.	PANORAMA DA UTILIZAÇÃO DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS NO BRASIL E NO MUNDO	21
2.5.	BIOATIVOS MICROBIANOS.....	22
2.6.	<i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> CEPA LV.....	23
2.7.	F4A: COMPOSTOS	26
2.7.1.	PCA	26
2.7.2.	PCN.....	27
2.7.3.	Indolinona.....	28
2.7.4.	Fluopcina C	28
2.8.	INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA	29
2.9.	FMA E INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA	31
2.10.	FMA E FÓSFORO	32
2.11.	PANORAMA DA UTILIZAÇÃO DE FERTILIZANTES NO BRASIL E NO MUNDO.....	34
3.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
4.	ARTIGO I	44
5.	ARTIGO II	57
6.	CONCLUSÕES	82

1. INTRODUÇÃO

A demanda alimentar cresce paralelamente ao crescimento populacional e isso implica necessariamente em aumento de produtividade agrícola, através do cultivo de grãos destinados a alimentação humana e principalmente à produção de ração animal. O Brasil é o quinto maior país em extensão territorial e também um dos maiores produtores agrícolas do mundo, podendo contribuir consideravelmente para que essa demanda seja atendida (CONAB, 2019). Entre as principais culturas do país a soja é a que apresenta maior destaque no cenário mundial, no entanto, doenças causadas por bactérias, fungos, insetos e nematóides podem impactar negativamente seu cultivo. Dentre essas doenças a Ferrugem Asiática da Soja (FAS), causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*, causa maiores danos. Pela sua ampla incidência a FAS pode levar a perdas de até 90% de produtividade em condições favoráveis ao fungo (Langenbach et al., 2016).

Com o uso de defensivos agrícolas a produtividade é consideravelmente otimizada, no entanto, o uso de forma indiscriminada, gera uma série de problemas, de natureza ambiental como contaminação do solo, água e ar, seleção de estirpes resistentes gerando problemas de natureza clínica, acarretando em problemas neurológicos, fisiológicos, cardiorespiratórios e gastrointestinais (Godoy et al., 2009; Godoy et al., 2016).

Atualmente os fungicidas comumente utilizados para o controle da FAS possuem basicamente três modos de ação: através de inibidores de desmetilação (IDM, triazóis), inibidores externos de quinona (IQe, estrobilurina) e inibidores da succinato desidrogenase (ISDH, carboxamida), no entanto, o fungo *P. pachyrhizi* apresenta perfil de resistência aos mesmos (Godoy, 2011; Klosowski et al., 2016; Schmitz et al., 2014).

Devido a estes problemas novas tecnologias mais eficientes e sustentáveis tem sido pesquisadas e desenvolvidas. O uso de microrganismos vivos ou de seus metabólitos por exemplo, são alternativas muito estudadas nas últimas décadas, sendo capazes de competir com patógenos via antagonismo, indução de resistência na planta ou ainda via inibição de quórum sensing (Wright, 2017).

Dentre esses microrganismos, bactérias do gênero *Pseudomonas* são umas das mais promissoras. Habitantes comuns dos solos, com ampla distribuição, sobretudo em ambientes úmidos, possuem capacidade ampla de produzir metabólitos secundários com ação antimicrobiana contra uma série de patógenos. Algumas cepas produzem compostos antibióticos, antiparasíticos, antitumorais e antifúngicos, como por exemplo: fenazinas, indolinonas, peptídeos, glicopeptídeos, lipídios e compostos alifáticos (Oliveira et al., 2016;

Simionato et al., 2017).

Em resposta ao contato com esses compostos é comum que haja acúmulo de ácido salicílico na planta, seguido da produção de espécies reativas de oxigênio. Em um segundo momento pode haver ainda indução da resistência sistêmica adquirida (RSA) via acúmulo de proteínas relacionadas a patogênese (PR – *proteins*), ou ainda resistência sistêmica induzida (RSI), via acúmulo de ácido jasmônico (AJ) e etileno (Chen *et al.*, 1993; Fritig *et al.*, 1998; Van Loon & Van Strien 1999; Compant *et al.*, 2005; Choudhary *et al.*, 2007).

Outro fator que contribui para o incremento na produtividade é a utilização de fertilizantes químicos, principalmente formulações a base de nitrogênio, fósforo e potássio.

O fósforo em especial, é considerado um nutriente limitante em diversas regiões. Sua disponibilidade é regulada pela ação de microrganismos e também pelas propriedades físico-químicas e mineralógicas do solo. Em solos jovens e nos moderadamente intemperizados, como Vertissolos, Chernossolos e Neossolos, a maior parte do fósforo é encontrada na forma orgânica ou fracamente adsorvida a minerais secundários. Entretanto, em solos intemperizadas, como os Latossolos, o fósforo é encontrado principalmente na forma inorgânica adsorvido a oxihidroxidos de ferro e alumínio, mas podem ainda estar ligado ao ferro, cálcio e a matéria orgânica por pontes de cátions. Nesse caso os fosfatos são classificados como não-lábeis, uma vez que não possuem a capacidade de repor prontamente a solução do solo quando o nutriente é absorvido pelas plantas (Novais et al., 2007).

Em solos intemperizados, fungos micorrízicos arbusculares (FMA) podem desempenhar um papel importante, ajudando as plantas na absorção do fósforo complexado, o que diminui consideravelmente a necessidade de fertilização química. FMA podem ainda induzir a resistência em plantas através de alterações hormonais, levando ao acúmulo ou redução da produção de auxinas, citocininas, ácido abscísico e ácido jasmônico (Novais et al., 2007; Jung et al., 2012; Selosse et al., 2014; Goss et al., 2017).

O Laboratório de Ecologia Microbiana, UEL, trabalha há 20 anos com a produção de compostos de origem microbiana com potencial para o controle de fitopatógenos, também realiza pesquisas com fungos micorrízicos para produção de inoculantes que sirvam às grandes culturas, como soja, milho, algodão, etc. Os objetivos desse trabalho foram avaliar a utilização da fração F4A, produzida pelo metabolismo secundário da cepa de *P. aeruginosa* LV, no controle biológico e na indução de resistência a FAS e ainda, seus efeitos na morfologia e na colonização rizosférica de FMA *Rhizophagus clarus* bem como no desenvolvimento agrônomico da cultura da soja.

2. DESENVOLVIMENTO

2.1. AGRICULTURA NO BRASIL

A agricultura no mundo evolui constantemente, no entanto, a expectativa de crescimento populacional gera uma demanda cada vez maior por novas tecnologias que supram a carência alimentar da população, sem prejuízos ambientais. Segundo dados da CONAB (2019), o Brasil é o quinto maior país em extensão territorial, com uma área de 851,1 milhões de hectares, dos quais 63,2 milhões corresponderam a áreas cultivadas, com uma produtividade de 242,1 milhões de toneladas de grãos na safra 2018/19, das quais grande parte é destinada a produção de ração animal. Atualmente, o Brasil é o primeiro maior produtor mundial de soja (*Glycine max* L.), com um total estimado de 35,9 milhões de hectares cultivados, e produção total de 115 milhões de toneladas. A segunda cultura mais importante do país é a do milho (*Zea mayz* L.) com 17,5 milhões de hectares e produção de 100 milhões de toneladas, seguida pelo arroz (*Oryza sativa* L.) com 1,7 milhões de hectares e produção de 10,4 milhões de toneladas e o algodão (*Gossypium hirsutum* L.) com 1,6 milhões de hectares e produção de 6,8 milhões de toneladas de algodão em caroço.

No mercado internacional a soja é a leguminosa mais importante. Devido seu alto teor proteico e lipídico a cultura é utilizada na alimentação humana e animal há milênios, além de ser a fonte principal para produção de óleo vegetal e fonte para produção de combustíveis. Na sua semente são encontrados todos os nove aminoácidos essenciais (histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina), sendo composta de até 40% de massa proteica e 20% de óleo (Costa et al., 2005; Â. C. de A. Lopes et al., 2002).

Para atingir esses altos valores de produtividade uma série de manejos adequados devem ser tomados, entre eles, o controle de plantas daninhas, insetos e doenças, além de suprir as demandas nutricionais da cultura. Para isto, as estratégias mais disseminadas atualmente são a utilização de defensivos agrícolas e fertilizantes minerais.

2.2. CULTURA DA SOJA

Não se sabe ao certo quando ocorreu o processo de domesticação da planta da soja, o mais aceito é que tenha ocorrido na China em algum momento durante a dinastia Shang (1600 a.C. a 1046 a.C.) (Ho, 1969). Em seguida, durante a grande era dos descobrimentos tenha sido introduzida em muitos outros países asiáticos e posteriormente na Europa. Nos Estados Unidos,

o primeiro relato é do ano de 1765 na colônia da Georgia. Já no Brasil, o primeiro relato é de Gustavo D'utra em 1882, na Bahia, onde a soja foi cultivada na Escola de Agricultura da Bahia e mais tarde, na década de 60, o cultivo sofreu um processo de expansão, tornando-se então o vegetal mais cultivado no país (Hymowitz, 2008).

A soja é uma planta anual, herbácea, autógama, pertencente à família Fabaceae, gênero *Glycine* L., espécie *Glycine max*, e forma cultivada *Glycine max* (L.) Merrill, com variabilidade morfológica de acordo com o ambiente (SEDIYAMA, 2009, 2013).

Do ponto de vista nutricional a cultura da soja é muito exigente. O nitrogênio (N) é o macronutriente com maior demanda, sendo requeridos aproximadamente 51 Kg ha⁻¹ e exportados 32 Kg ha⁻¹ de N por tonelada de grãos produzidos. Além do N, o potássio na forma de óxido (K₂O) é exigido em grandes quantidades, 28 Kg ha⁻¹ são requeridos, enquanto 18 Kg ha⁻¹ são exportados em cada tonelada de grão produzido. Quanto aos demais macronutrientes, o fósforo na forma de pentóxido (P₂O₅) é exigido em valores próximos a 10 Kg ha⁻¹, o enxofre (S) em torno de 5,4 Kg ha⁻¹, seguido de cálcio (Ca) com valores próximos a 3,0 Kg ha⁻¹ e magnésio (Mg) com 2,0 Kg ha⁻¹ (EMBRAPA, 2013).

2.3. FERRUGEM ASIÁTICA DA SOJA

Uma série de doenças acometem a cultura da soja no Brasil, sendo as mais importantes as de origem fúngica, como a Antracnose (*Colletotrichum truncatum*), Cancro de haste (*Diaporthe phaseolorum* f.sp. *meriodionalis*), Crestamento foliar e Mancha púrpura (*Cercospora Kikuchii*), Mancha alva e Podridão radicular (*Corynespora cassicola*), Tombamento e morte em reboleira (*Rhizoctonia solani*), Tombamento e murcha de esclerócio (*Sclerotium rolfsii*), Oídio (*Erysiphe diffusa*), Podridão de carvão (*Macrophomina phaseolina*), Podridão radicular de fitóftora (*Phytophthora sojae*), Ferrugem asiática da soja (FAS) (*Phakopsora pachyrhizi*), entre outras. Entre as doenças de origem bacteriana podemos destacar o Crestamento bacteriano (*Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*) e a Pústula bacteriana (*Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*). Já de origem viral o Mosaico cálico (*Alfafa Mosaic Virus* – AMV), Mosqueado do feijão (*Bean Pod Mottle Virus* – BPMV), Mosaico comum da Soja (*Soybean Mosaic Virus* – SMV), Necrose de haste (*Cowpea Mild Mottle Virus* – CPMV), Queima do broto (*Tobacco Streak Virus* – TSV), apresentam relevância. A soja ainda é acometida por doenças causadas por nematoides, como o Nematóide do cisto (*Heterodera glycines*), os Nematóides de galhas (*Meloidogyne incógnita* e *M. javanica*) e Nematóides das lesões (*Pratylenchus* spp.) (Henning et al., 2005)

Dentre essas doenças, a Ferrugem Asiática da Soja (FAS) causada pelo fungo biotrófico *P. pachyrhizi*, é a mais severa, sendo encontrada em todas as áreas produtoras de soja no mundo e podendo levar a perdas de até 90% de produtividade quando as condições são favoráveis ao fungo (Langenbach et al., 2016).

Esse patógeno foi primeiramente descrito no Japão em 1902 (Hennings, 1903), se espalhando pelo oriente nos anos seguintes, sendo relatado na Austrália, China, Índia, Indonésia, Taiwan e outros países (Bromfield, 1984). Já em 1994, houve relato do fungo no Hawaii (Killgore et al., 1994) e alguns anos depois o mesmo foi reportado em vários países da África (Murithi et al., 2015). Na América do Sul o primeiro relato se deu no Paraguai, seguido do Brasil, no ano de 2001, e em 2004 na Colômbia, chegando a América do Norte, mais precisamente no Estados Unidos da América, no mesmo ano (Schneider et al., 2005; Yorinori et al., 2005).

O processo de infecção do *P. pachyrhizi* em plantas de soja se inicia com a germinação dos urediniosporos, formação do tubo germinativo e conseqüentemente do apressório (Hoppe & Koch, 1989; Koch et al., 1983). A partir do apressório se dá a penetração das células epidérmicas e o crescimento das hifas no espaço intercelular, primeiramente formando hifas invasoras primárias, em seguida hifas secundárias que povoam os espaços intercelulares (Vittal et al., 2014). Haustórios primários se formam nas células mesofílicas e em até 12 dias haustórios secundários são formados e erupções em forma de cúpula ocorrem na epiderme formando as urédias, que frequentemente tem aparência enferrujada nas folhas infectadas de soja (Vittal et al., 2014). Em estádios mais avançados, a FAS leva a clorose e desfolha precoce, impactando diretamente na produtividade (Figura 1) (Hartman et al., 2015).

As medidas comumente adotadas e eficientes para o controle da FAS envolvem a rotação de culturas, utilização de cultivares resistentes e de crescimento precoce, eliminação de hospedeiros alternativos, utilização de vazio sanitário, e principalmente, controle da severidade através da utilização de fungicidas químicos (Godoy et al., 2009).

No geral, a aplicação de fungicidas deve ser iniciada logo após o início do florescimento das plantas de soja ou ao serem observados os primeiros sintomas da FAS, com uma ou duas aplicações subsequentes com intervalos de 2 semanas (Sikora et al., 2009). No entanto, o uso excessivo de fungicidas químicos tende a trazer prejuízos ambientais, como a contaminação do solo e água, além de selecionar cepas resistentes aos fungicidas, levando a perda de produtividade (Godoy et al., 2016).

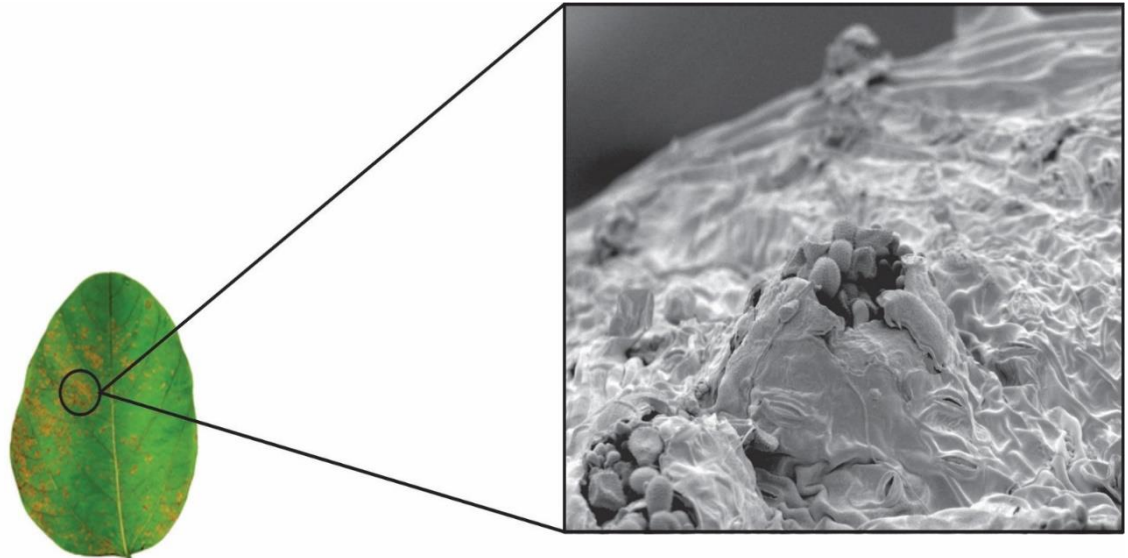


Figura 1. Folha de soja infectado com *Phakopsora pachyrhizi*. Em destaque urédias contendo esporos (2.000 X).

Fonte: Próprio autor

Os fungicidas utilizados possuem basicamente três modos de ação: através de inibidores de desmetilação (IDM, triazóis), inibidores de quinona externo (IQe, estrobirulina) e inibidores da succinato desidrogenase (ISDH, carboxamida) (Godoy, 2011; Klosowski et al., 2016; Schmitz et al., 2014). A consequência da seleção de cepas de *P. pachyrhizi* resistentes é a falta de uma nova alternativa para controlar a FAS nos próximos anos. A seguir uma breve revisão sobre o mecanismo de ação dos fungicidas listados.

2.3.1. Triazóis

Triazóis são fungicidas orgânicos desenvolvidos na década de 60 a partir da adição de radicais químicos a uma molécula de 1,2,4-triazol. A maioria dos triazóis são classificados como sistêmicos, absorvidos e translocados pela planta de forma acrópeta (Fletcher & Gilley, 2000).

Atuam como inibidores da enzima citocromo P450 14 α -desmetilase interferindo na conversão de lanosterol em ergosterol, útil na síntese da parede celular. Nesse mecanismo, o nitrogênio básico do anel azol está fortemente ligado ao ferro heme do citocromo P450 fúngico, impedindo a ligação ao substrato e ao oxigênio. A inibição da 14 α -desmetilase resulta no acúmulo de esteróis e causa alteração da permeabilidade e mau funcionamento das proteínas da membrana (Shalini et al., 2011).

Os fungicidas à base de triazóis podem ser utilizados como agentes protetores, apresentando ação tóxica sobre a germinação de esporos, sobre a formação de tubos germinativos e formação de apressório; ou curativos, atuando no desenvolvimento do haustório e crescimento micelial no interior dos tecidos do hospedeiro, apresentam ainda penetração e translocação rápida nos tecidos vegetais e elevado efeito residual. Os principais produtos que contêm triazóis como ingrediente ativo são Ciproconazol, Tebuconazol, Flutriafol, Epoxiconazol, Tetraconazol, Fluquinconazol, Miclobutanil, Metconazol, Difenconazol, Propiconazol e Triadimenol (Holb & Schnabel, 2007; Juliatti et al., 2017).

2.3.2. Estrobilurinas

Estrobilurinas são uma classe muito importante dentro dos fungicidas agrícolas. Sua descoberta foi inspirada em um grupo de fungicidas naturais derivados do ácido β -metoxiacrílico, produzidos por uma variedade de Basidiomicetos lignolíticos como, *Oudemansiella mucida* (Schrad ex Fr) Hoehn e *Strobilurus tenacellus* (Pers ex Fr) (Bartlett et al., 2002)

Moléculas do grupo das estrobilurinas atuam através da inibição do transporte de elétrons entre os citocromos b e c na cadeia transportadora de elétrons, reduzindo a formação de ATP pela mitocôndria e conseqüentemente a produção de energia e o crescimento fúngico. Estrobilurinas possuem um largo espectro de ação contra diversas espécies de fungos, dentre Oomicetos, Ascomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos. Além disso, apresentam atividade em isolados resistentes, baixa frequência de utilização e bom rendimento, podendo ser utilizado ainda no tratamento de sementes e tratamento no sulco de semeadura para controle de doenças transmitidas pelo solo (Bartlett et al., 2002).

2.3.3. Carboxamidas

Entre as principais classes de fungicidas utilizadas na agricultura, os inibidores da biossíntese de esteróis e os inibidores externos à quinonas (QoIs) são as mais importantes, entretanto, a classe de inibidores da succinato desidrogenase (SDHI) é a que mais tem ganho destaque em relação a novos compostos produzidos e lançados no mercado para comercialização. Esse crescimento na utilização dos SDHI se deve ao alto nível de atividade, aliado ao fato de muitos patógenos terem adquirido resistência aos QoIs e aos DMI (Sierotzki & Scalliet, 2013).

O primeiro fungicida SDHI conhecido foi a carboxina, usada desde 1966 para o tratamento de sementes para o controle de basidiomicetos (Schmeling & Kulka, 1966). No entanto, foi o boscalid (registrado em 2003) quem desencadeou o sucesso dos novos fungicidas SDHI devido ao seu sucesso, com atividade foliar de amplo espectro (Stammler et al., 2007).

A enzima succinato ubiquinona oxidoreductase (SDH) é um heterotetrâmero mitocondrial composto por quatro subunidades codificadas pelo núcleo. As subunidades SDHA e SDHB são ligadas à matriz mitocondrial e as subunidades SDHC e SDHD são proteínas integrais da membrana que ancoram o dímero SDHAB à membrana mitocondrial interna (Cecchini, 2003).

A SDH transfere elétrons provenientes do succinato diretamente para o pool de ubiquinona da cadeia respiratória e não para intermediários NAD⁺ solúveis, sendo considerada um componente essencial da cadeia respiratória. Os inibidores de SDH podem se ligar à sítios de ligação de succinato (por exemplo, malonato) ou a sítios de ligação da ubiquinona (por exemplo, carboxamidas). Todos os fungicidas SDHs tem como alvo o sítio de ligação da ubiquinona, definida estruturalmente pela interface entre SDHB e as subunidades -C e -D. Embora alguns resíduos de aminoácidos importantes na catálise da redução da ubiquinona sejam estritamente conservados entre as espécies, a maioria dos resíduos de SDHC e SDHD exibe um alto grau de variação entre as espécies. Esse recurso é amplamente responsável pela diversidade de estruturas químicas e diversidade do espectro biológico exibido nos SDHs (Sierotzki & Scalliet, 2013).

2.4.PANORAMA DA UTILIZAÇÃO DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS NO BRASIL E NO MUNDO

A *P. pachyrhizi* é apenas um dos fitopatógenos causadores de prejuízos significativos na cultura de soja, no entanto, diversos cultivos, sobretudo em países de clima tropical, enfrentam uma série de adversidades como ataques de insetos, bactérias, outros fungos, vírus, além do crescimento constante de ervas daninhas (Heinrichs & Muniappan, 2018).

Globalmente, aproximadamente 9.000 espécies de insetos e ácaros, 5.000 espécies de fitopatógenos e 8.000 espécies de ervas daninhas atacam as diversas culturas, causando perdas que podem chegar até a 90% em alguns casos. Para contornar esse problema, e aumentar a produtividade, o controle mais eficaz ainda é a utilização de defensivos agrícolas dos mais diversos, como fungicidas, inseticidas, herbicidas, nematicidas, entre outros (Zhang, 2018).

No ano de 2014, foram empregadas na agricultura mundial 93.621,63 toneladas de ingredientes ativos na forma de inseticidas, 445.836,64 toneladas de ingredientes ativos na

forma de herbicidas e 206.811,91 toneladas de ingredientes ativos na forma de fungicidas e bactericidas, com média total de 28.203 Kg ha⁻¹ de uso de defensivos agrícolas (Zhang, 2018).

O custo/benefício anual médio (g uso de pesticidas (total)/Kg de produção) durante 2010-2014 do Brasil é o maior (1.883), seguido pelo Japão (1.846), México (1.678), China (1.243), Canadá (0,979), EUA (0,8733), França (0,78), Alemanha (0,673), que são superiores à média mundial (0,645), exceto Reino Unido (0,55) e Índia (0,089). O uso médio anual de pesticidas (total) (Kg ha⁻¹) durante 2010-2014 do Japão é o maior (18,94), seguido pela China (10,45), México (7,87), Brasil (6,166), Alemanha (5,123), França (4,859), Reino Unido (4,034), EUA (3,886), que são superiores à média mundial (2,784), com exceção da Índia (0,261). Mais especificamente, em relação ao uso de fungicidas e bactericidas, entre os anos 2010 e 2014, o Japão foi o país com a maior taxa de custo benefício entre g utilizados por Kg produzido (0,773), seguido do México (0,698), França (0,315), Brasil (0,249), Reino Unido (0,181), Alemanha (0,156), acima da média mundial (0,074) e os dois últimos são EUA (0,052) e Índia (0,021). O uso médio anual de fungicidas e bactericidas (Kg ha⁻¹) entre 2010-2014 do Japão é o maior (7,934), seguido pelo México (3,275), França (2,162), Reino Unido (1,332), Alemanha (1,194), Brasil (0,814).), que são superiores à média global (0,32), e os dois últimos são EUA (0,229) e Índia (0,058) (Zhang, 2018).

Apesar dos defensivos agrícolas promoverem uma série de benefícios à agricultura, como controle de pragas e doenças e consequente aumento de produtividade, também acarretam em uma série de problemas, como o dano direto a saúde dos trabalhadores que estão envolvidos em sua produção e utilização, agricultores, formuladores e aplicadores de defensivos agrícolas, que sofrem com uma alta ocorrência de sintomas generalizados como dores de cabeça, náuseas, vômitos, fadiga, irritações na pele e olhos, além de sofrerem danos fisiológicos, neurológicos, cardiorrespiratórios e gastrointestinais (Aktar et al., 2009).

Desses problemas surgem novos desafios, não só de encontrar fungicidas químicos eficazes, mas desenvolver novas tecnologias, mais sustentáveis, como por exemplo a utilização de compostos de origem microbiana para controlar doenças em plantas.

2.5.BIOATIVOS MICROBIANOS

Compostos de origem microbiana são produto de milhões de anos de evolução, sendo desenvolvidos a partir da seleção natural para interagir com patógenos com alta eficiência e seletividade (Wright, 2017).

Entre as novas tecnologias, o uso de organismos vivos e de seus metabólitos para o controle de patógenos denominado biocontrole, aparece como uma alternativa, sendo foco de muitas pesquisas nas últimas décadas. Esses microrganismos são capazes de competir com os patógenos, seja por antagonismo (Cordero-Ramirez et al., 2012; Banani et al., 2015), seja por indução de resistência na planta (Ma et al., 2016) ou até mesmo via inibição de fatores de virulência dependentes de *quorum sensing* do patógeno (Molina et al., 2003; Alymanesh et al., 2016).

O metabolismo microbiano pode ser dividido em primário e secundário. No metabolismo primário, durante a fase de crescimento exponencial, são produzidos compostos essenciais ao desenvolvimento e sobrevivência. Já no metabolismo secundário, durante a fase final do crescimento exponencial e fase estacionária, são produzidas moléculas orgânicas complexas, que no geral não são essenciais para o crescimento e a reprodução microbiana, mas garantem vantagens competitivas inibindo o crescimento de outras espécies, mesmo em baixas concentrações, consequentemente reduzindo a competição por nutrientes (Madigan et al., 2010).

Os primeiros antibióticos descobertos, para uso comercial, tinham de atender a uma série de critérios, como possuir eficácia de amplo espectro e ausência de toxicidade humana. Compostos com atividade de baixo espectro para um gênero ou espécie, e com efeitos tóxicos foram descartados no início do processo de descoberta, para nunca mais serem estudados, sendo os esforços direcionados para pesquisa de compostos produzidos por microrganismos como os actinomicetos, o quê, com o tempo levou ao re-isolamento frequente de compostos já conhecidos, e diminuição da descoberta de novos compostos antibióticos (Wright, 2017).

Uma opção ao estudo frequente de actinomicetos é a exploração de outros gêneros, que não foram exhaustivamente estudados, mas que se conhece o potencial antibiótico. Fungos endofíticos e bactérias por exemplo, produzem diversos compostos bioativos, dentre eles, alcaloides, esteroides, terpenóides, peptídeos, policetonas, flavonóides, quinóis e fenóis. Bactérias endofíticas possuem ainda potencial de produzir hormônios de crescimento vegetal, de solubilizar fosfato, além de auxiliar na absorção de nutrientes e fixação de N₂. Esses compostos tem papel importante em aplicações terapêuticas, possuindo propriedades anticancerígena, antioxidante, anti-inflamatória, imunossupressora além da antibiótica (Singh et al., 2017).

2.6.PSEUDOMONAS AERUGINOSA CEPA LV

Entre os microrganismos que podem contribuir na pesquisa para a descoberta de novos compostos com atividade antimicrobiana, as bactérias do gênero *Pseudomonas* são bem estudadas, devido a sua ampla distribuição no solo, particularmente em ambientes húmidos, e sua capacidade de supressão de patógenos. As bactérias desse gênero são Gram-negativas, importantes particularmente para plantas com raízes sistêmicas, capazes de quebrar hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) e possuem uma grande capacidade de produzir uma série de metabólitos secundários que podem inibir o crescimento ou o metabolismo de outros microrganismos (Simionato et al., 2017). Algumas cepas possuem a capacidade de produzir compostos antibióticos, antiparasíticos, antitumorais e antifúngicos, podendo produzir apenas uma classe desses compostos ou até todas elas. Entre esses metabólitos se encontram fenazinas, indolinonas, peptídeos, glicopeptídeos, lipídios e compostos alifáticos (Oliveira et al., 2016).

O Laboratório de Ecologia Microbiana da Universidade Estadual de Londrina há mais de dez anos estuda compostos com atividade antimicrobiana extraídos do metabolismo secundário de uma cepa de *Pseudomonas aeruginosa*, denominada LV. O microrganismo foi isolado por Rampazo *et al.* (2004) a partir de uma lesão antiga de fruto de laranja (*Citrus sinensis* cv. Valence) infestada com cancro cítrico, doença causada pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. citri, no município de Astorga, PR, Brasil.

Anos depois, de Oliveira *et al.* (2011) observaram através de microscopia eletrônica de transmissão (MET) um efeito da fração semi-purificada F3, obtida a partir da partição líquido-líquido do composto bruto produzido pela cepa LV com diclorometano, e fracionada em Cromatografia Líquida a Vácuo (CLV) com 100% de acetato de etila, contra a cepa *Xanthomonas citri* pv. citri cepa 306 (*Xcc* 3016). Após 3 horas de exposição do microrganismo à fração sua parede celular e membrana citoplasmática foram indistintas quando comparadas ao controle, resultando em forma e morfologia celular modificadas, e após 6 horas as células tratadas pareciam ter sido lisadas. Também se observou por Microscopia Eletrônica de Varredura que com uma hora de exposição à fração F3, a matriz de exopolissacarídeos (EPS) produzida pela *Xcc* 306 havia sido completamente eliminada. Resultados muito semelhantes foram observados por Vasconcellos *et al.* (2014) ao estudar o efeito da fração F3 sobre *Xanthomonas arboricola* pv. pruni, agente causal da mancha bacteriana em pessegueiros.

X. axonopodis também é o agente causal da queima bacteriana de folhas, uma das principais doenças que afetam o cultivo de *Eucalyptus* spp, e em 2012, Lopes *et al.* , observaram que a fração F3 possuía efeito antibiótico *in vitro* contra esse microrganismo, com zona de inibição de 30,5 mm em testes de difusão em ágar. Observaram ainda que a Concentração

Inibitória Mínima (CIM) da fração F3 contra *X. axonopodis* foi de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, e em testes *in vivo* com mudas de *Eucalyptus*, verificaram uma redução de até 93,9% no número de lesões em comparação ao controle positivo, após 30 dias de inoculação da doença.

Em 2016 Oliveira *et al.*, trabalhando com uma fração com maior grau de pureza, obtida a partir de Cromatografia Líquida a Vácuo (CLV) realizada com a fração F3 e particionada com 50% de diclorometano e 50% de acetato de etila, nomeada de F3D, observaram uma redução significativa no número de lesões em folhas de laranja infectadas com *Xcc* 306, quando comparadas ao controle. Na concentração de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ foi observada redução de 90% das lesões, já concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ 93% e na concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ houve 97% de redução.

Munhoz *et al.* (2017) observaram por análises de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) que tanto a fração F3D quanto F4A (obtida a partir de uma CLV direta da fração FD particionada com 50% de diclorometano e 50% de acetato de etila) possuem as mesmas características, sendo compostas por dois principais metabólitos: fenazina-1-carboxamina (PCN) e pelo composto Fluopcina C. A fração foi testada contra a espécie bacteriana *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (*Pcc*) causadora da podridão-mole em tomate, em testes de disco difusão. Os resultados apresentaram halos de inibição de 21 e 25 mm nas concentrações de 250 e $500 \mu\text{g disco}^{-1}$ respectivamente, e CIM de $7,81 \mu\text{g mL}^{-1}$. Imagens de MEV revelaram que as células de *Pcc* tratadas com F4A foram totalmente lisadas após três horas de exposição. Em experimentos *in vivo* com plantas de tomate 60% das plantas infectadas e não tratadas apresentaram sintomas de podridão mole e morreram, enquanto as plantas tratadas com a fração F4A não apresentaram sintomas no tratamento preventivo com 100% de sobrevivência. Por outro lado, F4A apresentou baixa atividade antimicrobiana no tratamento curativo, apenas 20% das plantas tratadas com 70 e $700 \mu\text{g mL}^{-1}$ sobreviveram e na menor concentração testada ($7 \mu\text{g mL}^{-1}$) todas as plantas tratadas sobreviveram.

Avaliando o efeito da fração F4A na indução de resistência em laranja, Pistori *et al.* (2018) verificaram que após 24 horas de aplicação, a expressão do gene da β -1,3 glucanase, enzima lítica responsável por degradar as β -1,3 glucanas presentes na parede celular fúngica, foi nove vezes maior em árvores tratadas com a dose de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de F4A quando comparada a árvores não tratadas, indicando maior controle do desenvolvimento de patógenos em possíveis infecções. Após sete dias, a expressão do gene foi ainda maior, chegando a ser 14,7 e 12,9 vezes mais expresso que o controle, nas concentrações de 10 e $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente.

2.7.F4A: COMPOSTOS

A fração F4A é obtida a partir de cromatografia líquida a vácuo (CLV), utilizando como fase móvel diclorometano e acetato de etila. Em sua composição a fração F4A possui aproximadamente 30% de fenazina-1-ácido carboxílico (PCA), 25% de fenazina-1-carboxamida (PCN), 5% de indolin-3-ona (IND) e 25% de Fluopsina C (FC).

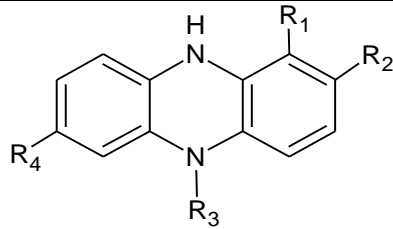
2.7.1. PCA

As fenazinas são um grupo de substâncias heterocíclicas contendo nitrogênio, pigmentos coloridos brilhantes de largo espectro com atividade antimicrobiana, dependente do radical que apresentam (Tabela 1). Entre elas algumas das mais estudadas são a fenazina carboxílica (PCA), fenazina carboxamida (PCN) e a pyocianina (PYO), esta última relacionada a infecções crônicas e purulentas em pacientes com imunodepressão, apresentando coloração azulada brilhante em lesões, principalmente queimaduras de pele (Price-Whelan et al., 2006).

A PCA possui coloração amarelo-limão brilhante e atua como intermediária para a formação de outros tipos de fenazinas, podendo ser convertida a PCN devido a ação de uma transamidase catalisada pela enzima PhzH (Pierson & Pierson, 2010), à PYO através da ação de uma *methyltransferase* e de uma *flavin-containing monooxygenase*, ou ainda a 1-hidroxfenazina por intermédio da enzima PhzS (Chin-A-Woeng et al., 1998). Devido a sua atividade antimicrobiana e sua baixa toxicidade em humanos foi registrada na China no ano de 2011 como um novo fungicida sintetizado biologicamente, com nome de “Shenqinmicina” (Xu et al., 2015). A PCA possui atividade antimicrobiana contra microrganismos patogênicos dos gêneros *Alternaria*, *Botrytis*, *Fusarium*, *Gaeumannomyces graminis*, *Phytophthora*, entre outros (Puopolo et al., 2013; Y. Zhang et al., 2015). Em imagens de MEV também foi possível observar deformação, encolhimento das hifas fúngicas de *Botrytis cinerea* após exposição à PCA em ágar, além da redução ou eliminação da matriz de exopolissacarídeos, responsável pela formação de biofilme, um fator de virulência de extrema importância para vários fungos (Simionato et al., 2017). Efeitos antifúngicos semelhantes foram observados ao avaliar o efeito da PCA contra diversos fitopatógenos de plantas, dentre eles, *Alternaria alternata*, *Colletotrichum gloeosporoides*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Phellinus noxius*, entre outros (Huang et al., 2016; Puopolo et al., 2013).

A PCA tem capacidade de promover oxidação celular, levando a desestabilização mitocondrial, gerando uma crise de eficiência na cadeia transportadora de elétrons, formando

intermediários de espécies reativas de oxigênio (ROS), que pode levar ao estresse oxidativo celular e alteração da permeabilidade da membrana (Briard et al., 2015; Wang et al., 2010).



Nome	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Atividade
Fenazina-1-ácido carboxílico	COOH				Antifúngica
Fenazina-1-ácido carboxílico	CONH ₂				Antifúngica
Piocianina	OH		CH ₃		Antifúngica e ASR
1-hidroxifenazina	OH				Antibacteriana e Antifúngica
2-hidroxifenazina					
Aeruginosina A	COOH		CH ₃	NH ₂	

Tabela 1. Molécula de Fenazina e seus diferentes radicais.

Fonte: Price-Whelan et al (2006).

2.7.2. PCN

Outra fenazina, também produzida no metabolismo secundário de *P. aeruginosa*, a fenazina-1-carboxiamida (PCN), de coloração amarela-esverdeada, têm mostrado potencial de inibição contra alguns patógenos de plantas. Shanmugaiah *et al.* (2018) comprovaram a atividade do composto, na concentração de 5 ug mL⁻¹ o mesmo inibiu consideravelmente o crescimento micelial de *R. solani* quando comparado ao tratamento químico com carbendazim.

Xiang *et al.* (2018) observaram alterações na morfologia do micélio de *Rhizoctonia solani* após aplicação de PCN na concentração de 18,15 ug mL⁻¹, o qual apresentou hifas torcidas e um número maior de vacúolos, além de verificarem que as hifas tratadas apresentaram maior número de ramificações em detrimento do crescimento de hifas principais. Com auxílio de microscopia eletrônica de transmissão (MET), verificaram ainda paredes celulares tornando-se mais finas e malformadas, septo torcido, citoplasma misturado, desaparecimento das mitocôndrias e ribossomos, vacúolos contraídos e plasmólise. Observaram

ainda redução na atividade da enzima quitina sintetase e redução na atividade do complexo 1 da cadeia transportadora de elétrons.

Além da atividade antifúngica, a PCN possui ainda atividade antibacteriana, como demonstrado por Shanmugaiah *et al.* (2010) ao observar, *in vitro*, halos de inibição de até 54 mm contra *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*.

2.7.3. Indolinona

O ácido indolacético (AIA) é a principal auxina produzida pelas plantas superiores, estando envolvido no crescimento e desenvolvimento, principalmente em processos fisiológicos como a alongação celular e divisão celular, diferenciação de tecidos, fototropismo, gravitropismo, em respostas de defesa, além de possuir um importante papel na formação do xilema e das raízes (Vega-Celedón *et al.*, 2016).

Outros organismos como bactérias, fungos e algas também sintetizam AIA, podendo influenciar no crescimento e desenvolvimento das plantas, tanto positivamente quanto negativamente, através do desbalanceamento da produção de auxinas. Bactérias fitopatogênicas, como *Agrobacterium* spp e *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* causam tumores nos tecidos das plantas e galhas, retardando o crescimento, além de aumentar a suscetibilidade para outras doenças na planta (Vega-Celedón *et al.*, 2016).

Fungos sintetizadores de AIA podem promover o crescimento e desenvolvimento de plantas através de mecanismos fisiológicos e bioquímicos, além de poder influenciar indiretamente através do fortalecimento das respostas imunes nas plantas para suprimir fitopatógenos e desenvolvimento de doenças.

Fungos micorrizicos arbusculares ao colonizarem as raízes das plantas promovem um incremento na produção de auxinas, como o AIA, que assim como IBA (índole-3-butyric acid) promove, o desenvolvimento de raízes laterais, sítios preferencias para colonização de FMA (Fu *et al.*, 2015).

Em sua composição, a fração F4A produzida pela *P. aeruginosa* cepa LV possui 5% de uma indolinona (indolin-3-ona), composto este que é análogo ao AIA, e possivelmente pode atuar de forma similar em plantas, por exemplo, promovendo o crescimento e induzindo as respostas de defesa vegetal.

2.7.4. Fluopcina C

O cobre é um cofator importante para diversas enzimas em eucariotos e procariotos, sendo essencial para maioria dos organismos, no entanto, em excesso pode ser prejudicial, devido a sua atividade redox e habilidade de se ligar a sítios de outros metais, principalmente clusters de ferro-enxofre, levando a um aumento do metabolismo microbiano, relacionado ao estresse gerado pelo íon dentro do organismo (Vita et al., 2016).

No ano de 1970, Egawa *et al.*, verificaram que a bactéria *Pseudomonas fluorescens*, cepa MCRL 10107, era capaz de produzir um composto organocúprico (*organocopper antibiotic compound*, OAC) com atividade antimicrobiana contra várias espécies de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, além de possuir atividade antifúngica. Esse composto com atividade antimicrobiana foi denominado de YC 73 ($C_4H_8N_2O_2S_2Cu$). Ainda em 1970 Shirahata *et al.*, isolaram da espécie *Pseudomonas fluorescens*, cepa KY 4032 o mesmo composto, e o batizaram de Fluopcina C, sendo ainda caracterizado como bis(N-methyl-N-thioformylhydroxylaminato)copper.

Munhoz *et al.*, (2017) verificaram que plantas de tomate infectadas com Pcc sobreviveram graças a presença da Fluopcina C na composição da F4A. Em outro estudo, a Fluopcina C também apresentou alta atividade antibiótica contra Xcc 306 (Oliveira et al., 2016).

2.8.INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA

A indução de resistência em plantas pode ser definida como a capacidade de reconhecer patógenos ou sinais moleculares e desencadear uma rápida e eficiente resposta de defesa. As defesas das plantas contra doenças compreendem uma série de mecanismos e modos de ação relacionados ao reconhecimento, sinalização e resposta, definidos como imunidade vegetal. As PAMP-triggered immunity (PTI) e effector-triggered immunity (ETI) mediam a ativação da imunidade inata, induzindo a acumulação de ácido salicílico (AS), que possui um papel como intermediário na inibição da atividade da catalase, enzima que converte o peróxido de oxigênio (H_2O_2) em água (H_2O) e oxigênio (O_2). Essas espécies reativas de oxigênios (EROS) podem agir como sinalizadoras, levando à resposta sistêmica adquirida (RSA), que posteriormente desencadeia reações de hipersensibilidade (HR), através do acúmulo de proteínas relacionadas a patogênese (PR – *proteins*), como a hidrolase [β -1,3-glucanase] (PR-2) e quitinase (PR-3), gerando lesões necróticas nos tecidos da planta. A sinalização ocorre principalmente através do floema, sendo mediada por moléculas sinalizadoras, como o ácido salicílico (AS) e intermediários de sua rota metabólica, como o ácido metil-salicílico (AMS). Através da RSA a planta ainda fica protegida contra novas doenças pelo mesmo patógeno (Chen et al., 1993; Fritig

et al., 1998; Van Loon & Van Strien 1999; Compant et al., 2005; Spoel & Dong; 2012; Thakur & Sohal, 2013).

Outro mecanismo de defesa vegetal é chamado de resistência sistêmica induzida (RSI), mediado via ácido jasmônico (AJ) e etileno. A RSI é eficaz na proteção de plantas contra vários patógenos, mas ao contrário da RSA, o microrganismo indutor não causa doença no hospedeiro (Choudhary et al., 2007).

O AJ é derivado de moléculas lipídicas provenientes da membrana plasmática, e é sintetizado a partir da rota das oxilipinas, tendo como precursor o ácido α -linoleico, que é peroxidado pela enzima lipoxigenase, em seguida, a enzima aleno óxido sintase converte o produto em um aleno óxido altamente instável. Através da aleno oxido ciclase o aleno óxido é convertido em cis-(+)-OPDA que é por fim metabolizado em AJ (Kongrit et al., 2007; Robert-Seilaniantz et al., 2011).

Já o AS é um composto fenólico que pode ser sintetizado por duas vias metabólicas distintas, a rota da fenilalanina, mediada pela enzima fenilalanina amônia-liase, e pela rota do isocorismato, mediada pela isocorismato sintase, em ambos o precursor é o corismato. As respostas de defesa relacionadas a este hormônio têm início com a ligação deste com seu receptor, a proteína NPR1 (*nonexpressor of PR genes 1*), que por sua vez é transferida para o núcleo das células onde causará a degradação de proteínas que impedem a expressão de genes de defesa (Chen et al., 2009; Yan & Dong, 2014).

As proteínas PR são atualmente classificadas em 17 famílias, de acordo com sua atividade biológica, propriedades físico-químicas e homologia (Fernandes et al., 2013). Podem apresentar atividade hidrolítica, possuir toxicidade direta através da permeabilização da membrana plasmática, como é o caso de quitinases e glucanases que degradam a parede celular de fungos, e também pode ser um agente sinalizador de processos de defesa (van Loon et al., 2006). As proteínas PR atuam ainda de forma indireta, auxiliando na prevenção contra a penetração de patógenos, possuem a capacidade de oxidar os componentes da parede celular vegetal pela ação de peroxidases e atuar na transdução de sinais durante a interação patógeno-hospedeiro (Stangarlin et al., 2011).

Dentre as proteínas relacionadas com a defesa vegetal, as PR-1 se destacam, constituindo de 1 a 2% do total de proteínas encontradas na folha. São conhecidas como marcadores moleculares universais da RSA, uma vez que os níveis de transcrição dos genes que as codificam aumentam sob estresses bióticos e abióticos significativamente (Edreva, 2005). As PR-1 estão relacionadas ainda a reações de hipersensibilidade, e sua hiperexpressão resulta em plantas mais resistentes ao ataque de patógenos (Breen et al., 2017).

Já entre as proteínas da família das PR-2, as enzimas β -1,3-glucanases são responsáveis pela hidrólise de ligações β -1,3-glicosídicas de β -glucanas, componente importante da parede celular de fungos patogênicos, gerando glucose e polissacarídeos. As enzimas β -1,3-glucanases agem ainda de forma indireta na defesa vegetal, uma vez que após a reação de hidrólise as β -glucanas são reconhecidas pelas PRPs da célula vegetal (Bauermeister et al., 2010; Stangarlin et al., 2011).

As proteínas da família PR-5, encontradas em diversas plantas superiores, também são associadas a respostas de defesa vegetal contra fungos e estresses abióticos. Essa atividade está associada a alterações da permeabilidade na membrana plasmática, enfraquecimento da parede celular, plasmólise e ativação do sistema de sinalização MAP quinase (*Mitogen Activated Protein Kinases* - Proteínas-quinases ativadas por mitógenos) (Rather et al., 2015).

Além das proteínas PR, enzimas como a fenilalanina amônio liase (PAL) estão envolvidas nas respostas de defesa das plantas. A PAL desempenha importante papel na via dos fenilpropanóides, atuando na conversão de L-fenilalanina em ácido cinâmico, resultando na biossíntese de outros metabólitos, como ácido cumárico, ferúlico e cafeico, além de flavonóides, taninos e lignina, produtos importantes que protegem as plantas contra vários estresses abióticos e bióticos. A expressão da PAL está relacionada a via de sinalização de etileno/jasmonato, que leva a RSI, sendo considerada um marcador de resposta de defesa (Basha et al., 2006; Tonelli et al., 2013; Chandrasekaran et al., 2016).

2.9.FMA E INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA

A RSI pode ainda ser induzida através de associação mutualistas entre microrganismos do solo e plantas, FMA por exemplo possuem a capacidade de induzir alterações hormonais nas plantas hospedeiras, alterando a respostas a estresses bióticos e abióticos (Brígido, 2017; Pozo et al., 2010). Essas alterações hormonais incluem variações nos níveis de auxinas, citocininas, ácido abscísico (ABA) e produção de AJ. Essas respostas hormonais podem atuar regulando a tolerância do hospedeiro à colonização por FMA, enquanto outros tecidos e órgãos podem desenvolver respostas de defesa aprimoradas ao ataque de patógenos, processo esse denominado de “efeito *priming*” (Jung et al., 2012; Selosse et al., 2014).

Citocininas por exemplo, funcionam como receptores para o FMA na simbiose, ajudando na repressão das respostas de defesa naturais da planta durante a colonização (Barker & Tagu, 2020). Já os níveis de ABA aumentam após a formação da simbiose e são relacionados a tolerância a estresse hídrico nas raízes (Herrera-Medina et al., 2007; Kuromori et al., 2018).

O AJ é um agente sinalizador para diferentes estresses bióticos e abióticos nas repostas celulares das plantas e suas interações com outros organismos (Yang et al., 2018; Wang et al., 2020).

A indução das respostas de defesa vegetal está relacionada com a síntese das proteínas PR, como as 1,3-b-glucanases e quitinases. AJ, AS e ET induzem a produção de proteínas PR, resultando em um efeito de defesa inicial, que modula a produção de AJ, ET e AS (Pozo et al., 2010).

2.10. FMA E FÓSFORO

Apesar de induzirem a RSI, a principal característica dos FMA é promover uma maior absorção de nutrientes do solo, principalmente o fósforo, um nutriente extremamente importante, essencial para o desenvolvimento de plantas, visto que desempenha funções estruturais, sendo componente de ésteres de carboidratos, fosfolipídios, coenzimas, ácidos nucleicos e nucleotídeos, e participa ainda em processos de transferência e armazenamento de energia, fotossíntese, síntese de proteínas, multiplicação e divisão celular e fixação biológica de nitrogênio (Prado, 2008)

No geral, a fertilização química é comum na agricultura convencional. Fertilizantes fosfatados são produzidos a partir de rocha fosfática, que podem ser classificadas em ígneas ou sedimentares. Cerca de 80% da rocha fosfática existente no mundo é proveniente de depósitos sedimentares. Segundo a *United States Geological Survey* (USGS, 2019), Marrocos e Saara ocidental são os países que possuem as maiores reservas de RF no mundo com 50 bilhões de toneladas, seguidos pela China com 3,2 bilhões de toneladas. O Brasil possui uma reserva total de 1,7 bilhão de toneladas.

A disponibilidade de fósforo é mediada pela atividade de microrganismos, imobilizando ou liberando íons ortofosfatos, e também pelas propriedades físico-químicas e mineralógicas do solo. Dependendo do grau de estabilidade desses compostos, aqueles que têm capacidade de substituir a solução do solo quando o fósforo é absorvido pelas plantas são classificados como fosfatos lábeis e aqueles que não têm essa capacidade são classificados como não-lábeis. Em solos altamente intemperizados, o P é encontrado principalmente adsorvido ao ferro e oxihidróxidos, mas também pode estar ligado a alumínio, cálcio e matéria orgânica, dificultando a absorção das raízes, pois não preenche a solução do solo em níveis satisfatórios (Novais et al., 2007). Nestes tipos de solo, fungos micorrízicos podem desenvolver um papel importante, ajudando as raízes na absorção de fósforo, diminuindo consideravelmente a fertilização química (Goss et al., 2017).

FMA são microrganismos biotróficos obrigatórios, habitantes naturais dos solos, pertencem ao Filo *Glomeromycota*, classe *Glomeromycetes*, que estabelecem relações mutualísticas com cerca de 80% das raízes das plantas, numa associação chamada de micorríza. São fungos assexuados, possuem micélio cenocítico e quitina como principal componente da estrutura da parede celular (de Souza et al., 2010; Morton & Redecker, 2001).

Os esporos dos FMA são as estruturas mais importantes para proteção, disseminação e infecção de novas raízes, possibilitando que o fungo se mantenha no solo por longos períodos de tempo. Uma vez que condições de temperatura, pH e umidade sejam favoráveis os esporos germinam através da formação do tubo germinativo e ocorre a formação do micélio. Os esporos podem ser globosos, subglobosos e até irregulares, unicelulares hialinos, amarelos, marrons a negros, e variam de 22 a 1,059 μm , apresentando parede espessa lisa ou ornamentada. Uma vez que possuem natureza assexuada, são distintos de zigósporos, zigósporos e clamidósporos, sendo todos os esporos denominados glomerósporos (Maia et al., 2010). Glomerósporos podem ser produzidos de três formas diferentes: glomóide, gigásporoide e acaulosporoide. Esporos glomóides desenvolvem-se geralmente de forma terminal, numa hifa suspensora, sendo formados individualmente ou em agregados e esporocarpos, ou mais raramente, intercalando hifas. Esporos do tipo acaulospóides são formados em um sáculo esporífero, desenvolvido a priori na lateral ou dentro da hifa suspensora. Já os esporos do tipo gigásporoide são formados individualmente por brotação, a partir de uma célula bulbo (Brígido, 2017; de Souza et al., 2010; Morton & Redecker, 2001).

No processo de simbiose, após o micélio dos fungos micorrizicos entrarem em contato com as raízes das plantas hospedeiras, são formadas estruturas chamadas de apressórios, onde são liberadas enzimas celulolíticas que possibilitam a penetração da epiderme por parte das hifas fúngicas. No córtex das raízes das plantas hospedeiras as hifas se desenvolvem tanto inter quanto intracelularmente, formando estruturas especiais para troca de nutrientes chamadas de arbúsculos, e em seguida há o desenvolvimento do micélio extraradicular, que passa a atuar como uma extensão radicular, incrementando a absorção de nutrientes do solo, em especial dos mais imóveis, como é o caso do P (Ramos & Martins, 2010).

Os fosfatos inorgânicos absorvidos do solo pelas hifas extraradiculares são convertidos em grânulos de polifosfato e depois transportados para perto da membrana dos arbúsculos, onde são convertidos novamente em fosfatos inorgânicos e transportados para a interface arbuscular. Em troca a planta fornece sacarose da fotossíntese para a interface arbuscular, que é convertida em glicose e frutose pela atividade da invertase e transportada para as células do FMA, onde serão usadas para a síntese de lipídios ou glicogênio (Ramos & Martins, 2010).

2.11. PANORAMA DA UTILIZAÇÃO DE FERTILIZANTES NO BRASIL E NO MUNDO

O estudo de novas tecnologias que visem substituir, ou reduzir a utilização de fertilizantes químicos é relevante tanto do ponto de vista ambiental, quanto econômico. De acordo com o último levantamento da *International Fertilizer Industry Association* (IFA), realizado no ano de 2017, na safra 2014/15 foram utilizadas 181,9 milhões de toneladas de fertilizantes minerais em todo o mundo, sendo 102,5 milhões correspondentes a nitrogênio (N), 45,9 milhões na forma de fertilizantes fosfatados (P_2O_5) e 33,5 milhões na forma de fertilizantes a base de potássio (K_2O) (Heffer, 2013).

Deste total, um pouco menos da metade foi destinado para o cultivo de cereais (49,3%), onde 16,2% foram destinados para o milho, seguido pelo trigo com 15,3%, o arroz com 13,7% e 4% foram para outros cereais. As aplicações de fertilizantes para culturas oleaginosas foram estimadas em 23,2 milhões de toneladas, representando 12,7% do consumo mundial, dos quais 5,4% destinados a cultura da soja, 2,7% para o óleo de palma e 4,6% para as outras oleaginosas. As culturas destinadas à produção de açúcar consumiram 4,1% e as utilizadas na produção de fibras consumiram 3,7%. Já as raízes e tubérculos utilizaram 2,3%, frutas e vegetais juntos representaram 15,8%, e as pastagens representaram 4,3%. As demais espécies vegetais, incluindo espécies que não são utilizadas para agricultura, representaram 7,8%. Ainda segundo a IFA (2017), a China é o país com o maior consumo de fertilizantes no mundo, seguido de Índia, Estados Unidos, União Europeia, Brasil e Indonésia e Paquistão (Heffer, 2013).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aktar, W., Sengupta, D., & Chowdhury, A. (2009). Impact of pesticides use in agriculture: Their benefits and hazards. *Interdisciplinary Toxicology*, 2(1), 1–12. <https://doi.org/10.2478/v10102-009-0001-7>
- Alymaness, M. R., Taheri, P., Tarighi, S. (2016). Pseudomonas as a frequent and important quorum quenching bacterium with biocontrol capability against many phytopathogens. *Bioncontrol Science and Technology* 26(12), 1719-1735. <http://dx.doi.org/10.1080/09583157.2016.1239065>
- Banani, H., Spadaro, D., Zhang, D., Matic, S., Garibaldi, A., Gullino, M. L. (2015). Postharvest application of a novel chitinase cloned from *Metschnikowia fructicola* and overexpressed in *Pichia pastoris* to control brown rot of peaches. *International Journal of Food Microbiology*, 199(2015), 54-61. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.01.002>
- Barker, S. J., & Tagu, D. (2000). The roles of auxins and cytokinins in mycorrhizal symbioses. *Journal of Plant Growth Regulation*, 19(2), 144–154. <https://doi.org/10.1007/s003440000021>
- Bartlett, D. W., Clough, J. M., Godwin, J. R., Hall, A. A., Hamer, M., & Parr-Dobrzanski, B. (2002). The strobilurin fungicides. *Pest Management Science*, 58(7), 649–662. <https://doi.org/10.1002/ps.520>
- Basha, S. A., Sarma, B. K., Singh, D. P., Annapurna, K., & Singh, U. P. (2006). Differential methods of inoculation of plant growth-promoting rhizobacteria induce synthesis of phenylalanine ammonia-lyase and phenolic compounds differentially in chickpea. *Folia Microbiologica*, 51(5), 463–468. <https://doi.org/10.1007/BF02931592>
- Bauermeister, A., Rezende, M. I., Giese, E. C., Dekker, R. F. H., & Barbosa, A. D. M. (2010). beta-(1,3)-Glucanases Fúngicas: Produção e Aplicações Biotecnológicas. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*, 31(2), 75. <https://doi.org/10.5433/1679-0375.2010v31n2p75>
- Breen, S., Williams, S. J., Outram, M., Kobe, B., & Solomon, P. S. (2017). Emerging Insights into the Functions of Pathogenesis-Related Protein 1. *Trends in Plant Science*, 22(10), 871–879. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.06.013>
- Briard, B., Bomme, P., Lechner, B. E., Mislin, G. L. A., Lair, V., Prévost, M. C., Latgé, J. P., Haas, H., & Beauvais, A. (2015). *Pseudomonas aeruginosa* manipulates redox and iron homeostasis of its microbiota partner *Aspergillus fumigatus* via phenazines. *Scientific Reports*, 5, 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep08220>
- Brígido, C. (2017). Diversity in Arbuscular Mycorrhizal Fungi. In M. J. Goss, M. Carvalho, & I. Brito (Eds.), *Functional Diversity of Mycorrhiza and Sustainable Agriculture* (pp. 59–79). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804244-1.00004-6>
- Bromfield, K. (1984). *Soybean Rust*. American Phytopathological Society.
- Cecchini, G. (2003). Function and structure of complex II of the respiratory chain. *Annual Review of Biochemistry*, 73(2003), 72-77. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.72.121801.161700>

- Chandrasekaran, M., Belachew, S. T., Yoon, E., & Chun, S. C. (2017). Expression of β -1,3-glucanase (GLU) and phenylalanine ammonia-lyase (PAL) genes and their enzymes in tomato plants induced after treatment with *Bacillus subtilis* CBR05 against *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Journal of General Plant Pathology*, 83(1), 7–13. <https://doi.org/10.1007/s10327-016-0692-5>
- Chen, Z., Silva, H., Klessig, D. F. (1993). Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science*, 262(5141), 1883-1886. <https://doi.org/10.1126/science.8266079>.
- Chen, Z., Zheng, Z., Huang, J., Lai, Z., & Fan, B. (2009). Biosynthesis of salicylic acid in plants. *Plant Signaling and Behavior*, 4(6), 493–496. <https://doi.org/10.4161/psb.4.6.8392>
- Chin-A-Woeng, T. F. C., Bloemberg, G. V., Van Der Bij, A. J., Van Der Drift, K. M. G. M., Schripsema, J., Kroon, B., Scheffer, R. J., Keel, C., Bakker, P. A. H. M., Tichy, H. V., De Bruijn, F. J., Thomas-Oates, J. E., & Lugtenberg, B. J. J. (1998). Biocontrol by phenazine-1-carboxamide-producing *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 of tomato root rot caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11(11), 1069–1077. <https://doi.org/10.1094/MPMI.1998.11.11.1069>
- Choudhary, D. K., Prakash, A., Johri, B. N. (2007). Induced systemic resistance (ISR) in plants: mechanism of action. *Indian Journal of Microbiology*, 47(4), 289-297. <https://doi.org/10.1007/s12088-007-0054-2>.
- Compant, S., Reiter, B., Sessitsch, A., Nowak, J., Clément, C., Barka, E. A. (2005). Endophytic Colonization of *Vitis vinifera* L. by Plant Growth- Promoting Bacterium *Burkholderia* sp. Strain PsJN. *Applied and Environmental Microbiology* 71(4), 1685-1693. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.4.1685-1693.2005>.
- CONAB. (2019). Acompanhamento da Safra Brasileira. *Companhia Nacional de Abastecimento*, 5(4), 1–113.
- Cordero-Ramirez, J. D., López-Rivera, R., Figueroa-Lopez, A. M., Mancera-López, M. E., Martínez-Álvarez, J. C., Apodaca-Sánchez, M. A., Maldonado-Mendoza, I. E. (2012). Native soil bacteria isolates in Mexico exhibit a promising antagonistic effect against *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Journal of Basic Microbiology*, 53, 1-10. <https://doi.org/10.1002/jobm.201200128>
- Costa, N. P. da, Mesquita, C. de M., Maurina, A. C., França Neto, J. B., Krzyzanowski, F. C., Oliveira, M. C. N., & Henning, A. A. (2005). Perfil dos aspectos físicos, fisiológicos e químicos de sementes de soja produzidas em seis regiões do Brasil. *Revista Brasileira de Sementes*, 27(2), 172–181. <https://doi.org/10.1590/s0101-31222005000200025>
- de Oliveira, A. G., Murate, L. S., Spago, F. R., Lopes, L. de P., Beranger, J. P. de O., Martin, J. A. B. S., Nogueira, M. A., Mello, J. C. P. de, Andrade, C. G. T. de J., & Andrade, G. (2011). Evaluation of the antibiotic activity of extracellular compounds produced by the *Pseudomonas* strain against the *Xanthomonas citri* pv. *citri* 306 strain. *Biological Control*, 56(2), 125–131. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2010.10.008>
- de Oliveira, A. G., Spago, F. R., Simionato, A. S., Navarro, M. O. P., Da Silva, C. S., Barazetti, A. R., Cely, M. V. T., Tischer, C. A., San Martin, J. A. B., De Jesus Andrade, C. G. T., Novello, C. R., Mello, J. C. P., & Andrade, G. (2016). Bioactive organocopper compound from *Pseudomonas aeruginosa* inhibits the growth of *Xanthomonas citri*

- subsp. citri. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1–12.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00113>
- de Souza, F., Stumer, S., Carrenho, R., & Trufem, S. (2010). Classificação e taxonomia de fungos micorrízicos arbusculares e sua diversidade e ocorrência no Brasil. In Siqueira, J., de Souza, F., Cardoso, E., Tsai, S. M. (Eds.), *Micorrizas: 30 anos de pesquisas no Brasil* (pp. 15–75). UFLA.
- Edreva, A. (2005). Pathogenesis-related proteins: research progress in the last 15 years. *Gen Appl Plant Physiol*, 31(1–2), 105–124.
- Egawa, Y., Umino, K., Ito, Y., & Okuda, T. (1971). Antibiotic YC 73 of pseudomonas origin. II. Structure and synthesis of thioformin and its cupric complex (yc 73). *The Journal of Antibiotics*, 24(2), 124–130. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.24.124>
- EMBRAPA. (2013). Tecnologias de Produção de Soja - Região Central do Brasil 2014. In *Sistemas de Produção*.
http://www.cnpso.embrapa.br/download/publicacao/central_2005.pdf
- Fernandes, H., Michalska, K., Sikorski, M., & Jaskolski, M. (2013). Structural and functional aspects of PR-10 proteins. *FEBS Journal*, 280(5), 1169–1199.
<https://doi.org/10.1111/febs.12114>
- Fletcher, R. A., Gilley, A. (2000). Triazoles as plant growth regulators and stress protectants. In Janick, J. (Eds) *Horticultural Reviews* (pp. 55-137). John Wiley & Sons.
- Fritig, G., Heitz, T., Legrand, M. (1998). Antimicrobial proteins in induced plant defense. *Current Opinion in Immunology*, 10, 16-22.
- Fu, S. F., Wei, J. Y., Chen, H. W., Liu, Y. Y., Lu, H. Y., & Chou, J. Y. (2015). Indole-3-acetic acid: A widespread physiological code in interactions of fungi with other organisms. *Plant Signaling and Behavior*, 10(8).
<https://doi.org/10.1080/15592324.2015.1048052>
- Gleisberg, D. (1992). Phosphate. In *Handbook of Environmental Chemistry* (Vol. 3).
<https://doi.org/10.1007/978-3-540-47108-0-4>
- Godoy, C. V. (2011). Risk and management of fungicide resistance in the Asian soybean rust fungus *Phakopsora pachyrhizi*. In *Fungicide resistance in crop protection: risk and management* (Issue December 2011, pp. 87–95). CABI.
<https://doi.org/10.1079/9781845939052.0087>
- 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 Agropecuaria Brasileira*, 51(5), 407–421. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2016000500002>
- Godoy, C. V., Flausino, A. M., Santos, L. C. M., & del Ponte, E. M. (2009). Eficiência do controle da ferrugem asiática da soja em função do momento de aplicação sob condições de epidemia em Londrina, PR. *Tropical Plant Pathology*, 34(1), 56–61.
<https://doi.org/10.1590/s1982-56762009000100011>
- Goss, M. J., Carvalho, M., & Brito, I. (2017). The Roles of Arbuscular Mycorrhiza and Current Constraints to Their Intentional Use in Agriculture. In M. J. Goss, M. Carvalho, & I. Brito (Eds.), *Functional Diversity of Mycorrhiza and Sustainable Agriculture* (pp. 39–58). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804244-1.00003-4>

- Hartman, G. L., Rupe, J. C., Sikora, E. J., Domier, L. L., Davis, J. A., & Steffey, K. L. (2015). Compendium of Soybean Diseases and Pests, Fifth Edition. In G. L. Hartman, J. C. Rupe, E. J. Sikora, L. L. Domier, J. A. Davis, & K. L. Steffey (Eds.), *Compendium of Soybean Diseases and Pests, Fifth Edition* (5th ed.). The American Phytopathological Society. <https://doi.org/10.1094/9780890544754>
- Heffer, P. (2013). Assessment of Fertilizer Use by Crop at the Global Level. *International Fertilizer Industry Association*, 5(8), 9. www.fertilizer.org/ifa/Home-Page/LIBRARY/Publication-database
- Heinrichs, E., & Muniappan, R. (2018). Integrated pest management for tropical crops: soyabeans. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, 13(055). <https://doi.org/10.1079/PAVSNR201813055>
- Henning, A. A., Manuel, Á., Almeida, R., Godoy, C. V., Dinali, C., Seixas, S., Yorinori, J. T., Costamilan, L. M., Ferreira, L. P., Meyer, M. C., Soares, R. M., Hoffmann-campo, C. B., & Brown, G. G. (2005). Manual de identificação de doenças de soja. Embrapa. *Documentos* 256.
- Hennings, V. (1903). [A few new Japanese Uredinaceae]. *Hedwigia*, 42(S107–S108.)
- Herrera-Medina, M. J., Steinkellner, S., Vierheilig, H., Ocampo Bote, J. A., & García Garrido, J. M. (2007). Abscisic acid determines arbuscule development and functionality in the tomato arbuscular mycorrhiza. *New Phytologist*, 175(3), 554–564. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02107.x>
- Ho, P. (1969): The loess and the origin of chinese agriculture. *The american historical review*, 75(1), 1-36. <https://doi.org/10.2307/1841914>
- Holb, I. J., Schnabel, G. (2007). Differential effect of triazoles on mycelial growth and disease measurements of *Monilinia fructicola* isolates with reduced sensitivity to DMI fungicides. *Crop Protection* 26(2007) 753-759. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2006.07.001>
- Hoppe, H. H., & Koch, E. (1989). Defense Reactions in Host and Nonhost Plants Against the Soybean Rust Fungus (*Phakopsora pachyrhizi* Syd.). *Journal of Phytopathology*, 125(1), 77–88. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1989.tb01058.x>
- Huang, H., Sun, L., Bi, K., Zhong, G., & Hu, M. (2016). The effect of phenazine-1-carboxylic acid on the morphological, physiological, and molecular characteristics of *Phellinus noxius*. *Molecules*, 21(5), 1–10. <https://doi.org/10.3390/molecules21050613>
- Hymowitz, T. (2008). The History of the Soybean. *Soybeans: Chemistry, Production, Processing, and Utilization*, 1–31. <https://doi.org/10.1016/B978-1-893997-64-6.50004-4>
- Juliatti, F. C., Azevedo, L. A. S., Juliatti, F. C. (2017). Strategies of Chemical Protection for Controlling Soybean Rust. *Outlooks on Pest Management* 29(3), 120-123. https://doi.org/10.1564/v29_jun_05
- Jung, S. C., Martinez-Medina, A., Lopez-Raez, J. A., & Pozo, M. J. (2012). Mycorrhiza-Induced Resistance and Priming of Plant Defenses. *Journal of Chemical Ecology*, 38(6), 651–664. <https://doi.org/10.1007/s10886-012-0134-6>
- Killgore, E., Heu, R., & Gardner, D. (1994). First report of soybean rust in Hawaii. *Plant Pest Control*, 78(1216).

- 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>
- Koch, E., Ebrahim Nesbat, F., & Hoppe, H. (1983). Light and electron microscopic studies on the development of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi* Syd.) in susceptible soybean leaves. *Phytopathologische Zeitschrift*, 106, 302–320.
- Kongrit, D., Jisaka, M., Iwanaga, C., Yokomichi, H., Katsube, T., Nishimura, K., Nagaya, T., & Yokota, K. (2007). Molecular cloning and functional expression of soybean allene oxide synthases. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 71(2), 491–498. <https://doi.org/10.1271/bbb.60537>
- Kuromori, T., Seo, M., & Shinozaki, K. (2018). ABA Transport and Plant Water Stress Responses. *Trends in Plant Science*, 23(6), 513–522. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.04.001>
- Langenbach, C., Campe, R., Beyer, S. F., Mueller, A. N., & Conrath, U. (2016). Fighting Asian Soybean Rust. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00797>
- Lopes, Â. C. de A., Vello, N. A., Pandini, F., Rocha, M. de M., & Tsutsumi, C. Y. (2002). Variabilidade e correlações entre caracteres em cruzamentos de soja. *Scientia Agricola*, 59(2), 341–348. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162002000200021>
- Lopes, L. P., Oliveira Jr, A. G., Beranger, J. P. O., Góis, C. G., Vasconcellos, F. C. S., Martin, J. A. B. S., Andrade, C. G. T. J., Mello, J. C. P., & Andrade, G. (2012). Activity of extracellular compounds of *Pseudomonas* sp. against *Xanthomonas axonopodis* in vitro and bacterial leaf blight in eucalyptus. *Tropical Plant Pathology*, 37(4), 233–238. <https://doi.org/10.1590/S1982-56762012000400001>
- Ma, Z., Hua, G. K. H., Ongena, M., Hofte, M. (2016). Role of phenazines and cyclic lipopeptides produced by *pseudomonas* sp. CMR12a in induced systemic resistance on rice and bean. *Environmental Microbiology Reports* 8(5), 896-904. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12454>
- Madigan, M., Martinko, J., Dunlap, P., & Clark, D. (2010). *Microbiologia de Brock* (12th ed.). Artmed.
- Maia, L., Da Silva, F., & Goto, B. (2010). Estrutura, ultraestrutura e germinação de glomerosporos. In J. MSiqueiro, F. de Souza, E. Cardoso, & S. Tsai (Eds.), *Micorrizas: 30 anos de pesquisas no Brasil*. (pp. 75–118). Editora UFLA.
- Molina, L., Constantinescu, F., Michel, L., Reimann, C., Duffy, B., Défago, G. (2003). Degradation of pathogen quorum-sensing molecules by soil bacteria: a preventive and curative biological control mechanism. *FEMS Microbiology Ecology* 45(2003), 71-81. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(03\)00125-9](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(03)00125-9)
- Morton, J. B., & Redecker, D. (2001). Two new families of Glomales, Archaeosporaceae and Paraglomaceae, with two new genera *Archaeospora* and *Paraglomus*, based on concordant molecular and morphological characters. *Mycologia*, 93(1), 181–195. <https://doi.org/10.2307/3761615>
- Munhoz, L. D., Fonteque, J. P., Santos, I. M. O., Navarro, M. O. P., Simionato, A. S., Goya, E. T., Rezende, M. I., Balbi-Pe²2a, M. Isabel, de Oliveira, A. G., & Andrade, G.

- (2017). Control of bacterial stem rot on tomato by extracellular bioactive compounds produced by *Pseudomonas aeruginosa* LV strain. *Cogent Food & Agriculture*, 3(1), 1–16. <https://doi.org/10.1080/23311932.2017.1282592>
- Murithi, H., Beed, F., Soko, M., Haudenschild, J., & Hartman, G. (2015). First report of *Phakopsora pachyrhizi* on soybean causing rust in Malawi. *Plant Disease*, 99.
- Navarro, M. O. P., Simionato, A. S., Barazetti, A. R., Santos, I. M. O. dos, Cely, M. V. T., Chryssafidis, A. L., & Andrade, G. (2017). Disease-Induced Resistance and Plant Immunization Using Microbes. In D. P. Singh, H. B. Singh, & R. Prabha (Eds.), *Plant-Microbe Interactions in Agro-Ecological Perspectives* (Vol. 2). Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-6593-4>
- Novais, R. F., Alvarez, V., Barros, N., Fontes, R., Cantarutti, R., & Neves, J. (2007). *Fertilidade do Solo* (1st ed.). SBCS.
- Pierson, L. S., & Pierson, E. A. (2010). Metabolism and function of phenazines in bacteria: Impacts on the behavior of bacteria in the environment and biotechnological processes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86(6), 1659–1670. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2509-3>
- Pistori, J. F., Simionato, A. S., Navarro, M. O. P., Andreato, M. F. L., Santos, I. M. O., Meneguim, L., Leite Junior, R. P., Oliveira, A. G., & Andrade, G. (2018). Low-molecular-weight metabolites produced by *Pseudomonas aeruginosa* as an alternative to control Huanglongbing in *Citrus sinensis* cv. Valencia. *Tropical Plant Pathology*, 43(4), 289–296. <https://doi.org/10.1007/s40858-018-0231-3>
- Pozo, M., Jung, S., Lopez-Raez, J. A., & Azcón-Aguilar, C. (2010). Impact of arbuscular mycorrhizal symbiosis on plant response to biotic stress: the role of plant defense mechanisms. In *Arbuscular mycorrhizas: physiology and function* (pp. 3–31). Springer.
- Prado, R. de M. (2008). *Nutrição de Plantas* (1st ed.). UNESP.
- Price-Whelan, A., Dietrich, L. E. P., & Newman, D. K. (2006). Rethinking “secondary” metabolism: Physiological roles for phenazine antibiotics. *Nature Chemical Biology*, 2(2), 71–78. <https://doi.org/10.1038/nchembio764>
- Puopolo, G., Masi, M., Raio, A., Andolfi, A., Zoina, A., Cimmino, A., & Evidente, A. (2013). Insights on the susceptibility of plant pathogenic fungi to phenazine-1-carboxylic acid and its chemical derivatives. *Natural Product Research*, 27(11), 956–966. <https://doi.org/10.1080/14786419.2012.696257>
- Ramos, A., & Martins, M. (2010). Fisiologia de micorrizas arbusculares. In Siqueira, J., de Souza, F., Cardoso, E., Tsai, S. M. (Eds.), *Micorrizas: 30 anos de pesquisas no Brasil: 30 anos de pesquisa no Brasil* (pp. 133–152). UFLA.
- Rampazo, L. G. L. (2004). *Avaliação de agentes biológicos e seus produtos na incidência de lesões foliares do cancro cítrico*. (Dissertação Mestrado em Microbiologia), Universidade Estadual de Londrina, Londrina
- Rather, I. A., Awasthi, P., Mahajan, V., Bedi, Y. S., Vishwakarma, R. A., & Gandhi, S. G. (2015). Molecular cloning and functional characterization of an antifungal PR-5 protein from *Ocimum basilicum*. *Gene*, 558(1), 143–151. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2014.12.055>
- Robert-Seilaniantz, A., Grant, M., & Jones, J. D. G. (2011). Hormone Crosstalk in Plant

- Disease and Defense: More Than Just JASMONATE-SALICYLATE Antagonism. *Annual Review of Phytopathology*, 49(1), 317–343. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-073009-114447>
- Schmitz, H. K., Medeiros, C.-A., Craig, I. R., & Stammler, 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., Levy, L., & DeVries-Paterson, R. (2005). First Report of Soybean Rust Caused by *Phakopsora pachyrhizi* in the Continental United States. *Plant Disease*, 89(7).
- Sediyama, T. (2009). Tecnologias de produção e usos da soja. *Mecenas*, 1, 314.
- Sediyama, T. (2013). Tecnologia de produção de sementes de soja. *Mecenas*, 352.
- Selosse, M.-A., Bessis, A., & Pozo, M. J. (2014). Microbial priming of plant and animal immunity: symbionts as developmental signals. *Trends in Microbiology*, 22(11), 607–613. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.07.003>
- Shalini, K., Kumar, N., Drabu, S., & Sharma, P. K. (2011). Advances in synthetic approach to and antifungal activity of triazoles. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 7, 668–677. <https://doi.org/10.3762/bjoc.7.79>
- Shanmugaiah, V., Mathivanan, N., & Varghese, B. (2010). Purification, crystal structure and antimicrobial activity of phenazine-1-carboxamide produced by a growth-promoting biocontrol bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* MML2212. *Journal of Applied Microbiology*, 108(2), 703–711. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04466.x>
- Sierotzki, H., & Scalliet, G. (2013). A review of current knowledge of resistance aspects for the next-generation succinate dehydrogenase inhibitor fungicides. *Phytopathology*, 103(9), 880–887. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-01-13-0009-RVW>
- Sikora, E. J., Delaney, D. P., Delaney, M. A., Lawrence, K. S., & Pegues, M. (2009). Evaluation of Sequential Fungicide Spray Programs for Control of Soybean Rust. *Plant Health Progress*, 10(1), 23. <https://doi.org/10.1094/php-2009-0402-01-rs>
- Silva Vasconcellos, F. C. Da, de Oliveira, A. G., Lopes-Santos, L., Oliveira Beranger, A. P. De, Torres Cely, M. V., Simionato, A. S., Pistori, J. F., Spago, F. R., de Mello, J. C. P., San Martin, J. A. B., Andrade, C. G. T. D. J., & Andrade, G. (2014). Evaluation of antibiotic activity produced by *Pseudomonas aeruginosa* LV strain against *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*. *Agricultural Sciences*, 05(01), 71–76. <https://doi.org/10.4236/as.2014.51008>
- Simionato, A. S., Navarro, M. O. P., Barazetti, A. R., dos Santos, I. M. O., Spago, F. R., Chryssafidis, A. L., Andrade, G. (2017). Strategies for biological control and antagonisms. In Singh, D. P., Singh, H. B., Prabha, R. (Eds). *Plant-Microbe Interactions in Agro-Ecological Perspectives*. (pp. 221-244). Springer.
- Simionato, A. S., Navarro, M. O. P., de Jesus, M. L. A., Barazetti, A. R., da Silva, C. S., Simões, G. C., Balbi-Peña, M. I., de Mello, J. C. P., Panagio, L. A., de Almeida, R. S. C., Andrade, G., & de Oliveira, A. G. (2017). The effect of phenazine-1-carboxylic acid on mycelial growth of *Botrytis cinerea* produced by *Pseudomonas aeruginosa* LV strain. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01102>

- Singh, M., Kumar, A., Singh, R., & Pandey, K. D. (2017). Endophytic bacteria: a new source of bioactive compounds. *3 Biotech*, *7*(5), 1–14. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0942-z>
- Spoel, S. H.; Dong, X. How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nature Review Immunology*, *12*(2), 89-100. <https://doi.org/10.1038/nri3141>.
- Stangarlin, J., Kuhn, O., Toledo, M., Portz, R., Schwan-Estrada, K., & Pascholati, S. (2011). A defesa vegetal contra fitopatógenos. *Scientia Agraria Paranaensis*, *10*(1), 18–46. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.18188/sap.v10i1.5268>
- Stammler, G., Brix, H. D., Glaettli, A., Semar, M., Schoefl, U. Biological properties of the carboxamide boscalid including recent studies on its mode of action In: Proceedings of the XVI International Plant Protection Congress, 2007, Alton.: British Crop Council Publications, Hampshire, pp 16-21.
- Thakur, M., Sohal, B. S. (2013). Role of elicitors in inducing resistance in plants against pathogen infection: a review. *International Scholarly Research Notices*, *2013*(762412). <https://doi.org/10.1155/2013/762412>
- Tonelli, M. L., Ibañez, F., Taurian, T., Argüello, J., & Fabra, A. (2013). Analysis of a phenylalanine ammonia-lyase gene sequence from *Arachis hypogaea* L. and its transcript abundance in induced systemic resistance against *Sclerotium rolfsii*. *Journal of Plant Pathology*, *95*(1), 191–195. <https://doi.org/10.4454/JPP.V95I1.029>
- van Loon, L. C., Rep, M., & Pieterse, C. M. J. (2006). Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. *Annual Review of Phytopathology*, *44*(1), 135–162. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.070505.143425>
- van Loon, L. C., van Strien, E. A. (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *55*(2), 85-97. <https://doi.org/10.1006/pmpp.1999.0213>
- Vega-Celedón, P., Canchignia Martínez, H., González, M., & Seeger, M. (2016). Biosynthesis of indole-3-acetic acid and plant growth promoting by bacteria. *Cultivos Tropicales*, *37*(especial), 33–39. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.5158.3609>
- Vita, N., Landolfi, G., Baslé, A., Platsaki, S., Lee, J., Waldron, K. J., & Dennison, C. (2016). Bacterial cytosolic proteins with a high capacity for Cu(I) that protect against copper toxicity. *Scientific Reports*, *6*(December), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep39065>
- Vittal, R., Paul, C., Hill, C. B., & Hartman, G. L. (2014). Characterization and quantification of fungal colonization of phakopsora pachyrhizi in soybean genotypes. *Phytopathology*, *104*(1), 86–94. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-12-0334-R>
- von Schmeling, B., Kulka, M. (1966). Systemic Fungicidal Activity of 1,4-Oxathiin Derivatives. *Science*, *152*(3722), 659-660. <https://doi.org/10.1126/science.152.3722.659>
- Wang, C., Zhang, J., Chen, H., Fan, Y., & Shi, Z. (2010). Antifungal activity of eugenol against *Botrytis cinerea*. *Tropical Plant Pathology*, *35*(3), 137–143. <https://doi.org/10.1590/S1982-56762010000300001>
- Wang, J., Song, L., Gong, X., Xu, J., & Li, M. (2020). Functions of jasmonic acid in plant regulation and response to abiotic stress. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(4). <https://doi.org/10.3390/ijms21041446>

- Wright, G. D. (2017). Opportunities for natural products in 21st century antibiotic discovery. *Natural Product Reports*, 34(7), 694–701. <https://doi.org/10.1039/c7np00019g>
- Xiang, Y., Zhang, Y., Wang, C., Liu, S., & Liao, X. (2018). Effects and inhibition mechanism of phenazine-1-carboxamide on the mycelial morphology and ultrastructure of *Rhizoctonia solani*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 147(September 2017), 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2017.10.006>
- Xu, S., Pan, X., Luo, J., Wu, J., Zhou, Z., Liang, X., He, Y., & Zhou, M. (2015). Effects of phenazine-1-carboxylic acid on the biology of the plant-pathogenic bacterium *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 117, 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2014.10.006>
- Yan, S., & Dong, X. (2014). Perception of the plant immune signal salicylic acid. *Current Opinion in Plant Biology*, 20, 64–68. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2014.04.006>
- Yang, J., Duan, G., Li, C., Liu, L., Han, G., Zhang, Y., & Wang, C. (2019). The Crosstalks Between Jasmonic Acid and Other Plant Hormone Signaling Highlight the Involvement of Jasmonic Acid as a Core Component in Plant Response to Biotic and Abiotic Stresses. *Frontiers in Plant Science*, 10(October), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01349>
- Yorinori, J. T., Paiva, W. M., Frederick, R. D., Costamilan, L. M., Bertagnolli, P. F., Hartman, G. E., Godoy, C. V., & 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, W. (2018). Global pesticide use: Profile, trend, cost / benefit and more. *Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences*, 8(1), 1–27. www.iaees.org
- Zhang, Y., Wang, C., Su, P., & Liao, X. (2015). Control effect and possible mechanism of the natural compound phenazine-1-carboxamide against botrytis cinerea. *PLoS ONE*, 10(10), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140380>

4. ARTIGO I

Chapter 13

Evaluation of Bioproducts and Mycorrhizal Inoculation in Asian Soybean Rust Control, Nutrient Leaf Contents and Yield Under Field Conditions



André Riedi Barazetti, Ane Stéfano Simionato, Miguel Octavio Pérez Navarro, Mickely Liuti Dealis, Jean Marcos Soares Matos, Flávio Modolon, Matheus Felipe de Lima Andreato, Gabriel Liuti and Galdino Andrade

Abstract Asiatic Soybean Rust (ASR), caused by the fungus *Phakopsora pachyrhizi*, is the main disease affecting soybean crop, generating high losses each year, with insurgence of fungicide resistance. One strategy to decrease the fungus resistance is to use natural antimicrobial compounds to control ASR. Therefore, the objective of this work was to evaluate the potential for ASR control of a fraction produced during secondary metabolism by a *Pseudomonas aeruginosa* LV strain, inoculating plants with *Rhizophagus clarus*, an arbuscular mycorrhizal fungus (AMF) produced *in vitro*, evaluating the treatments effect on grain yields. Plants were treated with two doses of F4A semi-purified fraction ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$, $10 \mu\text{g mL}^{-1}$), mixed or not with commercial fungicides (Unizeb Gold[®] or Sphere Max[®]). Scanning electron microscopy (SEM) and light microscopy images showed that the association between F4A in both doses plus Sphere Max[®] provided protection, similarly to Unizeb Gold[®] or Sphere Max[®], against ASR, causing ultrastructural changes in *P. pachyrhizi* hyphae and spores. Mycorrhizal colonization, plant growth and height increased in plants treated with F4A10 + Sphere Max. Plants treated with F4A1 compound produced 4.64 ton ha^{-1} , followed by F4A1 + Sphere (4.51 ton ha^{-1}), F4A10 + Sphere (4.44 ton ha^{-1}) and Unizeb+Sphere (4.36 ton ha^{-1}).

Keywords *Rhizophagus clarus* · Natural compounds · Soybean rust · Inoculant

A. R. Barazetti · A. S. Simionato · M. O. P. Navarro · M. L. Dealis · J. M. S. Matos ·
F. Modolon · M. F. de Lima Andreato · G. Liuti · G. Andrade (*)

Department of Microbiology, Microbial Ecology Laboratory, Londrina State University,
Londrina, PR, Brazil e-mail: andradeg@uel.br

© Springer Nature Switzerland AG 2019 193

D. Zúñiga-Dávila et al. (eds.), *Microbial Probiotics for Agricultural Systems, Sustainability in Plant and Crop Protection*, https://doi.org/10.1007/978-3-030-17597-9_13

13.1 Introduction

Brazil is one of the main grain producers in the world, being soybean the most important crop with a total area planted around 31,151 hectares and 118,885 thousand tonnes produced in the 2017/18 harvest (Conab 2018). To gain high productivity, a series of managements practices are essential, such as those needed for disease control and the use of chemical fertilizers. Management may increase production costs and cause serious environmental problems such as soil and water contamination, salinization, and also the selection resistant pathogens.

Among the diseases affecting soybean, the Asian Soybean Rust (ASR), caused by the fungus *Phakopsora pachyrhizi*, is responsible for main yield losses. The most common symptoms of ASR are small lesions with burnt yellow color, formed in the abaxial part of the leaf, associated to foliar chlorosis, leading to a premature defoliation and early maturation (Hartman et al. 2015). According to the Fungicide Resistance Action Committee (FRAC), *P. pachyrhizi* is becoming resistant to the main fungicide applied for control. The report (<http://www.frac-br.org/>) showed that, in areas with intensive use of carboxamide, the efficiency of *P. pachyrhizi* control is rapidly decreasing, in spite of a natural mutation in the subunit C (in position 186F). Also, fungicides specific to Asian Rust act through three action modes: demethylation inhibitors (IDM, triazoles), external quinone inhibitor (IQe, strobirulin) and succinate dehydrogenase inhibitor (ISDH, carboxamide). Other fungicides too, such as triazole and strobirulin, are losing efficacy vs *P. pachyrhizi*. The main risk related to the loss of efficacy of the fungicides available today is that there is no new mode of action to control Asian Rust, in the coming years.

Considering other management issues, the scarcity of natural reserves of phosphorus, an essential nutrient for plant development, promoted the search for tools which favor plant P assumption by roots, such as arbuscular mycorrhizae (Tapia- Torres et al. 2016).

The problems described above highlight the challenge to discover new fungicides for ASR management. New practices and technologies are essential to achieve a more sustainable agriculture, eg. the use of microbial inoculants and/or of biological antimicrobial compounds to control plant diseases. The interaction among microorganisms and plants occurs in the rhizosphere, a space under the direct influence of roots growth (Barea et al. 2005). Arbuscular mycorrhizal (AMF) fungi are obligatory symbionts that colonize most terrestrial plants, helping in plant nutrition, growth and disease tolerance, being one of the most important components of the rhizosphere (Smith and Read 2008). AMF act providing a root extension of plant, expanding the nutrient adsorption area beyond the rhizosphere, especially useful for phosphorus, which they release into root cells (Smith and Read 2008). AMF also form stable soil aggregates (Lehmann et al. 2017), increase resistance to water stress and erosion (Garg and Chandel 2009; Gonçalves et al. 2015; Querejeta 2017), protect roots from soil pathogens (Jung et al. 2012), thus globally sustaining agricultural productions (Andrade 2008; Cely et al. 2016).

Members of the *Pseudomonas* genus live in soils of diverse habitats. They have a high adaptive capacity and produce several metabolites with antimicrobial activity, including growth promotion and eliciting of plant defense or resistance pathways.

Among these metabolites, the phenazines are very important. They form a is a group of aromatic heterocyclic compounds, formed during the secondary metabolism, that could help farmers in the competition with pathogens. Phenazines diffuse or enter though the microbial membrane, resulting in oxidative phosphorylation decoupling and generating superoxide radicals and hydrogen peroxide, harmful to the cell. They also affect the electrons flow and the enzymes related to cellular respiration (Navarro et al. 2017). Different types of phenazines are known: phenazine- 1- carboxylic acid (PCA), due to its oxy-reduction activity and superoxide accumulation, has a wide antimicrobial activity, mainly against phytopathogenic fungi such as *Botrytis cinerea* (Simionato et al. 2017) and *Phellinus noxius*, the casual agent of brown root rot disease (Huang et al. 2016). PCA is a precursor of other types of phenazine,

such as phenazine-1-carboxamide (PCN) that also has antifungal activity against phytopathogenic microorganisms (Zhang et al. 2015). In addition, a natural organo-copper antibiotic compound (OAC), is also produced by *P. aeruginosa* LV strain, with high antimicrobial activity against *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, the causal agent of citrus canker (de Oliveira et al. 2016) and others plant diseases.

The objective of this work was to evaluate the effect of a semi-purified fraction produced by *P. aeruginosa* strain LV, called F4A (PCA, PCN, OAC and Indolin-3- one) to control ASR in plants inoculated with AM fungi *R. clarus*.

13.2 Material and Methods

13.2.1 In vitro Experiment

An *in vitro* assay was carried out to evaluate the effect of different doses of F4A (1 $\mu\text{g ml}^{-1}$, 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ and 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$) on *P. pachyrhizis* spore germination. Spores collected from uredia were inoculated on water agar plus F4A, in different concentrations in Petri dishes, in three replicates. 300 μL of a spore suspension with $2.15 \cdot 10^4 \text{ ml}^{-1}$ were inoculated and incubated. After 12 h the spore germination was evaluated with a photomicroscope (40 \times), measuring the percentage of spore germination.

13.2.2 Field Experiment

13.2.2.1 Experimental Area

The experiment was carried out during the 2016/17 harvest at the experimental farm of Londrina State University, PR, Brazil. The soil is classified as Dystroferric Red Ferralsol (FAO 2006). Soil chemical analysis is: pH (CaCl₂) 6.44; Al³⁺ 0.00 cmolc Kg⁻¹; Ca²⁺ 8.45 cmolc Kg⁻¹; Mg²⁺ 2.46 cmolc Kg⁻¹; K⁺ 0.15 cmolc Kg⁻¹; P 15.60 cmolc Kg⁻¹; C 12.14 cmolc Kg⁻¹. Mean temperature and precipitation from November 2016 to March 2017 were 24.2 °C and 698.8 mm respectively (Iapar 2017).

13.2.2.2 Soybean Experiment

Pre-emerging weed control was carried out with N (phosphonmethyl) glycine (Roundup[®] WG, Monsanto), using the recommended dose. Pests and insects control was performed with imidacloprid (Imida Gold 700[®] WG, UPL), tiametoxam + lambda-cialotrina (Engeo TMPleno[®], Syngenta) and espiromesifene (Oberon[®], Bayer) using the recommended doses.

Soybean seeds NS 5959 IPRO (Nidera Sementes, Brazil) were treated with metalaxyl- M and fludioxonil (Maxim[®] XL, Syngenta) and Imidacloprid + Tiodicarbe (Cropstar[®], Bayer) at the recommended doses, before sowing.

A randomized block design with seven treatments (Uni + Sphe; F4A1; F4A1 + Uni; F4A1 + Sphe; F4A10; F4A10 + Uni and F4A10 + Sphe) was performed, with two doses of F4A (1 and 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) combined with Unizeb Gold[®] or Sphere Max[®], in five replicates per treatment. The agronomic treatment consisted on applying fungicides Unizeb Gold plus Sphere Max.

The fertilizer dose used was 250 Kg ha⁻¹ of N-P₂O₅-K₂O 10-15-15 (Fertilize[®] Fertilizers, Fertilize Agrícola Ltda). All treatments were also inoculated with *Bradyrhizobium japonicum*

(SEMIA 5079 and SEMIA 5080, Rizo Plus[®], Rhizobacter), according to the recommended doses.

The inoculum of *R. clarus* was obtained from the collection of the Microbial Ecology Laboratory, Londrina, Brazil, produced under *in vitro* conditions in association with transformed carrot (*Daucus carota* L.) roots (Ri T-DNA), in a continuous subculture of young colonized roots fragments in minimal mineral medium M (Bécard and Fortin 1988). The inoculation of *R. clarus* in soybean seeds was mixed with peat according to patent No BR 1020140173897 (07/15/2014). The inoculum concentration used had approximately 47.5 fungal spores, colonized roots and mycelia per g of seed.

Seeds were coated with *B. japonicum*, *R. clarus* and graphite before sowing to avoid friction during the procedure, providing a uniform stand, and sowed with hand planter. Plot dimension was of 6.0 m × 3.0 m. The area used for data collection was 9 m², equivalent to three central lines, excluding 1.0 m from the edges, besides the two external lines. Soybeans were grown from November 2016 to March 2017.

13.2.2.3 Plant Measurements

Five soybean plants from three central adjacent lines were used to measure AM root colonization and root length before flowering at the R1 stage, according to Fehr and Caviness classification for soybean development stages (1977). Plants were brought to the laboratory and the secondary roots selected, cleaned and stained according to Phillips and Hayman (1970). Colonization was determined by the grid line method (Giovanetti and Mosse 1980).

Shoot dry weight was determined from five plants collected as described above, dried at 50 °C until a constant mass was obtained and dry weight was determined. The total height was determined by field measurement of 5 plants per plot of the central lines, in stage R5.1, and the average was calculated. Grain yield was evaluated by harvesting 3 m² of the central lines of each plot, and expressed as tonnes ha⁻¹.

Phosphorus and nitrogen foliar contents were evaluated on the third trefoil, starting from the apex without petiole at the R1 stage. Samples were dried at 50 °C and ground. Phosphorus was extracted by nitroperchloric digestion and quantified (Murphy and Riley 1962). Nitrogen was extracted by sulfur digestion and quantified (Sarruge and Haag 1974).

The ASR severity (leaf area covered with symptoms) was estimated weekly after the first application of products, using diagrammatic scale (Godoy et al. 2006) to calculate the area under the disease progress curve (AUDPC).

In addition, soybean leaf samples were dried at CO₂ critical point (BALTEC CPD 030 Critical Point Dryer). After drying, the slides were gold coated (BALTEC SDC 050 Sputter Coater) and visualized by scanning electron microscopy (SEM) (FEI Quanta 200), to verify ultrastructural changes in the spores and mycelium of *P. pachyrhizi*.

13.2.2.4 Statistical Analysis

The Shapiro-Wilk test was applied ($\alpha = 5\%$). Homogeneity of variances was verified by the Bartlett test ($\alpha = 5\%$). After all results met the assumptions, variance analysis was applied. The means were compared by the Duncan test, at $p < 0.1$ (Nelson 1989) using R. Statistical program.

13.3 Results

AM colonization was greater in plants treated with F4A10 + Sphe with 75% of colonization, followed by F4A10, F4A1 and F4A1 + Sphe. AM colonization decreased in plants treated with Unizeb Gold in both doses when compared to Uni + Sphe Max agronomic treatment (Table 13.1).

The nitrogen foliar contents increased in plants treated with Uni + Sphe, when compared with F4A1 + Sphe. The phosphorus foliar content was higher in plants treated with F4A10 + Sphe, followed by F4A1 + Sphe, Uni + Sphe and F4A10 + Uni. The lowest content was observed in plants treated with F4A1 (Table 13.1).

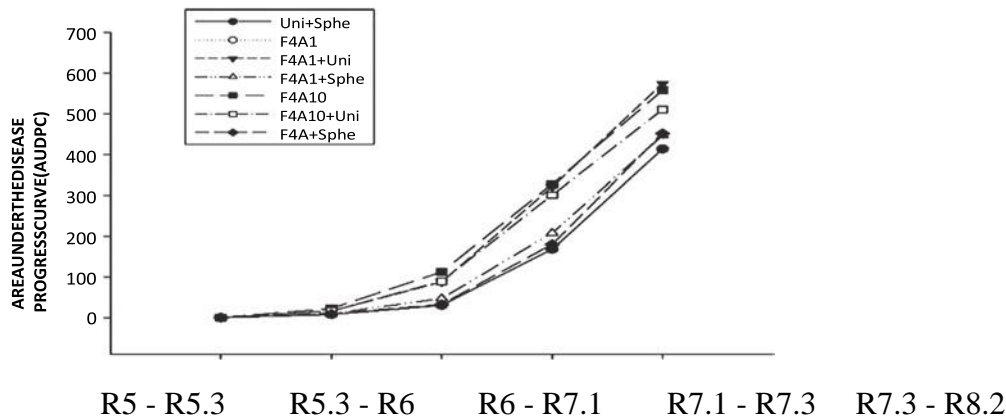
F4A10 + Sphe showed highest total protein contents, differing significantly from F4A1 + Uni and F4A10. The other treatments did not show any differences (Table 13.1).

F4A10 + Sphe enhanced plant height when compared to the agronomic treatment suggesting a plant growth promotion effect, and was followed by F4A1, F4A10 + Uni and F4A1 + Uni, all differing significantly from the treatment with Uni + Sphe. Shoot dry weight F4A10 + Uni and F4A1 + Uni were the highest. In contrast, F4A1 and F4A10 + Sphe were the lowest (Table 13.1).

Table 13.1 Parameters evaluated under field conditions per treatment: Arbuscular mycorrhizal colonization (AM); nitrogen and phosphorus foliar contents; seed proteins; plant height and shoot dry weight; yield

Treatment	AM (%)	N (mg plant ⁻¹)	P (mg plant ⁻¹)	Seed proteins (mg seed ⁻¹)	Height (cm)	Shoot dry weight (g)	Yield (tonnes ha ⁻¹)
Uni + Sphe	68.58 b	46.98 a	3.12 a	313.68 ab	52.52 cd	46.44 cd	4.37 a
F4A1	75.81 a	45.47 ab	2.98bc	311.13 ab	62.12 ab	40.48 e	4.64 a
F4A1 + Uni	70.69 b	44.86 ab	3.08 ab	307.93 b	60.96 ab	52.47 ab	4.32 ab
F4A1 + Sph	74.52 a	43.57 b	3.11 a	326.16 ab	58.20bc	44.77 d	4.51 a
F4A10	76.18 a	43.85 ab	3.07 ab	302.81 b	58.28bc	49.78bc	3.68 bc
F4A10 + Uni	69.58 b	43.57 ab	3.06 a	314.64 ab	61.33 ab	55.29 a	4.35 ab
F4A10 + Sph	77.84 a	45.30 ab	3.12 a	335.75 a	66.56 a	38.48 e	4.45 a

Values followed by the same letters had no significant difference ($p < 0.10$) Duncan test



Stages

Fig. 13.1 Area under the disease progress curve of treatments for Asian soybean rust, field conditions

Plants treated with F4A1 compound produced highest yield, with F4A1 + Sphe, F4A10 + Sphe and Uni + Sphe, all significantly different from F4A10 (Table 13.1).

Finally, the AUDPC decreased with Uni + Sphe, being the most effective on ASR control, followed by F4A10 + Sphe and F4A1 + Sphe, while F4A1 + Uni, F4A1 and F4A10 (Fig. 13.1).

In the preliminary *in vitro* test, it was observed that the spores of *P. pachyrhizi* had 85% of germination, with intense hyphal growth after 12 h. When applying F4A $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, a drastic reduction of hyphae development, with 75% of spores germination was observed. F4A $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ was effective to control hyphal growth, showing only 40% of spores germinated. Finally, the $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ dose was 100% effective, completely inhibiting spore germination, and growth of hyphae (Fig. 13.2).

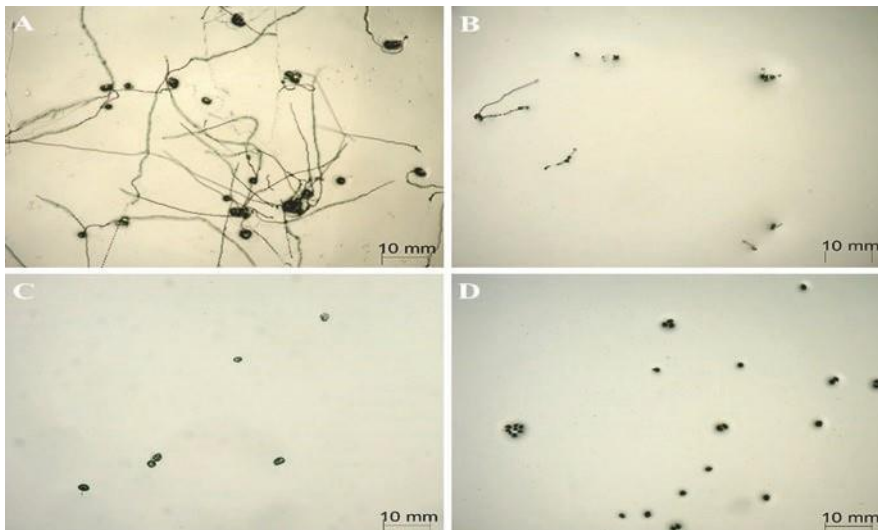


Fig. 13.2 Light microscopy images of *Phakopsora pachyrhizi* spore development under different F4A doses. Treatments are: control (a), F4A at $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ (b), F4A at $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ (c) and F4A at $100 \mu\text{g mL}^{-1}$

In addition, SEM images of *P. pachyrhizi* infecting soybean leaves showed spores and uredia in non-treated plants, with high hyphal growth, uredia formation and large number of spores. Dead spores and a lower number of pustules were observed in agronomic treatment (Uni + Sphe) (Fig. 13.3).

F4A1 apparently did not affect *P. pachyrhizi*. F4A1 + Uni presented a large number of unviable spores, while F4A1 + Sphere Max reduced the number of fungal pustules, consequently reducing spore numbers.

The application of F4A10 reduced the development of fungal mycelium and large number of unviable spores were observed. In F4A10 + Uni a great presence of spores, hyphae and pustules were observed, but the spores and mycelia were unviable; F4A10 + Sphe showed greater fungicide activity against *P. pachyrhizi*, with larger number of dead spores and hyphae.

13.4 Discussion

The application of Unizeb Gold (Mancozeb) reduced AM colonization. This product is a fungicide that acts by contact. The same results were observed by other authors, where Mancozeb was applied in the aerial part of plants with a negative effect on root colonization and spore density in the rhizosphere (Channabasava et al. 2015; Mallmann et al. 2018).

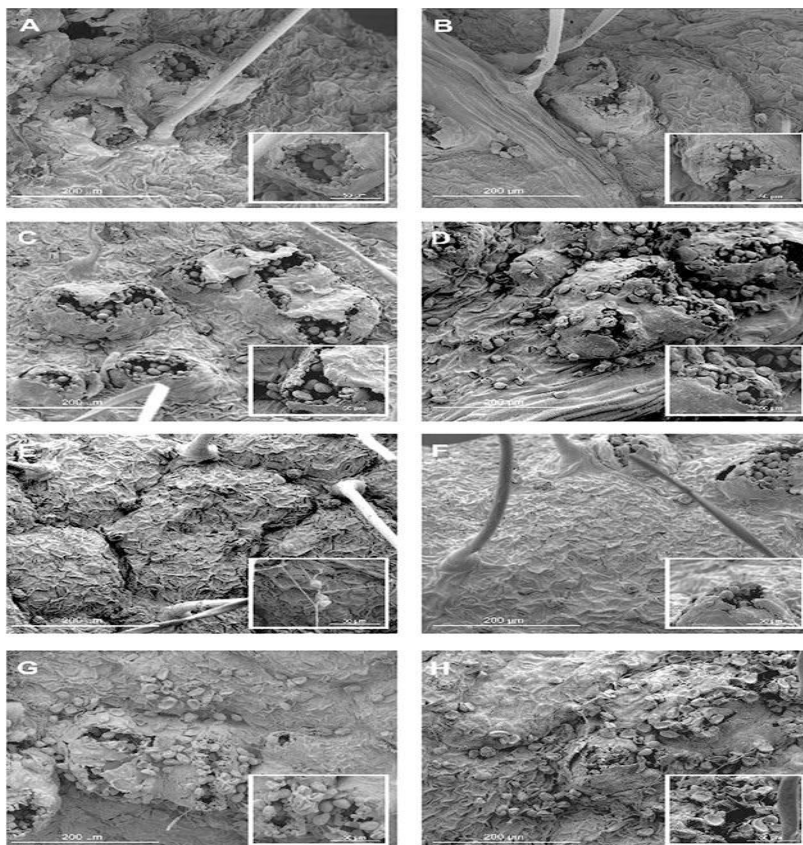


Fig. 13.3 Scanning electron microscopy images of soybean leaf's infected with *Phakopsora pachyrhizi* under different treatments. Treatments are: control (a), Uni + Sphe (b), F4A1 (c), F4A1 + Uni (d), F4A1 + Sphe (e), F4A10 (f), F4A10 + Uni (g) and F4A10 + Sphe (h). Scale bars:

200 µm (insights magnification = 4×)

During the first weeks of the association between a mycorrhizal fungus and a host plant, the fungus tends to suppress plant growth, since it competes for nutrients, especially phosphorus. In later stages of association the reverse occurs, where symbiosis is already established and transfer nutrients from the fungus to the plant is greater (Bethlenfalvai et al. 1983).

Uni + Sphe application slightly decreased AM colonization after 60 days, but P content increased, suggesting that plants did not suffer growth depletion in the initial stages of the mycorrhizal establishment and consequently had more nutrients, especially P.

Plants treated with F4A10 + Sphe showed highest growth. Sphere Max is a systemic fungicide, composed of trifloxystrobin and ciproconazole. The first one belongs to the strobilurin group, inducers of physiological and metabolic responses, inhibiting ethylene biosynthesis and increasing cytokinin production, extending the time of green pigmentation (Han et al. 2012). Also, F4A10 has an indolin-3-one that may promote plant growth, as observed in others studies in greenhouse experiments (unpublished data).

It was observed that F4A10 alone reduced yield and had low ASR control, which reduces the leaf area for photosynthesis and consequently the production of pods and grain filling. In contrast, F4A1 alone showed the highest values for yield. PCN produced by *Pseudomonas* sp. CMR12a, triggered the induced systemic resistance (ISR) in rice and bean (Ma et al. 2016). However it was highly dependent on the phenazine concentration, being optimum at concentrations of 0.1 mM and 1 mM, and losing effect at lower and higher concentrations. In addition, F4A1 plus Sphere max and F4A10 plus Sphere max were the 2nd and 3rd in yield respectively.

As mentioned, F4A has molecules with oxy-reduction activities, superoxide accumulation and antimicrobial activity against phytopathogens, plus to possible growth promotion in plants and ISR. This, added to the Sphere Max effect, indicates a synergism between the natural compound and the commercial product.

The AUDPC analysis showed that Uni + Sphe, F4A1 + Sphe and F4A10 + Sphe were the most effective for ASR control, which is evident at the R6 stage. As observed in the *in vitro* assay, 1, 10 and 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ doses of F4A were able to control the development of *P. pachyrhizi*. The same effect was observed in SEM images where F4A that, in association with Sphere Max, caused several changes in the fungal structures, as spores and hyphae.

Natural compounds from different origins have been related to an antimicrobial action against different pathogens in the recent years, including *P. pachyrhizi*. Dorigheo et al. (2015) demonstrated that coffee oil combined with half dose of fungicide, inhibited 100% of uredospore germination in greenhouse conditions. In field conditions the severity of disease was reduced by 23%.

In another SEM study, da Silva et al. (2014) observed that the essential oils of *Hyptis marruboides*, *Aloysia gratissima* and *Cordia verbenacea* completely inhibited spore germination under *in vitro* conditions. However, there are few studies about the antibiotic effect of secondary metabolites from *P. aeruginosa* against phytopathogenic bacteria or fungi, in the field.

F4A semi-purified fraction, specially OAC, showed an effect against many bacteria and fungi (Oliveira et al. 2011; Lopes et al. 2012; Munhoz et al. 2017). PCN did not show activity

against *Pectobacterium carotovorum*. However, it increased the productivity and number of fruits in uninfected plants, and also increased peroxidase, polyphenol oxidase and phenylalanine ammonia lyase activities, suggesting that it may induce systemic acquired resistance (SAR) (Munhoz et al. 2017). PCA, another compound present among the F4A metabolites, demonstrated antifungal activity against *Botrytis cinerea* (Simionato et al. 2017).

The results showed that F4A compounds have antimicrobial activity against different microorganisms. In this work, we showed that *P. pachyrhizi* spores and hyphae suffer serious damage when treated with F4A. However, new studies are needed to determine action mechanisms of F4A compounds.

13.5 Conclusion

Unizeb Gold showed a reduction in AM colonization. Nutrient foliar contents and shoot dry weight were higher in agronomic treatment. Plants treated with F4A1, F4A1 + Sphere max and F4A10 + Sphere max showed higher yields. Uni + Sphe, F4A1 + Sphe and F4A10 + Sphe were the most effective treatments to control ASR, causing structural changes in hyphae and spores. However, the application of 10 µg ml⁻¹ F4A alone did not show ASR control, and consequently decreased yield.

Acknowledgements The authors are grateful to Laboratory for Electron Microscopy and Microanalysis – LMEM UEL/FINEP for carrying out SEM analysis and to the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for supporting this project with grants PIBID, MSc, PhD and Research Productivity.

References

- Andrade G (2008) Role of functional groups of microorganisms on the rhizosphere microcosm dynamics. In: Varma A, Abbott L, Werner D HR (ed) Plant surface microbiology. Springer, Berlin/Heidelberg, pp 51–69.
- Barea, J. M., Pozo, M. J., Azcón, R., & Azcón-Aguilar, C. (2005). Microbial co-operation in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 56, 1761–1778. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri197>.
- Bécard, G., & Fortin, J. A. (1988). Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytologist*, 108(2), 211–218.
- Bethlenfalvay, G. J., Bayne, H. G., & Pacovsky, R. S. (1983). Parasitic and mutualistic associations between a mycorrhizal fungus and soybean: the effect of phosphorus on host plant–endophyte interactions. *Physiologia Plantarum*, 57, 543–548. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1983.tb02783.x>.
- Cely, M. V. T., de Oliveira, A. G., de Freitas, V. F., et al. (2016). Inoculant of arbuscular mycorrhizal fungi (*Rhizophagus clarus*) increase yield of soybean and cotton under field conditions. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00720>.
- Channabasava, A., Lakshman, H., & Jorquera, M. (2015). Effect of fungicides on association of arbuscular mycorrhiza fungus *Rhizophagus fasciculatus* and growth of Proso millet (*Panicum miliaceum* L.). *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 15, 35–45. <https://doi.org/10.4067/S0718-95162015005000004>.

- Conab. (2018). *Acompanhamento da safra brasileira*. <http://conab.gov.br>
- da Silva, A. C., de Souza, P. E., Amaral, D. C., et al. (2014). Essential oils from *Hyptis marrubioides*, *Aloysia gratissima* and *Cordia verbenacea* reduce the progress of Asian soybean rust. *Acta Scientiarum Agronomy*, 36, 159–166. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v36i2.17441>.
- de Oliveira, A. G., Murate, L. S., Spago, F. R., Lopes, L., Beranger, J. P. d. O., Martin, J. A. B. S., Nogueira, M. A., de Mello, J. C. P., Andrade, C. G. T. d. J., & Andrade, G. (2011). Evaluation of the antibiotic activity of extracellular compounds produced by the *Pseudomonas* strain against the *Xanthomonas citri* pv. *Citri* 306 strain. *Biological Control*, 56(2), 125–131.
- de Oliveira, A. G., Spago, F. R., Simionato, A. S., et al. (2016). Bioactive organocopper compound from *Pseudomonas aeruginosa* inhibits the growth of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00113>.
- Dorighello, D. V., Bettiol, 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>.
- FAO. (2006). *World Reference Base for soil resources 2006: A framework for international classification, correlation and communication*. Rome: World Soil Resources Reports.
- Fehr, W. R., & Caviness, C. E. (1977). *Stages of soybean development*. Iowa State University Cooperative Extension Service, Special Report 80.
- Garg, N., & Chandel, S. (2009). Arbuscular mycorrhizal networks: Process and functions. *Sustain Agric*, 2, 907–930. https://doi.org/10.1007/978-94-007-0394-0_40.
- Giovanetti, M., & Mosse, B. (1980). An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *The New Phytologist*, 84, 489–500. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1980.tb04556.x>.
- Godoy, C. V., Koga, L. J., & Canteri, M. G. (2006). Diagrammatic scale for assessment of soybean rust severity. *Fitopatologia Brasileira*, 31, 63–68. <https://doi.org/10.1590/S0100-41582006000100011>.
- Gonçalves, P. J. R. O., Oliveira, A. G., Freitas, V. F., et al. (2015). Plant growth-promoting microbial inoculant for *Schizolobium parahyba* pv. *parahyba*. *Rev Árvore*, 39, 663–670. <https://doi.org/10.1590/0100-67622015000400008>.
- Han, S. H., Kang, B. R., Lee, J. H., et al. (2012). A trifloxystrobin fungicide induces systemic tolerance to abiotic stresses. *Plant Pathology Journal*, 28, 101–106. <https://doi.org/10.5423/PPJ.NT.11.2011.0207>.
- Hartman, G. L., Rupe, J. C., Sikora, E. J., et al. (2015). *Compendium of soybean diseases and pests* (5th ed.). The American Phytopathological Society.
- Huang, H., Sun, L., Bi, K., et al. (2016). The effect of phenazine-1-carboxylic acid on the morphological, physiological, and molecular characteristics of *Phellinus noxius*. *Molecules*, 21, 1–10. <https://doi.org/10.3390/molecules21050613>.
- IAPAR. (2017). Dados Diários de Londrina. <http://www.iapar.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=1828>

- Jung, S. C., Martinez-Medina, A., Lopez-Raez, J. A., & Pozo, M. J. (2012). Mycorrhiza-induced resistance and priming of plant defenses. *Journal of Chemical Ecology*, 38, 651–664. <https://doi.org/10.1007/s10886-012-0134-6>.
- Lehmann, A., Leifheit, E. F., & Rillig, M. C. (2017). Mycorrhizas and soil aggregation. In N. C. Johnson & G. C. JJ (Eds.), *Mycorrhizal mediation of soil* (pp. 241–262). Amsterdam: Elsevier.
- Lopes, L. P., Oliveira, A. G., Jr., Beranger, J. P. O., et al. (2012). Activity of extracellular compounds of *Pseudomonas* sp. against *Xanthomonas axonopodis* *in vitro* and bacterial leaf blight in eucalyptus. *Trop Plant Pathol*, 37, 233–238. <https://doi.org/10.1590/S1982-56762012000400001>.
- Ma, Z., Hua, G. K. H., Ongena, M., et al. (2016). Role of phenazines and cyclic lipopeptides produced by *Pseudomonas* sp. CMR12a in induced systemic resistance on rice and bean. *Environmental Microbiology Reports*, 8, 896–904. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12454>.
- Mallmann, G. C., Sousa, J. P., Sundh, I., et al. (2018). Placing arbuscular mycorrhizal fungi on the risk assessment test battery of plant protection products (PPPs). *Ecotoxicology*, 27, 1–10. <https://doi.org/10.1007/s10646-018-1946-0>.
- Munhoz, L. D., Fontequ, J. P., Santos, I. M. O., et al. (2017). Control of bacterial stem rot on tomato by extracellular bioactive compounds produced by *Pseudomonas aeruginosa* LV strain. *Cogent Food & Agriculture*, 3, 1–16. <https://doi.org/10.1080/23311932.2017.1282592>.
- Murphy, J., & Riley, J. P. (1962). A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta*, 27, 31–36. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)88444-5](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)88444-5).
- Navarro, M. O. P., Simionato, A. S., Barazetti, A. R., et al. (2017). *Disease-induced resistance and plant immunization using microbes*. Singapore: Springer.
- Nelson, L. (1989). A statistical editor's viewpoint of statistical usage in horticultural science publications. *Hortscience*, 24, 53–57.
- Phillips, J. M., & Hayman, D. S. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*, 55(1), 158–IN18.
- Querejeta, J. I. (2017). Soil water retention and availability as influenced by mycorrhizal symbiosis. In *Mycorrhizal mediation of soil* (pp. 299–317). Amsterdam: Elsevier.
- Sarruge, J., & Haag, H. (1974). *Análises químicas em plantas*. Piracicaba: ESALQ.
- Simionato, A. S., Navarro, M. O. P., de Jesus, M. L. A., et al. (2017). The effect of phenazine-1-carboxylic acid on mycelial growth of *Botrytis cinerea* produced by *Pseudomonas aeruginosa* LV strain. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01102>.
- Smith and Read. (2008). Mycorrhizal symbiosis. *Soil Science*, 137, 204. <https://doi.org/10.1097/00010694-198403000-00011>.

Tapia-Torres, Y., Rodríguez-Torres, M. D., Elser, J. J., et al. (2016). How to live with phosphorus scarcity in soil and sediment: Lessons from bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 82, 4652–4662.

Zhang, Y., Wang, C., Su, P., & Liao, X. (2015). Control effect and possible mechanism of the natural compound phenazine-1-carboxamide against *Botrytis cinerea*. *PLoS One*, 10, 1–17. [https:// doi.org/10.1371/journal.pone.0140380](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140380)

5. ARTIGO II

Indução de resistência por bioativos de *Pseudomonas aeruginosa* cepa LV no manejo da Ferrugem Asiática da Soja

André Riedi Barazetti¹, Galdino Andrade^{1*}

¹Laboratório de Ecologia Microbiana, Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, CEP 86057-970, Brasil.

* **Correspondente:**

Galdino Andrade

andradeg@uel.br

Resumo

Bactérias do gênero *Pseudomonas* são conhecidas por produzirem metabólitos secundários com propriedades antimicrobianas e a capacidade de indução de resistência em plantas. A ativação destes mecanismos pode ser uma alternativa ao uso excessivo de defensivos agrícolas, principalmente em culturas importantes como a da soja, no controle do fungo biotrófico *Phakopsora pachyrhizi*, causador da Ferrugem Asiática da Soja, responsável por grande prejuízo econômico. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito de metabólitos secundários da fração semi-purificada F4A produzidos pela *P. aeruginosa* cepa LV, na indução de resistência em plantas de soja infectadas pelo fungo *P. pachyrhizi* por análise metabolômica de plantas tratadas e não tratadas com a fração F4A. O experimento de campo, teve o delineamento em blocos casualizados, e duas concentrações da fração F4A (1 e 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) com e sem adição de fungicidas comerciais (Unizeb Gold® ou Sphere Max®). As plantas tratadas com Sphere Max® isolado e com adição da fração F4A, nas duas concentrações, apresentaram maior concentração de flavonoides glicosilados como naringenina, kaempferol luteolina e genisteína. Todos os tratamentos avaliados apresentaram alta produção de ácido octadecatrienoico e o ácido eicosatetraenoico. Esses resultados demonstram que a aplicação desses compostos induz a produção de flavonóides com propriedades antioxidantes, possivelmente para estabilização de espécies reativas de oxigênio (EROS).

Palavras-chave: Antimicrobianos, fenazinas, metabolômica, flavonóides, *Phakopsora pachyrhizi*.

1 Introdução

A soja (*Glycine max* L.) é considerada a mais importante cultura do Brasil, tanto em área cultivada quanto na produção de grãos, com 359 milhões de hectares plantados e uma produção de 115,0 milhões de toneladas na safra 2018/19, classificando o país como maior produtor mundial (CONAB, 2019).

Atualmente, dentre as estratégias mais utilizadas para alcançar altos valores de produtividade está o uso de defensivos agrícolas no controle de doenças. Porém, quando aplicados em doses excessivas e sem o manuseio adequado, podem acarretar em sérios problemas ambientais, como a seleção de microrganismos resistentes e a contaminação de solos, águas subterrâneas e rios (Godoy et al., 2009; Godoy et al., 2016). Dentre as principais doenças da soja, a Ferrugem Asiática da Soja (FAS) é a mais importante, podendo gerar perdas de até 90% da produtividade, sendo responsável por bilhões em prejuízos, no Brasil e no mundo (Langenbach et al., 2016).

Aqui falta um parágrafo contendo uma consideração sobre os custos da lavoura somente com fungicidas e sobre a quebra de resistência que os fitopatógenos vem alcançando.

A necessidade de novos métodos de controle de doenças e pragas vem apontando para os estudos de indução de resistência da planta (IR) de forma promissora. Por estes, se busca compreender como ativar e controlar os mecanismos naturais de defesa vegetal, seja por vias de Resistência Sistêmica Induzida (RSI) e Resistência Sistêmica Adquirida (RSA) (Chen et al., 1993; Fritig et al., 1998; Van Loon & Van Strien 1999; Compant et al., 2005; Choudhary et al., 2007).

As bactérias do gênero *Pseudomonas* estão amplamente difundidas na natureza, particularmente em ambientes úmidos. Algumas espécies com potencial patogênico, estão sendo bastante estudadas em relação à produção de uma grande variedade de metabólitos secundários que podem agir no metabolismo de outros microrganismos (de Oliveira et al., 2016; Simionato et al., 2017).

Os estudos realizados no Laboratório de Ecologia Microbiana, levaram a seleção de uma cepa de *P. aeruginosa* (LV) da qual vários compostos do metabolismo secundário foram isolados chegando a uma fração semi-purificada identificada por F4A. Esta fração possui, dentre outros compostos, três bioativos com propriedades antimicrobianas, sendo: fenazina-1-carboxilica (PCA) com atividade contra *Botrytis cinerea* (Simionato et al., 2017), fenazina-1-caboxiamida (PCN) que apresenta atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* (Cardozo et al., 2013) e a fluopsina C, metaloantibiótico, capaz de inibir o crescimento de

Xanthomonas citri pv. *citri* (de Oliveira et al., 2011) e *X. axonopodis* (Lopes et al., 2012). Além disto, a fração F4A induziu resistência em *Citrus sinensis* pv. Valencia, induzindo a expressão do gene da β -1,3 glucanase, enzima responsável pela degradação das β -1,3 glucanas, componentes da parede celular de fungos (Pistori et al., 2018).

Técnicas como a análise metabolômica podem auxiliar na melhor compreensão da dinâmica bioquímica que ocorre nas interações biológicas, através do estudo dos metabólitos produzidos. Na agricultura, pode auxiliar na obtenção de dados importantes sobre as respostas das plantas a estresses bióticos, como ataque de patógenos, nas relações mutualistas, ou mesmo a estresses abióticos, como deficiência nutricional, pressão antropogênica, etc (Dixon et al., 2006).

O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito de metabólitos secundários da fração semi-purificada F4A produzidos pela *P. aeruginosa* cepa LV, na indução de resistência em plantas de soja infectadas pelo fungo *P. pachyrhizi*, por análise metabolômica de plantas tratadas e não tratadas com a fração F4A.

2 Materiais e Métodos

2.1 Produção e Extração dos Bioativos Microbianos

A bactéria *P. aeruginosa* cepa LV foi isolada inicialmente de uma lesão velha de cancro cítrico de folha de laranja (*Citrus sinensis* cv. Valencia) no município de Astorga, Brasil (Rampazo, 2004). Para produção dos compostos do metabolismo secundário, a cepa LV foi cultivada por 10 dias a 28°C e aeração contínua em caldo nutriente (CN) com adição de 5 mg L⁻¹ de CuCl₂. Após o cultivo a cultura foi centrifugada (9.000 rpm 15 min 4°C) (Sorval RC-5C, EUA) para obtenção do sobrenadante livre de células, o qual foi reduzido o seu volume a 10 % do inicial por secagem em estufa de aeração forçada à 60°C (SS Scientific, Brasil). O concentrado foi submetido três vezes à partição líquido-líquido com diclorometano na proporção de 2:1 (v:v).

A fase diclorometano (FD) obtida, foi concentrada em rotaevaporador (Büchi R-215, Suíça) a 45°C e 100 rpm, submetida a Cromatografia Líquida a Vácuo (CLV), em coluna de vidro (20 mm de diâmetro, 350 mm de altura), com sílica gel 60 (0,063 – 0,200 mm, Merck) e fase móvel com uma mistura de diclorometano e acetato de etila 1:1 (v:v) de acordo com Munhoz *et al.* (2017), da qual se obteve a fração semi-purificada chamada de F4A.

2.2 Experimento em Campo

2.2.1 Área experimental

Os experimentos em campo foram realizados na safra de 2016/17 na Universidade Estadual de Londrina, PR, Brasil (-23.341223 S, -51.213271 W). O solo da área foi classificado como Dystroferic Red Ferralsol (FAO, 2006) e a análise química pH (CaCl₂) 6.44; Al³⁺ 0.00 cmolc Kg⁻¹; Ca²⁺ 8.45 cmolc Kg⁻¹; Mg²⁺ 2.46 cmolc Kg⁻¹; K⁺ 0.15 cmolc Kg⁻¹; P 15.60 cmolc Kg⁻¹; C 12.14 cmolc Kg⁻¹. O clima predominante é o Cfa (Subtropical úmido) (Köpper, 1884). A temperatura média e precipitação acumulada de Novembro de 2016 a março de 2017 foram de 24.2°C e 69,88 L respectivamente (IAPAR, 2017).

2.2.2. Tratos culturais

O controle de plantas daninhas foi realizado com N (*phosphonomethyl*) *glycine* (Roundup WG, Monstanto), nas doses recomendadas. O controle de pragas foi realizado com a aplicação de Imidacloprido (Imida Gold 700 WG, UPL), Tiametoxam + Lambda-Cialotrina (EngeoTMPleno, Syngenta) e Espiromesifeno (Oberon, Bayer) nas doses recomendadas.

Para o experimento foram utilizadas sementes de soja da variedade NS 5959 IPRO (Nidera Sementes, Brasil), tratadas com Metalaxyl-M e Fludioxonil (Maxim® XL, Syngenta) e Imidacloprid + Tiodicarbe (Cropstar, Bayer) nas doses recomendadas.

2.2.3. Experimento

O delineamento experimental foi em blocos casualizados com oito tratamentos e cinco repetições onde foram avaliadas duas concentrações de F4A (1 e 10 µg mL⁻¹) com e sem adição de Unizeb Gold® e/ou Sphere Max® (Uni+Sph; Uni+Sph2; F4A1; F4A1+Uni; F4A1+Sph; F4A10; F4A10+Uni e F4A10+Sph). Uni+Sph foi utilizado como controle para a análise metabolômica, e por isso foi realizado em duplicata. Cada parcela foi dimensionada com 6,0 m x 3,0 m tendo uma área total de 9 m², equivalente as três linhas centrais, excluindo 1.0 m das bordas, além das duas linhas externas.

A área do experimento foi adubada com 250 Kg ha⁻¹ de NPK 10-15-15 (Fertilize® Fertilizers, Fertilize Agrícola Ltda). Todos os tratamentos foram inoculados com Rizo Plus®, Rhizobacter (*Bradyrhizobium japonicum* cepas SEMIA 5079 e SEMIA 5080.), nas doses recomendadas. A inoculação com fungo micorrízico arbuscular *R. clarus* foi realizada de acordo com Cely *et al.* (2016) com uma concentração de inoculo de aproximadamente 47,5 esporos do fungo por grama de semente.

Para aplicação aérea, tanto da fração F4A quanto dos produtos fitossanitários comerciais, foi utilizado um pulverizador costal com cilindro de CO₂ (Agro Pesquisa, Brazil) com vazão de 200 L ha⁻¹. Foram realizadas duas aplicações, a primeira em estádio R5.1, logo após os primeiros sintomas da doença, e a segunda em estádio R6. Após 24 horas de cada uma das aplicações foram coletadas 5 folhas por parcela do experimento e armazenadas em gelo seco durante a coleta, gerando dois tempos de amostragem (A1 e A2).

2.3 *Análise metabolômica*

2.3.1 Preparo das amostras

As amostras de folhas coletadas foram lavadas e maceradas em nitrogênio líquido, em seguida 0,2 g da amostra foi transferida para tubos tipo Falcon, aos quais foram adicionados 10 mL de metanol/água (80:20). O material foi submetido em banho ultrassônico por 30 minutos (Branson 1510-DTH, EUA), e em seguida centrifugado por 10 minutos a 6.000 rpm (Jouan CR3i, EUA). Por fim, o sobrenadante foi coletado com seringa estéril e filtrado diretamente em vials de 1,5 mL para realização das análises cromatográficas.

A metabolômica foi realizada a partir de três amostras de plantas de soja escolhidas ao acaso dentro das cinco repetições de cada tratamento. As amostras foram analisadas isoladamente, mas também para preparação de um *pool* de amostras, contendo 20 µL de cada. O *pool* foi utilizado para determinar a reprodutibilidade do equipamento, bem como a estabilidade dos metabólitos.

2.3.2 Análise Metabolômica

A metabolômica foi realizada em um cromatógrafo *Ultra Fast Liquid Chromatograph* (UFLC) LC-20AD Shimadzu Prominence (Shimadzu, Japão) e um Espectrômetro de Massa de Alta Resolução com fonte de ionização por eletropulverização (MicrOTOF-Q III Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA).

As amostras foram preparadas na concentração de 1 mg mL⁻¹, filtradas em filtros de PTFE (Millex 0,22 mm x 13 mm, Millipore) para, em seguida 1 µL ser injetado no sistema cromatográfico. Foi utilizada uma coluna Kinetex C18 (2,6µ, 100A, 150 x 2,1 mm, Phenomenex) acoplada a um forno com temperatura e a vazão de 50 °C e 0,3 mL min⁻¹, respectivamente. A fase móvel foi acetonitrila (B) e água (A), ambas com ácido fórmico a 0,1% (v/v). O perfil de eluição foi de 0-2 min 3% de B, 2-25 min 3 a 25% de B, 25-40 min 25 a 80% de B e 40-43 min 80% de B. As amostras foram analisadas no modo de íon negativo e no modo de íon positivo. Como gás nebulizador e de secagem foi utilizado o Nitrogênio (4

Bar e 9 L/min respectivamente), aplicado na tensão capilar de 2500 Kv. A identificação dos compostos foi realizada por dados de UV, massa exata (MS) e perfil de fragmentação em comparação com os dados publicados na literatura. Para alguns compostos foram realizadas confirmações por co-injeção de padrão autêntico.

Os dados foram processados no software DataAnalysis 4.2 (Bruker Daltomics). O software Metalign foi utilizado para o pós-processamento dos dados. Para a análise de clusters e análise de componentes principais (ACP) foi utilizada a plataforma Metaboanalyst 3.0.

3 Resultados e discussão

A partir da análise metabolômica os tratamentos Uni+Sph e Uni+Sph2 houve diferença somente entre os tempos de aplicação (Fig. 1A), sendo que alguns dos compostos que mais variaram foram o ácido octadecatrienoico (ácido α -linolenico) mais expresso na amostragem 1 e a daidzeina e naringenina mais expressas na amostragem 2. Quanto à análise de componentes principais, o primeiro (PC1) representou 36,5% da variação dos dados, enquanto o segundo componente principal (PC2) representou 20,5%, somados representam 57,0% da variação dos dados. Foi possível observar a formação de dois clusters entre as amostragens 1 e 2, embora sejam quimicamente semelhantes (Fig. 1B).

Comparando todos os tratamentos na amostragem 1, não foi possível observar uma clara formação de clusters, no entanto é possível sugerir a formação de até 6 grupos (Fig. 2A). Por outro lado, a comparação dos tratamentos na amostragem 2 revela claramente a formação de quatro principais grupos, sendo o primeiro formado por F4A10+Uni, o segundo por F4A1 e F4A1+Uni, o terceiro por Uni+Sph, Uni+Sph2 e F4A10+Sph, e o quarto por F4A1+Sph e F4A10 (Fig. 2B), tendo que os dois últimos apresentaram maior expressão de flavonoides naringenina, kaempferol, luteolina e genisteina. A variação dos dados foi de 27,3% no PC1 e de 17,2% no PC2, representando 44,5% das informações obtidas (Fig. 3).

O produto comercial Sphere max® é um fungicida sistêmico composto dos ingredientes ativos Ciproconazol e Trifloxistrobina, pertencentes aos grupos químicos Triazol e Estrobilurina respectivamente. Triazóis atuam como inibidores da enzima citocromo P450 14 α -desmetilase, interferindo diretamente na conversão de lanosterol em ergosterol, composto importante na síntese da parede celular fúngica. A falta do ergosterol leva a desorganização da estrutura celular e afeta a fluidez da bicamada lipídica, interrupção do metabolismo da quitina e da síntese de enzimas da membrana plasmática, além de causar danos diretos à membrana (Watson *et al.*, 1989; Sagatova *et al.*, 2015). Triazóis possuem ainda ação tóxica à germinação

de esporos, à formação de tubos germinativos e formação de apressório, no desenvolvimento do haustório e crescimento micelial no tecido hospedeiro (Pontzen & Scheinpflug, 1989; Twizeyimana & Hartman, 2017). Já as estrobilurinas atuam inibindo a respiração mitocondrial através do bloqueio da transferência de elétrons no complexo III (complexo bc₁) da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (Venancio *et al.*, 2003).

Esse efeito pode ser observado em testes de campo, Barazetti *et al.* (2019) observou que Uni+Sph, F4A1+Sph e F4A10+Sph, foram os mais efetivos no controle da FAS, atrasando a progressão da doença, além de provocar alterações ultraestruturais em esporos e hifas do fungo *P. pachyrhizi*. Observaram ainda, em testes *in vitro*, que F4A1 e F4A10 inibiram o crescimento micelial e reduziram a porcentagem de germinação de esporos.

Nos tratamentos onde foi realizada a aplicação de Sphere max® ocorreu indução da produção de flavonoides. Entre os compostos identificados mais importantes para a separação dos grupos, estão: naringenina, kaempferol, luteolina e genisteína.

Não há na literatura dados que relacionem fungicidas dos grupos químicos acima citados à produção de flavonoides. No entanto, fungicidas a base de estrobilurinas tem sido relacionados ao efeito priming em plantas, uma forma diferente de resistência induzida, causada por um estímulo químico ou biológico, que envolve o acúmulo de proteínas de sinalização latentes que não são usadas até que haja um estresse subsequente, quando então são ativadas e levam a planta a desenvolver uma resposta imune mais rápida. Essa hipótese foi comprovada por Beckers & Conrath (2007) ao demonstrarem que a exposição de plantas de *Arabidopsis* ao benzo(1,2,3,)-thiadiazole 7-carbothioic acid S-methyl ester (BTH), promoveu o acúmulo de transcritos de MPK3 e MPK6 e de suas respectivas proteínas em estado inativo, indicando o efeito priming.

Herns *et al.* (2002) trabalhando com o princípio ativo Piraclostrobina, do grupo químico das estrobilurinas, verificaram que houve aumento das respostas de defesa em plantas de tabaco após aplicação do antifúngico em resposta a infecção pelo vírus do mosaico do tabaco e elicitou uma maior acumulação de proteínas PR-1 em resposta a novas infecções. Em ambiente controlado, Skandalis *et al.* (2016) verificaram que a Piraclostrobina atrasou o desenvolvimento do vírus do mosaico do pepino e da *P. syringae* pv. *tomato* após aplicação do composto em níveis sistêmicos.

Comparando os tratamentos Uni+Sph e F4A10+Sph observou que ambos são quimicamente semelhantes, e só houve diferença entre os tempos de amostragem (Fig. 4 e Fig. 5). Já, entre F4A10 e F4A10+Sph é possível observar diferenças entre os tratamentos através da análise dos componentes principais. Entre os componentes identificados PC1

representou 40,2% da variação dos dados, enquanto PC2 27,4%, juntos representaram 67,6% da variação dos dados (Fig. 6). Apigenina, kaempferol, luteolina e ácido octadecatrienoico foram mais expressos no tratamento F4A10, enquanto naringenina, feoforbideo A, saponina, ácido eicosatetraenoico (ácido araquidônico) e esfingolipídios foram mais expressos no tratamento F4A10+Sph. Ambos tiveram uma alta expressão de genisteína (Fig. 7).

E por fim, ao analisar os tratamentos F4A1 e F4A10 nos dois tempos de amostragem, foi verificado que no F4A1 há acúmulo de ácido eicosatetraenoico, daidzeína, genisteína, feoforbideo A e pterocarpanos, enquanto em F4A10 de esfingolipídios, apigenina, luteolina, ácido octadecatrienoico e naringenina. Ambos apresentaram acúmulo na produção de kaempferol e saponina (Figs. 8 e 9).

A ISR pode ser induzida por várias estruturas bacterianas, incluindo estruturas da membrana externa, lipopolissacarídeos, flagelos, sideróforos e compostos voláteis, sendo dependente das vias do ácido jasmônico e do etileno para sua expressão na planta (Choudhary et al., 2007).

As fenazinas têm mostrado ser capazes de ativar a ISR em plantas. A inoculação de *P. aeruginosa* em de arroz foi capaz de estimular as defesas da planta contra o fungo *Magnaporthe grisea*, causador da Brusone do arroz. A Piocianina (PYO) foi crucial para elicitar a ISR, uma vez que doses de 25 η M, 1 η M e 100 η M foram capazes de reduzir significativamente a infecção por *M. grisea*, no entanto o mesmo efeito não foi observado contra *Rhizoctonia solani* (De Vleeschauwer et al., 2006). A indução da ISR também poderia explicar os resultados obtidos por Barazetti et al. (2019), que trabalhando com a fração F4A1, observaram um incremento nos valores de produtividade, com produção de 4,64 ton ha⁻¹, 6,2% a mais que Uni+Sph.

Uma das características das fenazinas é a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS). Nas plantas, EROS atuam como moléculas sinalizadoras envolvidas nos processos de crescimento, desenvolvimento e respostas de defesa contra patógenos. São gerados em plastídeos, peroxissomos, mitocôndrias, citosol e apoplastos (Tripathy & Oelmüller, 2012).

As células primariamente usam o oxigênio para gerar energia por meio da fosforilação oxidativa, nesse processo a geração de ATP é acoplada com uma reação em que quatro elétrons e quatro prótons são adicionados ao O₂ para formar duas moléculas de H₂O. No entanto, quando a molécula de O₂ ganha apenas um elétron e há a formação do ânion superóxido (O₂^{*-}), essa espécie altamente reativa de oxigênio tende a ganhar mais três elétrons e quatro prótons visando a formação da H₂O, entretanto durante esse processo uma série de reações acontece com a produção de outras EROS, como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂),

radical hidroxila (OH^*) e peroxinitrito (ONOO^-). O desequilíbrio entre a produção de EROs e sua desintoxicação por reações enzimáticas e não enzimáticas leva a estresse oxidativo, resultando em danos fotooxidativos ao DNA, proteínas e lipídeos, e conseqüentemente, morte celular (Tripathy & Oelmüller, 2012).

Flavonóides possuem propriedades antioxidantes bem conhecidas devido a presença de um grupo B-ring catechol e a presença de uma dupla ligação C2-C3 em conjugação com um grupo oxo no C4. O anel serve para doar hidrogênio/elétron para estabilizar EROs e a ligação dupla C2-C3 para ligar íons de metais de transição como ferro e cobre (Lopez-Lazaro, 2009).

A produção da fitoalexina gliceolina é a principal resposta de defesa das plantas de soja contra ataques de fungos, sendo sintetizada primariamente a partir de daidzeina. Gliceolinas tem demonstrado possuir uma atividade importante como antioxidante com potencial para eliminação de EROs (Kim *et al.*, 2010, 2012; Cheng *et al.*, 2015), nos levando a crer que a maior expressão do flavonoide daidzeina em plantas tratadas com o composto F4A pode estar relacionada a atividades antioxidantes.

O mesmo princípio vale para os flavonoides kaempferol (Wang *et al.*, 2006, Heijnen *et al.*, 2001), apigenin (Fidelis *et al.*, 2018) e luteolin (Lopez-Lazaro, 2009) que tem sido descritos na literatura como eficientes no sequestro de superóxidos.

F4A10+Sph apresentou ainda maior produção de esfingolipídios e feoforbídeo A. O primeiro desempenha papel importante na estruturação da membrana plasmática, além de atuar em diversos outros processos, como sinalização célula-célula, formação de parede celular (Lynch & Dunn, 2004), fechamento estomático dependente de ácido abscísico (ABA) (Guo *et al.*, 2012) e morte celular programada (PCD) (Luttgeharm *et al.*, 2015). Já o Pheophorbide A é um derivado da degradação da clorofila, decorrente do processo natural de senescência das plantas de soja, após a finalização do enchimento de grãos (Hörtensteiner *et al.*, 1998). No entanto a senescência pode ocorrer de forma prematura quando há estresses bióticos e abióticos, como a infecção por patógenos como o fungo *P. pachyrhizi* (Hartman *et al.*, 2015).

No geral, todos os tratamentos avaliados quanto aos componentes principais apresentaram ainda maior produção de derivados de ácidos graxos, como o ácido octadecatrienoico e o ácido eicosatetraenoico. Provavelmente estão relacionados ao processo de desenvolvimento dos grãos de soja, que começa no estágio fenológico R5 e vai até R6, estádios em que foram coletadas as amostras do primeiro e segundo tempo de amostragem respectivamente. Ácidos graxos poliinsaturados são componentes majoritários de lipídios em grãos de soja e são responsáveis pela baixa estabilidade oxidativa (Kinney, 1996). Quando

armazenadas, as sementes que possuem esses lipídios como forma principal de reserva se sujeitam a uma deterioração lenta e consistente pela exposição a oxigênio, formando hidroperóxidos, outros ácidos oxigenados e radicais livres (Wilson & Macdonald, 1986).

4 Conclusões

Os resultados obtidos indicam que a aplicação da fração F4A produzida no metabolismo secundário de *P. aeruginosa* cepa LV, que contém, entre outros compostos fenazinas, induzem a resistência em plantas de soja através da expressão de espécies reativas de oxigênio num primeiro momento, levando a planta a produzir, por consequência, compostos com propriedades antioxidantes, como flavonoides.

5 Agradecimentos

Os autores são gratos a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) que mediante bolsas de PIBIC, MSc., PhD e produtividade em pesquisa, tornaram esse estudo possível. Um agradecimento especial ao Laboratório de Produtos Naturais e Espectrometria de Massas (LaPNEM), UFMS, pelo auxílio na análise metabolômica.

6 Referências Bibliográficas

- Barazetti AR, Simionato AS, Navarro MOP, Dealis ML, Matos JMS, Modolon F, Andreato MFL, Liuti G, Andrade G. 2019.** Evaluation of Bioproducts and Mycorrhizal Inoculation in Asian Soybean Rust Control, Nutrient Leaf Contents and Yield Under Field Conditions. In: *Microbial Probiotics for Agricultural Systems. Sustainability in Plant and Crop Protection*. Cham: Springer, 193-204.
- Bécard G, Fortin JA. 1988.** Early events of vesicular–arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytologist* **108**: 211–218.
- Beckers GJ, Conrath U. 2007.** Priming for stress resistance: from the lab to the field. *Current Opinion in Plant Biology* **10**: 425–431.
- Cardozo VF, Oliveira AG, Nishio EK, Perugini MRE, Andrade CGTJ, Silveira WD, Durán N, Andrade G, Kobayashi RKT, Nakazato G. 2013.** Antibacterial activity of extracellular compounds produced by a *Pseudomonas* strain against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*

12: 1–8.

Cely MVT, de Oliveira AG, de Freitas VF, de Luca MB, Barazetti AR, dos Santos IMO, Gionco B, Garcia G V., Prete CEC, Andrade G. 2016. Inoculant of arbuscular mycorrhizal fungi (*Rhizophagus clarus*) increase yield of soybean and cotton under field conditions. *Frontiers in Microbiology* **7**: 1–9.

Chen Z, Silva H, Klessig DF. 1993. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science* **262**: 1883-1886.

Cheng Q, Li N, Dong L, Zhang D, Fan S, Jiang L, Wang X, Xu P, Zhang S. 2015. Overexpression of soybean isoflavone reductase (GmIFR) enhances resistance to phytophthora sojae in soybean. *Frontiers in Plant Science* **6**: 1–11.

Choudhary DK, Prakash A, Johri BN. 2007. Induced systemic resistance (ISR) in plants: mechanism of action. *Indian Journal of Microbiology* **47**: 289-297.

Compant S, Reiter B, Sessitsch A, Nowak J, Clément C, Barka EA. 2005. Endophytic Colonization of *Vitis vinifera* L. by Plant Growth- Promoting Bacterium *Burkholderia* sp. Strain PsJN. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 1685-1693.

CONAB. 2019. Acompanhamento da Safra Brasileira. *Companhia Nacional de Abastecimento* **5**: 1–113.

Dixon RA, Gang DR, Charlton AJ, Fiehn O, Kuiper HA, Reynolds TL, Tjeerdema RS, Jeffery EH, German JB, Ridley WP, et al. 2006. Applications of metabolomics in agriculture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**: 8984–8994.

FAO. 2006. *World Reference Base for Soil Resources 2006: A Framework for International Classification, Correlation and Communication*. Rome: World Soil Resources Reports.

Fidelis QC, Faraone I, Russo D, Aragão Catunda-Jr FE, Vignola L, de Carvalho MG, de Tommasi N, Milella L. 2019. Chemical and Biological insights of *Ouratea hexasperma* (A. St.-Hil.) Baill.: a source of bioactive compounds with multifunctional properties. *Natural Product Research* **33**: 1500–1503.

Fritig G, Heitz T, Legrand M. 1998. Antimicrobial proteins in induced plant defense. *Current Opinion in Immunology*, **10**: 16-22.

Godoy CV, Seixas CDS, Soares RM, Marcelino-Guimarães FC, Meyer MC, Costamilan LM. 2016. Asian soybean rust in Brazil: Past, present, and future. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, **51**: 407-421.

Godoy CV, Flausino AM, Santos LCM, del Ponte EM. 2009. Eficiência do controle da ferrugem asiática da soja em função do momento de aplicação sob condições de epidemia em Londrina, PR. *Tropical Plant Pathology* **34**: 56–61.

Hartman GL, Rupe JC, Sikora EJ, Domier LL, Davis JA, Steffey KL. 2015. *Compendium of Soybean Diseases and Pests, Fifth Edition* (GL Hartman, JC Rupe, EJ Sikora, LL Domier, JA Davis, and KL Steffey, Eds.). The American Phytopathological Society.

Heffer P. 2017. Assessment of Fertilizer Use by Crop at the Global Level. *International Fertilizer Industry Association* **5**: 9.

Heijnen CGM, Haenen GRMM, Van Acker FAA, Van Der Vijgh WJF, Bast A. 2001. Flavonoids as peroxynitrite scavengers: The role of the hydroxyl groups. *Toxicology in Vitro* **15**: 3–6.

- Herms S, Seehaus K, Koehle H, Conrath U. 2002.** A strobilurin fungicide enhances the resistance of tobacco against tobacco mosaic virus and *Pseudomonas syringae* pv *tabaci*. *Plant Physiology* **130**: 120–127.
- Hörtensteiner S, Wüthrich KL, Matile P, Ongania KH, Kräutler B. 1998.** The key step in chlorophyll breakdown in higher plants. Cleavage of pheophorbide a macrocycle by a monooxygenase. *Journal of Biological Chemistry* **273**: 15335–15339.
- IAPAR. 2017.** Dados Diários de Londrina.
- Jung SC, Martinez-Medina A, Lopez-Raez JA, Pozo MJ. 2012.** Mycorrhiza-Induced Resistance and Priming of Plant Defenses. *Journal of Chemical Ecology* **38**: 651–664.
- Kim HJ, Lim J-S, Kim W-K, Kim J-S. 2012.** Soyabean glyceollins: biological effects and relevance to human health. *Proceedings of the Nutrition Society* **71**: 166–174.
- Kim HJ, Suh H-J, Kim JH, Park S, Joo YC, Kim J-S. 2010.** Antioxidant Activity of Glyceollins Derived from Soybean Elicited with *Aspergillus sojae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58**: 11633–11638.
- Kinney AJ. 1996.** Development of genetically engineered soybean oils for food applications. *Journal of Food Lipids* **3**: 273–292.
- Köppen W. 1884.** Die Wärmezonen der Erde, nach der Dauer der heissen, gemässigten und kalten Zeit und nach der Wirkung der Wärme auf die organische Welt betrachtet. *Meteorologische Zeitschrift*: 215–226.
- Langenbach C, Campe R, Beyer SF, Mueller AN, Conrath U. 2016.** Fighting Asian Soybean Rust. *Frontiers in Plant Science*, **7**: 1-13.
- Li L, Yu Y, Zhou Z, Zhou JM. 2016.** Plant pattern-recognition receptors controlling innate immunity. *Science China Life Sciences* **59**: 878–888.
- van Loon LC, van Strien EA. 1999.** The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **55**: 85-97.
- Lopes LP, Oliveira Jr AG, Beranger JPO, Góis CG, Vasconcellos FCS, Martin JABS, Andrade CGTJ, Mello JCP, Andrade G. 2012.** Activity of extracellular compounds of *Pseudomonas* sp. against *Xanthomonas axonopodis* in vitro and bacterial leaf blight in eucalyptus. *Tropical Plant Pathology* **37**: 233–238.
- Lopez-Lazaro M. 2009.** Distribution and Biological Activities of the Flavonoid Luteolin. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* **9**: 31–59.
- Luttgeharm KD, Chen M, Mehra A, Cahoon RE, Markham JE, Cahoon EB. 2015.** Overexpression of Arabidopsis ceramide synthases differentially affects growth, sphingolipid metabolism, programmed cell death, and mycotoxin resistance. *Plant Physiology* **169**: 1108–1117.
- Lynch D V., Dunn TM. 2004.** An introduction to plant sphingolipids and a review of recent advances in understanding their metabolism and function. *New Phytologist* **161**: 677–702.
- Munhoz LD, Fontequ JP, Santos IMO, Navarro MOP, Simionato AS, Goya ET, Rezende MI, Balbi-Peña M Isabel, de Oliveira AG, Andrade G. 2017.** Control of bacterial stem rot on tomato by extracellular bioactive compounds produced by *Pseudomonas aeruginosa* LV strain. *Cogent Food & Agriculture* **3**: 1–16.

- de Oliveira AG, Murate LS, Spago FR, Lopes L de P, Beranger JP de O, Martin JABS, Nogueira MA, Mello JCP de, Andrade CGT de J, Andrade G. 2011.** Evaluation of the antibiotic activity of extracellular compounds produced by the *Pseudomonas* strain against the *Xanthomonas citri* pv. *citri* 306 strain. *Biological Control* **56**: 125–131.
- de Oliveira AG, Spago FR, Simionato AS, Navarro MOP, Da Silva CS, Barazetti AR, Cely MVT, Tischer CA, San Martin JAB, De Jesus Andrade CGT, et al. 2016.** Bioactive organocopper compound from *Pseudomonas aeruginosa* inhibits the growth of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Frontiers in Microbiology* **7**: 1–12.
- Pistori JF, Simionato AS, Navarro MOP, Andreato MFL, Santos IMO, Meneguim L, Leite Junior RP, Oliveira AG, Andrade G. 2018.** Low-molecular-weight metabolites produced by *Pseudomonas aeruginosa* as an alternative to control Huanglongbing in *Citrus sinensis* cv. Valencia. *Tropical Plant Pathology* **43**: 289–296.
- Pontzen R, Scheinpflug H. 1989.** Effects of triazole fungicides on sterol biosynthesis during spore germination of *Botrytis cinerea*, *Venturia inaequalis* and *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. *Netherlands Journal of Plant Pathology* **95**: 151–160.
- Pozo M, Jung S, Lopez-Raez JA, Azcón-Aguilar C. 2010.** Impact of arbuscular mycorrhizal symbiosis on plant response to biotic stress: the role of plant defense mechanisms. In: *Arbuscular mycorrhizas: physiology and function*. New York: Springer, 3–31.
- Rampazo LGL. 2004.** Avaliação de agentes biológicos e seus produtos na incidência de lesões foliares do cancro cítrico. (Dissertação Mestrado em Microbiologia), Universidade Estadual de Londrina, Londrina.
- Sagatova AA, Keniya M V., Wilson RK, Monk BC, Tyndall JDA. 2015.** Structural Insights into Binding of the Antifungal Drug Fluconazole to *Saccharomyces cerevisiae* Lanosterol 14 α -Demethylase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **59**: 4982–4989.
- Selosse M-A, Bessis A, Pozo MJ. 2014.** Microbial priming of plant and animal immunity: symbionts as developmental signals. *Trends in Microbiology* **22**: 607–613.
- Simionato AS, Navarro MOP, de Jesus MLA, Barazetti AR, da Silva CS, Simões GC, Balbi-Peña MI, de Mello JCP, Panagio LA, de Almeida RSC, et al. 2017.** The effect of phenazine-1-carboxylic acid on mycelial growth of *Botrytis cinerea* produced by *Pseudomonas aeruginosa* LV strain. *Frontiers in Microbiology* **8**: 1–9.
- Skandalis N, Dimopoulou A, Beri D, Tzima A, Malandraki I, Theologidis I, Bitivanos S, Varveri C, Klitsiniris T, Vassilakos N. 2016.** Effect of pyraclostrobin application on viral and bacterial diseases of tomato. *Plant Disease* **100**: 1321–1330.
- Spoel SH, Dong X. 2012.** How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nature Reviews Immunology* **12**: 89–100.
- Thakur M, Sohal BS. 2013.** Role of Elicitors in Inducing Resistance in Plants against Pathogen Infection: A Review. *ISRN Biochemistry* **2013**: 1–10.
- Tripathy BC, Oelmüller R. 2012.** Reactive oxygen species generation and signaling in plants. *Plant Signaling and Behavior* **7**: 1621–1633.
- Twizeyimana M, Hartman GL. 2017.** Sensitivity of *Phakopsora pachyrhizi* Isolates to Fungicides and Reduction of Fungal Infection Based on Fungicide and Timing of Application. *Plant Disease* **101**: 121–128.

Venancio WS, Rodrigues MAT, Begliomini E, Souza NL. 2003. Efeitos fisiológicos de fungicida do grupo das estrobirulinas sobre plantas. *Publ. UEPG Ci. Exatas Terra, Ci. Agr. Eng.* **9**: 59–68.

De Vleeschauwer D, Cornelis P, Höfte M. 2006. Redox-active pyocyanin secreted by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 triggers systemic resistance to *Magnaporthe grisea* but enhances *Rhizoctonia solani* susceptibility in rice. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19**: 1406–1419.

Wang L, Tu YC, Lian TW, Hung JT, Yen JH, Wu MJ. 2006. Distinctive antioxidant and antiinflammatory effects of flavonols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**: 9798–9804.

Watson PF, Rose ME, Ellis SW, England H, Kelly SL. 1989. Defective sterol C5-6 desaturation and azole resistance: A new hypothesis for the mode of action of azole antifungals. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **164**: 1170–1175

Wilson Jr D, McDonald Jr M. 1986. No Title. *A convenient volatile aldehyde assay for measuring seed vigour* **14**: 259–268.

Figura 1.

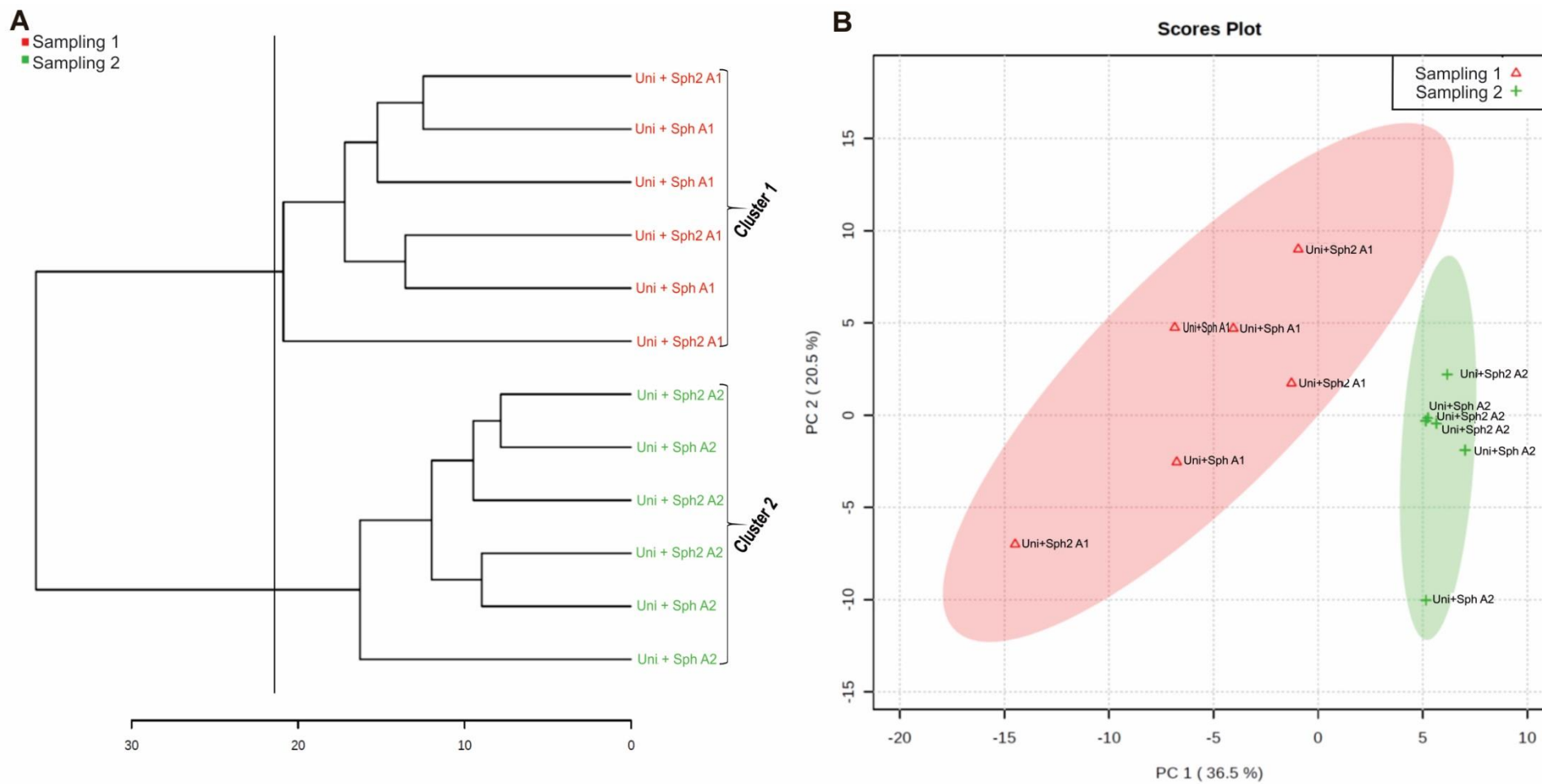


Figura 2.

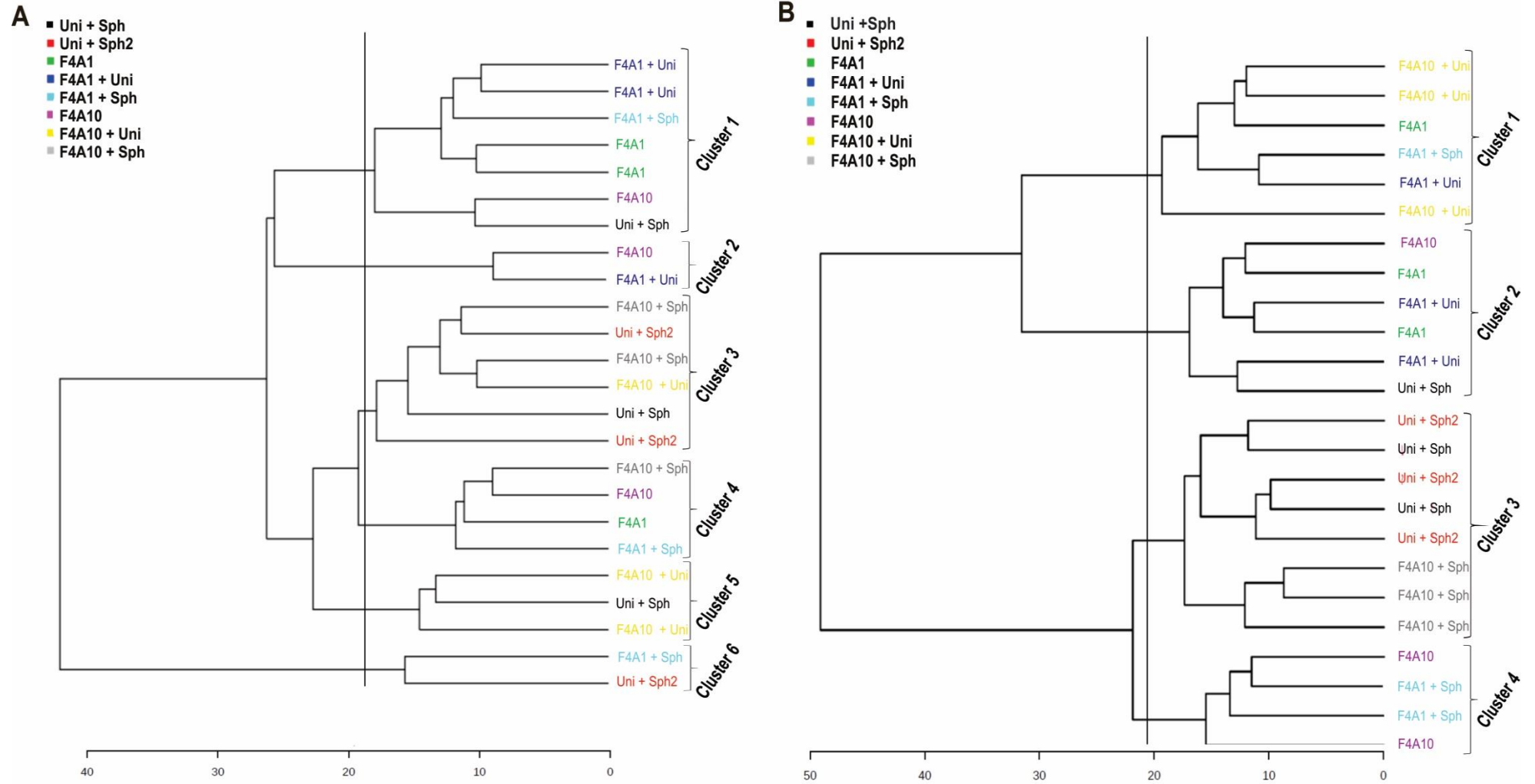


Figura 3.

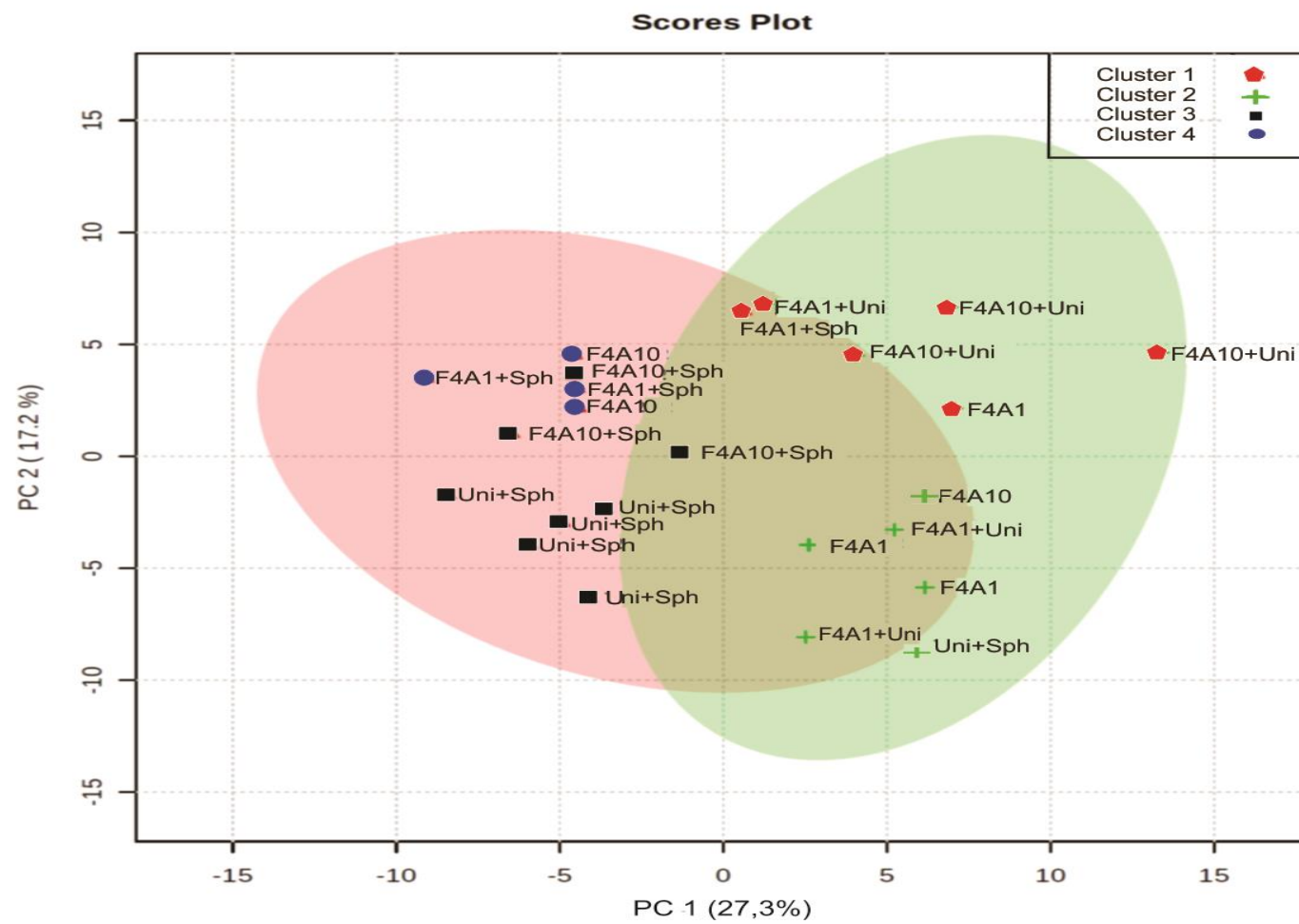


Figura 4.

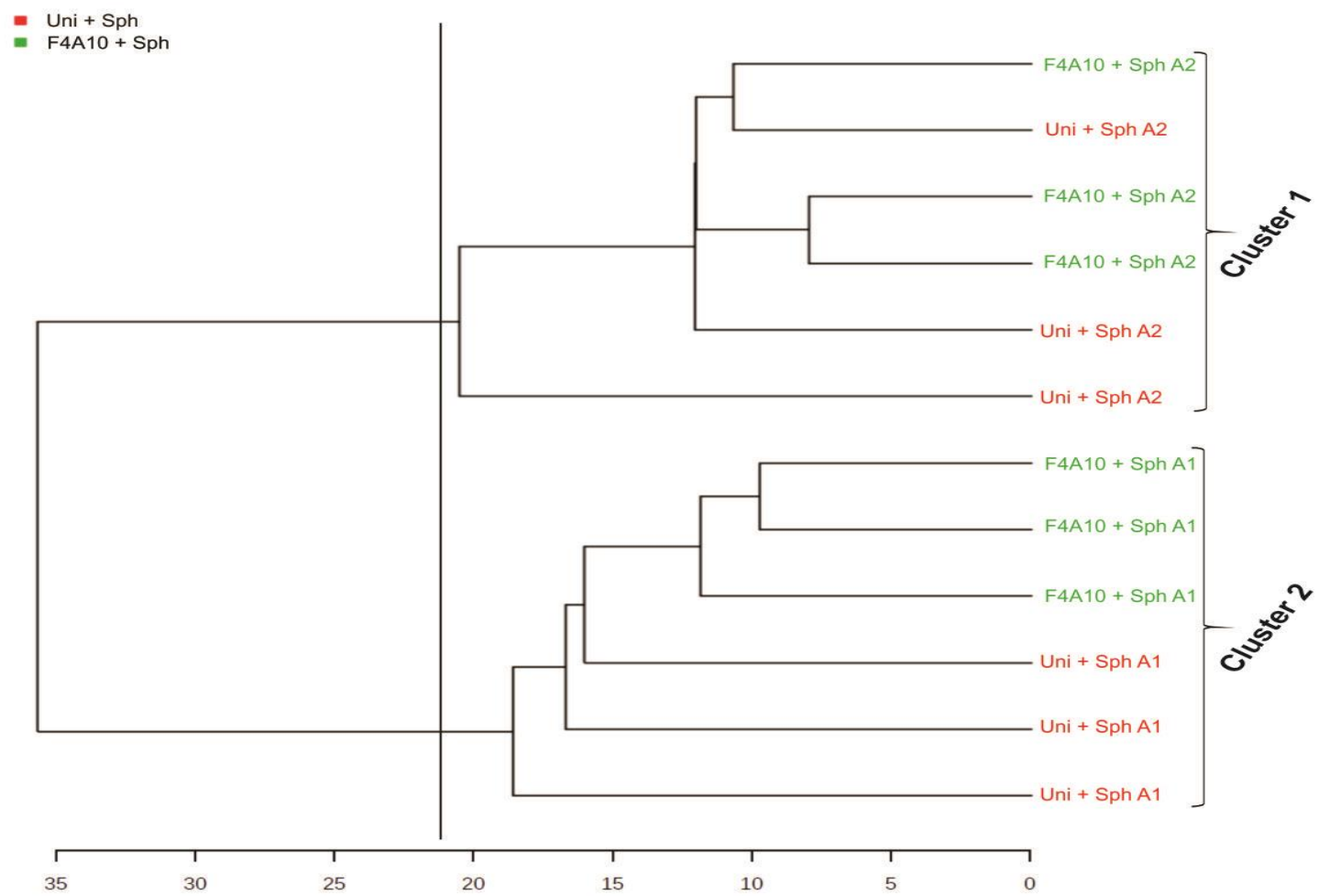


Figura 5.

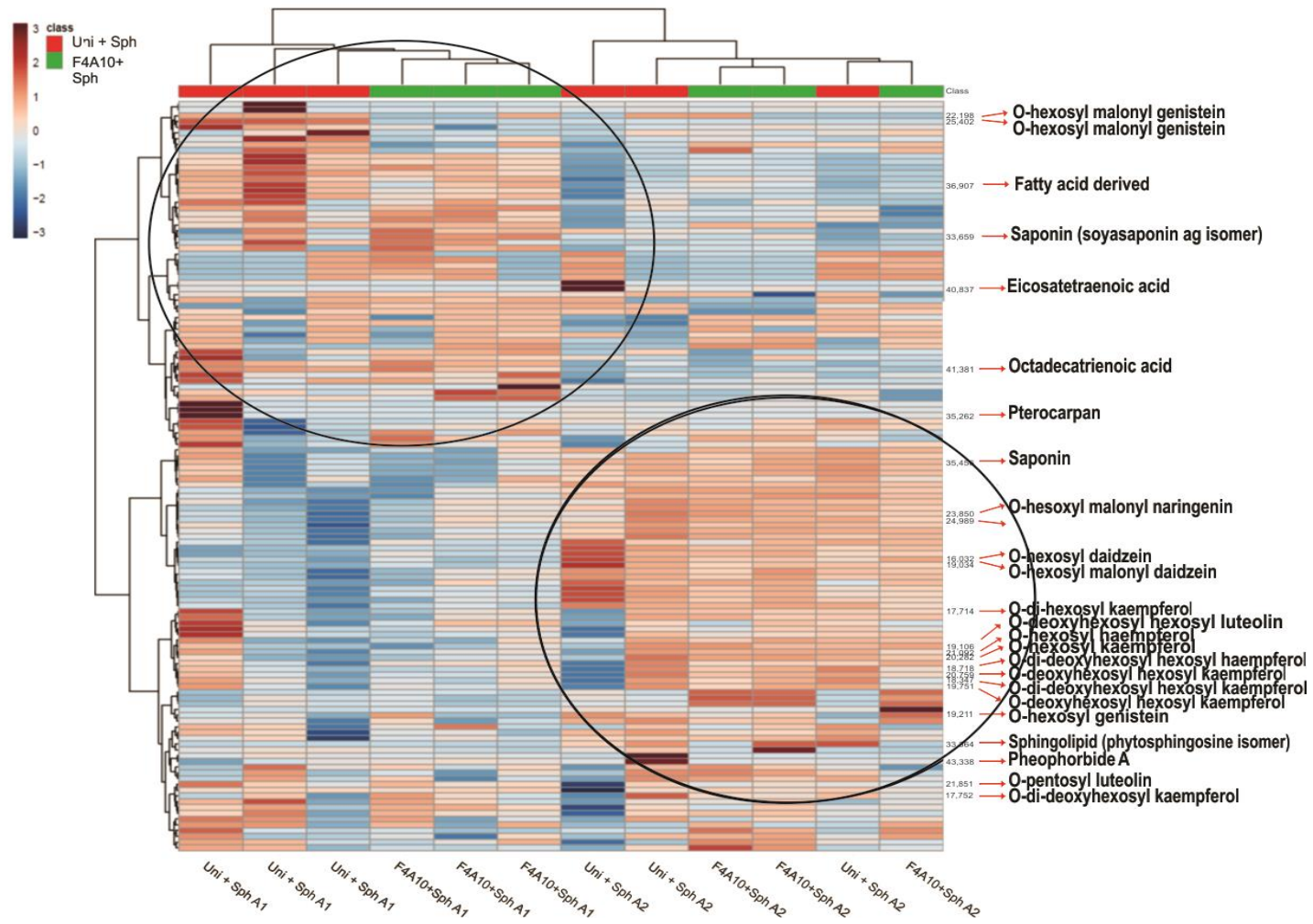


Fig 6.

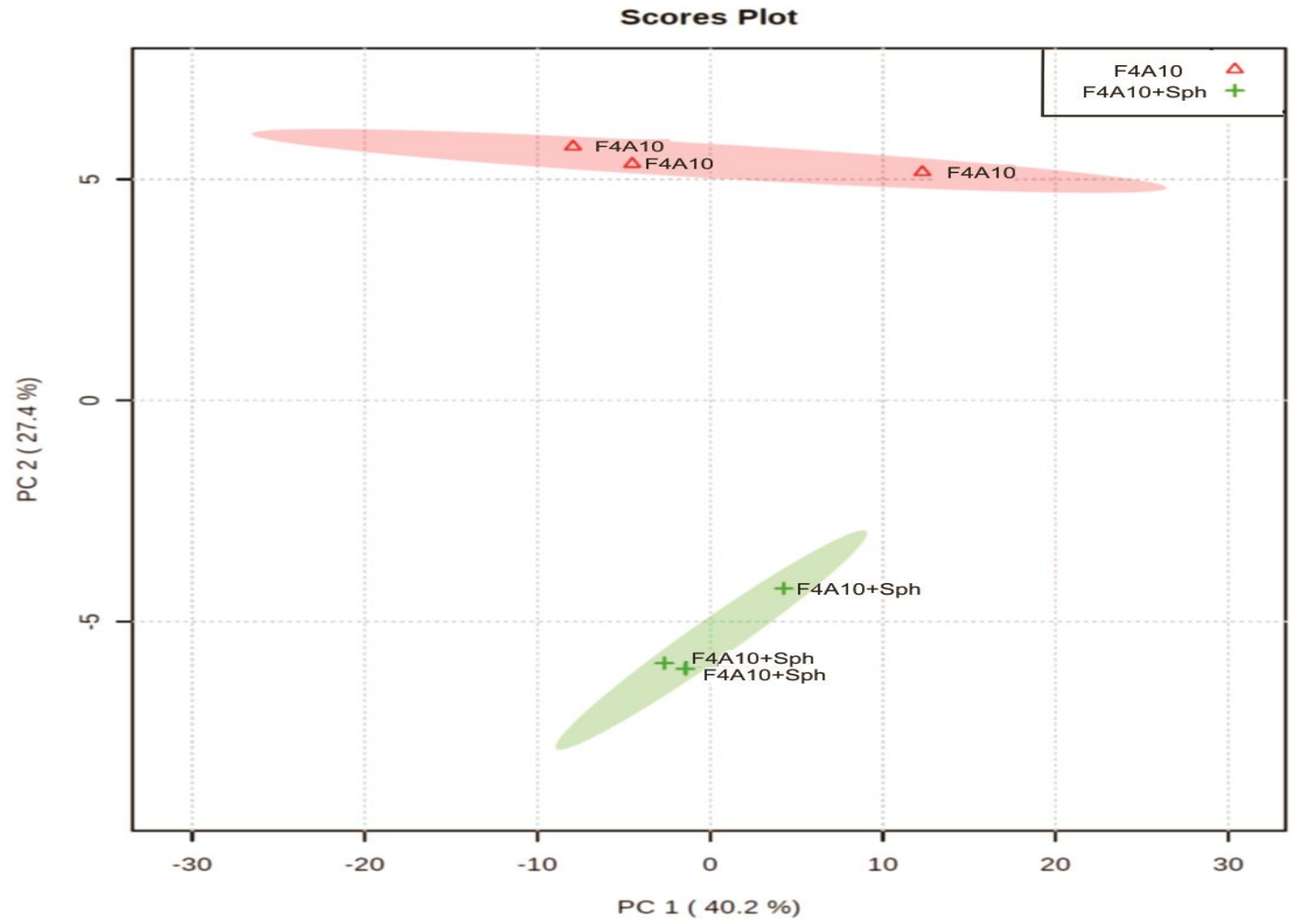


Figura 7.

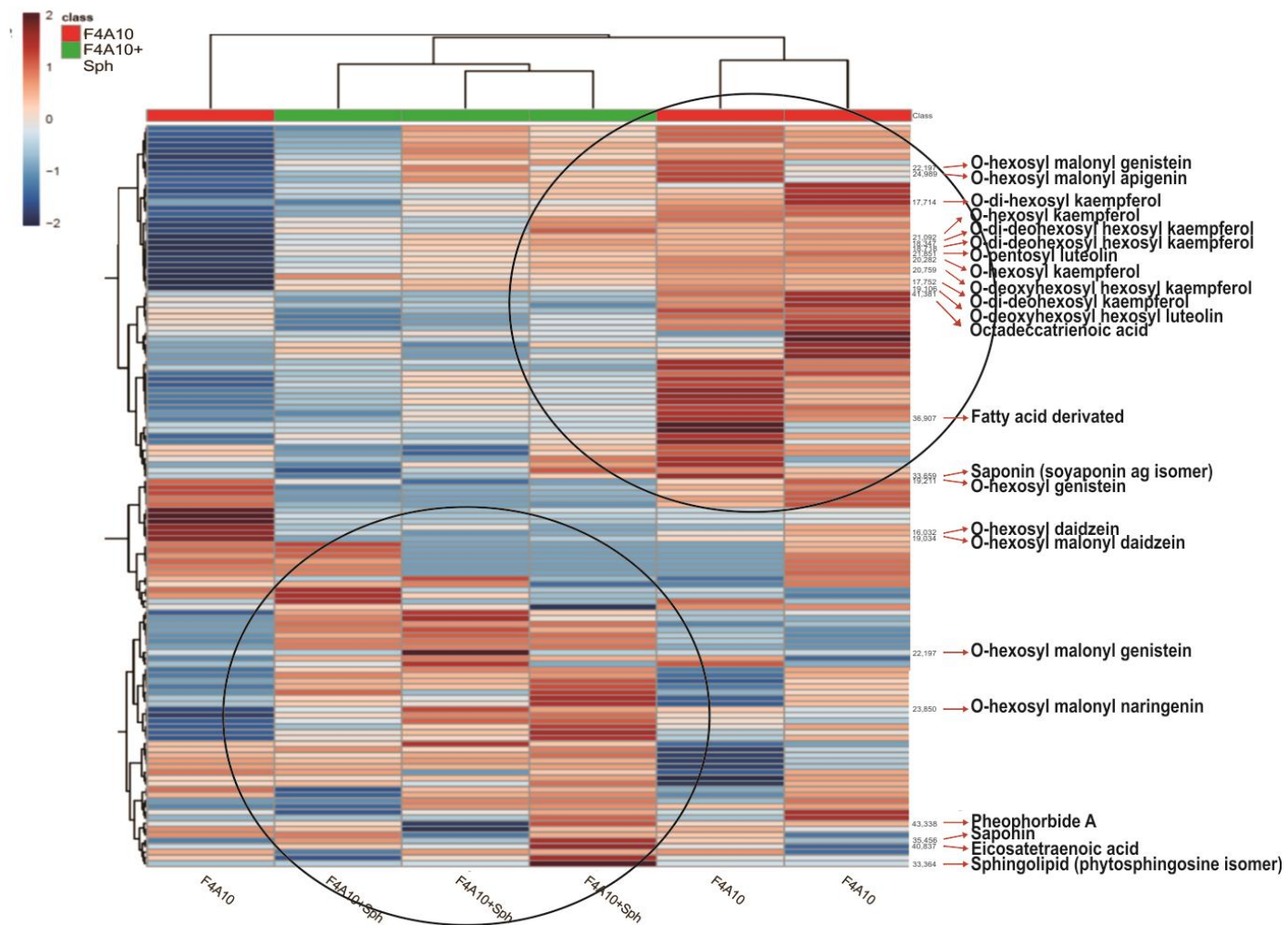


Figura 8.

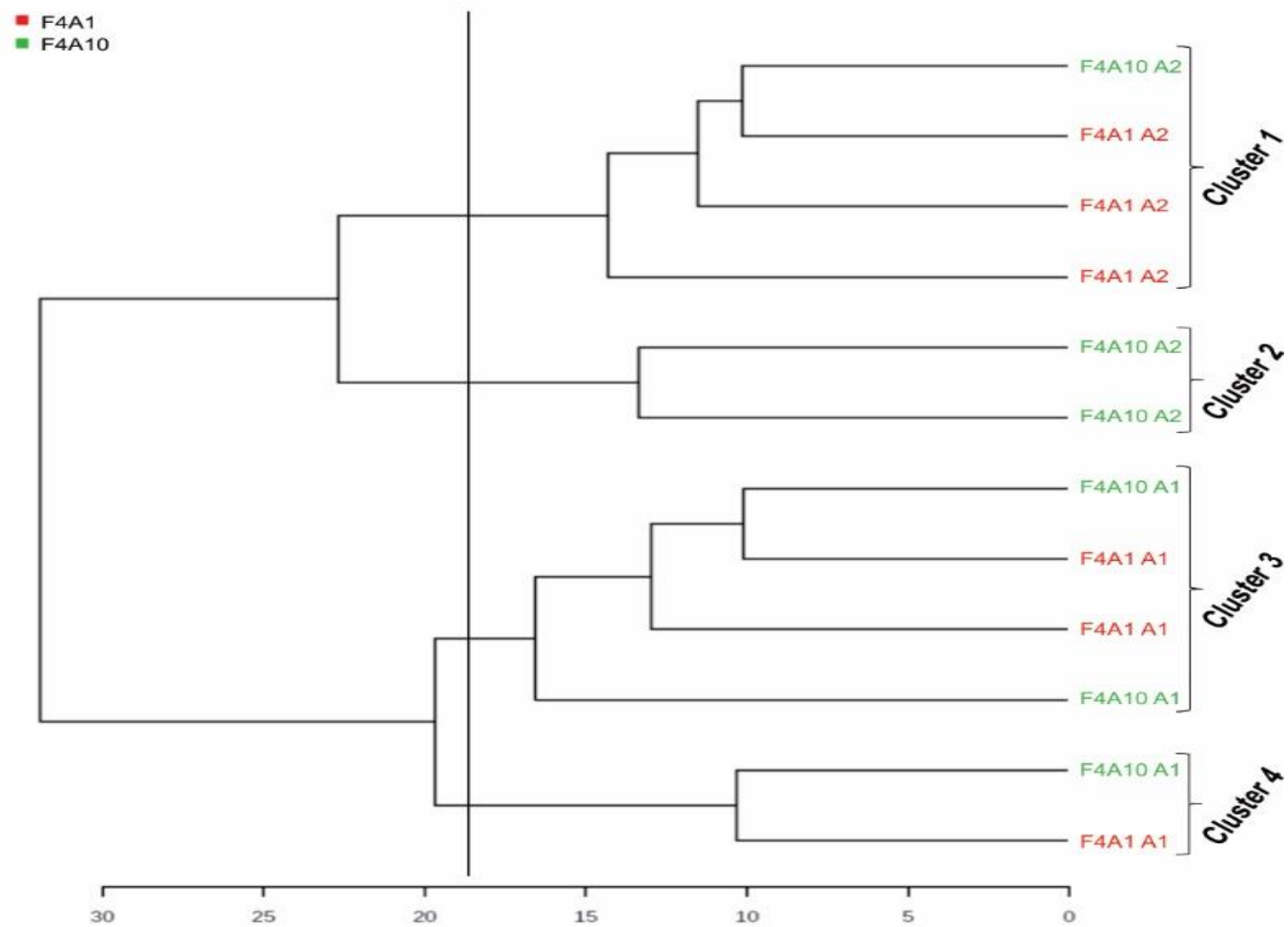
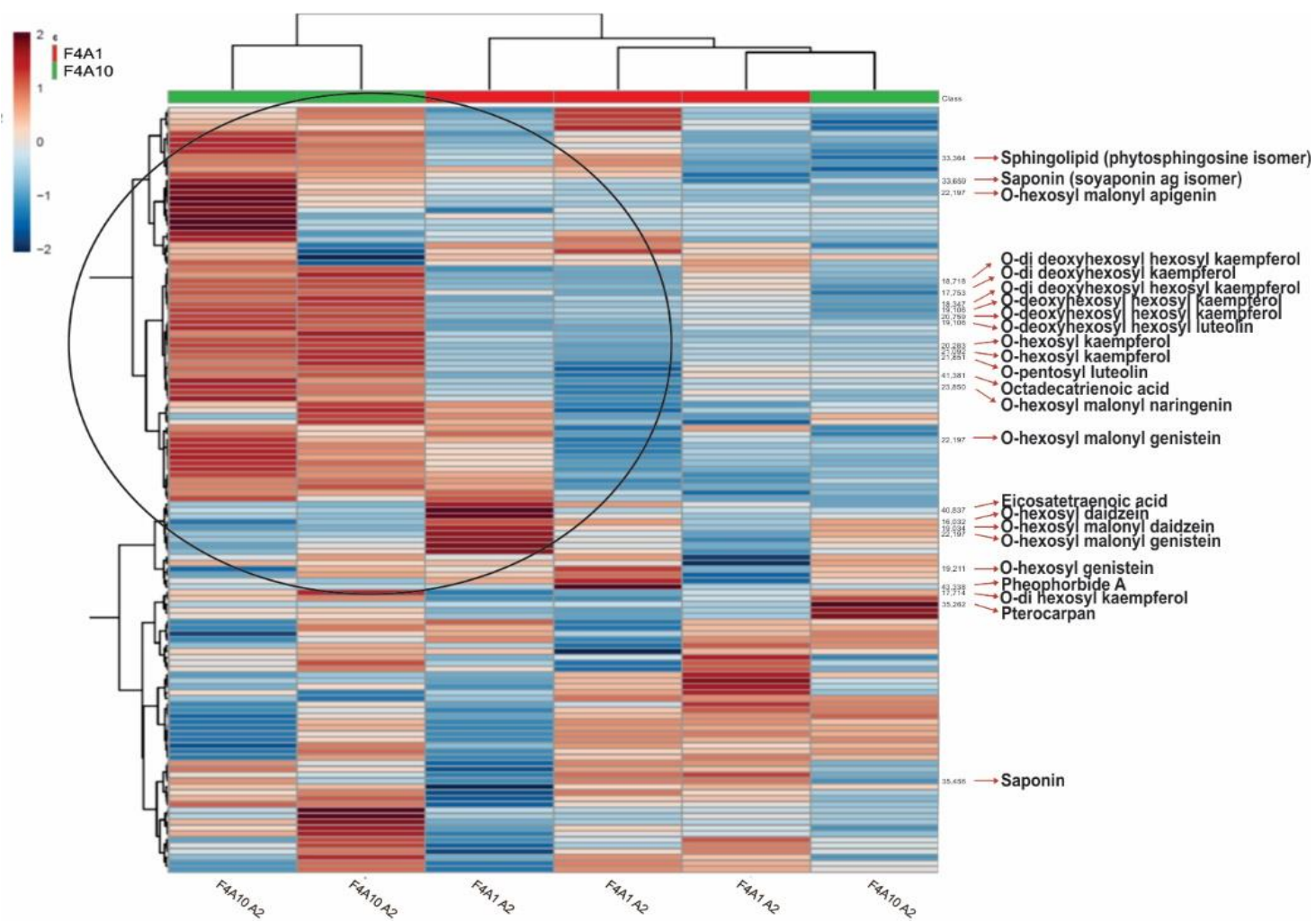


Figura 9.



Legendas das figuras

Figura 1. Análise metabolômica de folhas de soja infectadas com *P. pachyrhizi* após diferentes tratamentos. (A) Dendograma ilustrando a diferença entre os tempos de amostragem A1 e A2. (B) Análise dos componentes principais entre A1 e A2.

Figura 2. Análise metabolômica de folhas de soja infectadas com *P. pachyrhizi* após diferentes tratamentos. (A) Dendograma ilustrando a diferença entre os tratamentos na amostragem A1. (B) Dendograma ilustrando a diferença entre os tratamentos na amostragem A2.

Figura 3. Análise dos componentes principais da amostragem A2 de folhas de soja infectadas com *P. pachyrhizi* após diferentes tratamentos.

Figura 4. Dendograma ilustrando a diferença entre os tratamentos Unizeb gold® + Sphere max® e F4A10 + Sphere max® nas amostragens A1 e A2.

Figura 5. Heatmap dos componentes principais identificados de Unizeb gold® + Sphere max® e F4A10 + Sphere max® nas amostragens A1 e A2.

Figura 6. Análise dos componentes principais entre os tratamentos F4A10 e F4A10 + Sphere max® na amostragem A2.

Figura 7. Heatmap dos componentes principais identificados de F4A10 e F4A10 + Sphere max® na amostragem A2.

Figura 8. Dendograma ilustrando a diferença entre os tratamentos F4A1 e F4A10 nas amostragens A1 e A2.

Figura 9. Heatmap dos componentes principais identificados de F4A1 e F4A10 nas amostragens A1 e A2.

6. CONCLUSÕES

1. O composto F4A nas doses de 1 e 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ somados ao produto comercial Sphere max® proporcionaram maior colonização micorrízica, massa seca, altura e produtividade em plantas de soja.
2. Foi possível observar alterações ultraestruturais em hifas e esporos do fungo *P. pachyrhizi*, após o tratamento com o composto F4A.
3. A análise metabolômica indicou uma maior produção de flavonóides em plantas tratadas com o produto comercial Sphere max®. Não há na literatura dados que relacionem os princípios ativos que compõem o produto à produção de flavonóides. No entanto, estrobilurinas tem sido relacionadas ao efeito “*priming*” em plantas, que quando ativadas levam a planta a desenvolver uma resposta imunológica mais veloz.
4. A análise metabolômica indicou também uma maior produção de flavonóides em plantas tratadas com o composto F4A em ambas as doses. Fenazinas possuem a característica de induzir a produção de EROS, que quando em desequilíbrio na planta, pode gerar estresse oxidativo. Uma possível resposta da planta é a produção de flavonóides com propriedades antioxidantes, a fim de eliminar EROS.