

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

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

**Sabrina Holz**

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

**Piracicaba  
2020**



**Sabrina Holz**  
**Engenheira Agrônoma**

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

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

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

**Piracicaba**  
**2020**

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

Holz, Sabrina

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

92 p.

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

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

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

*Dedico*

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

*Ofereço*

## AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

A todos os colegas, mestrandos e doutorandos do Departamento.

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

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

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

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

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

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

*A todos, os meus sinceros agradecimentos!!!*

## RESUMO

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

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



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

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

## ABSTRACT

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

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

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

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



## 1. INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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





## 2. CONCLUSÃO

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

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

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

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

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



## REFERÊNCIAS

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

- CONAB. (2019). Acompanhamento da Safra Brasileira. *Companhia Nacional de Abastecimento*, 5(4), 1–113.
- Conrath, U., Beckers, G. J. M., Flors, V., García-Agustín, P., Jakab, G., Mauch, F., ... Mauch-Mani, B. (2006). Priming: Getting Ready for Battle. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(10), 1062–1071. <https://doi.org/10.1094/MPMI-19-1062>
- Costamilan, L. M.; Bertagnolli, P. F.; Yorinori, J. T. (2002). Perda de rendimento de grãos de soja causada por ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*). *Fitopatologia Brasileira*, 27.
- Dallagnol, L. J., Navarini, L., Ugalde, M. G., Balardin, R. S., & Catellam, R. (2006). Utilização de Acibenzolar-S-Methyl para controle de doenças foliares da soja. *Summa Phytopathologica*, 32(3), 255–259. <https://doi.org/10.1590/s0100-54052006000300007>
- Dorighello, D. V., Bettioli, W., Maia, N. B., & de Campos Leite, R. M. V. B. (2015). Controlling Asian soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) with *Bacillus* spp. and coffee oil. *Crop Protection*, 67, 59–65. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2014.09.017>
- Doyle, J., and Doyle, J. (1987). A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissues. *Phytochem Bull*, 19, 11–15.
- Duarte, H. da S. S., Zambolim, L., Rodrigues, F. de Á., Rios, J. A., & Lopes, U. P. (2009). Silicato de potássio, acibenzolar-S-metil e fungicidas no controle da ferrugem da soja. *Ciencia Rural*, 39(8), 2271–2277. <https://doi.org/10.1590/s0103-84782009000800001>
- Elsharkawy, M. M., Shimizu, M., Takahashi, H., Ozaki, K., & Hyakumachi, M. (2013). Induction of systemic resistance against *Cucumber mosaic virus* in *Arabidopsis thaliana* by *Trichoderma asperellum* SKT-1. *Plant Pathology Journal*, 29(2), 193–200. <https://doi.org/10.5423/PPJ.SI.07.2012.0117>
- Embrapa. (2016). Vazio sanitário é medida importante contra ferrugem asiática. Retrieved from <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/13556333/vazio-sanitario-e-medida-importante-contraferrugem-asiatica>
- Embrapa Soja. (2013). Tecnologias de produção de soja - Região Central do Brasil 2014. *Londrina: Embrapa Soja*, 265.
- Engelberth, J., Alborn, H. T., Schmelz, E. A., & Tumlinson, J. H. (2004). Airborne signals prime plants against insect herbivore attack. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(6), 1781–1785. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308037100>
- Faria, M. R. de, & Wraight, S. P. (2007). Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control*, 43(3), 237–256. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.08.001>

- Farouk S. & Osman M. A. (2011). The effect of plant defense elicitors on common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) growth and yield in absence or presence of spider mite (*Tetranychus urticae* Koch) infestation. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, 7, 05–22.
- Farrell, R. E. (2010). Resilient Ribonucleases. In *RNA Methodologies* (pp. 155–172). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374727-3.00007-3>
- Fiallos, F. R. G. (2011). A ferrugem asiática da soja causada por *Phakopsora pachyrhizi* Sydow e Sydow. *Ciencia y Tecnología*, 4(2)(1999), 45–60.
- FRAC. (2017). Informação sobre carboxamidas em ferrugem da soja. *Frac-Brasil*, 1–3. Retrieved from [http://docs.wixstatic.com/ugd/85b1d3\\_060a6876562140b693f03708057acff2.pdf](http://docs.wixstatic.com/ugd/85b1d3_060a6876562140b693f03708057acff2.pdf)
- FRAC. (2019). *Comitê de Ação a Resistência a Fungicidas-FRAC-Brasil. d*, 2–3. Retrieved from [www.frac-br.org](http://www.frac-br.org)
- Gallo, D. et al. (2002). *Entomologia agrícola*. Piracicaba: FEALQ.
- Gauthier, N. W., Maruthachalam, K., Subbarao, K. V., Brown, M., Xiao, Y., Robertson, C. L., & Schneider, R. W. (2014). Mycoparasitism of *Phakopsora pachyrhizi*, the soybean rust pathogen, by *Simplicillium lanosoniveum*. *Biological Control*, 76, 87–94. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.05.008>
- Godoy, C. V.; Almeida, A. M. R.; Costamilan, M. C.; Meyer, W. P. E. A. (2016). Doenças da soja. Cap. 67. In L. E. A. Amorim, L.; Rezende, J. A. M.; Bergamin Filho, A.; Camargo (Ed.), *Manual de fitopatologia. V.2. Doenças das plantas cultivadas*. (5th ed.). Ouro Fino, MG: Agronômica Ceres,.
- Godoy, C., Seixas, C., Soares, R., Meyer, M., Costamilan, L., & Adegas, F. (2017). *Boas práticas para o enfrentamento da ferrugem-asiática da soja*. 1–6.
- Godoy, C., Utiamada, C., Meyer, M., Campos, H., Lopes, I., Forcelini, C., ... Venancio, W. (2012). *Eficiência de fungicidas para o controle da ferrugem-asiática da soja, Phakopsora pachyrhizi, na safra 2011/12: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos*.
- Godoy, C., Utiamada, C., Meyer, M., Campos, H., Lopes, I., Forcelini, C., ... Venancio, W. (2019). Eficiência de fungicidas para o controle da ferrugem-asiática da soja, *Phakopsora pachyrhizi*, na safra 2018/19: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. *Embrapa Soja. Circular Técnica 148.*, 10.
- Godoy, C. V., Seixas, C. D. S., Soares, R. M., Marcelino-Guimarães, F. C., Meyer, M. C., & Costamilan, L. M. (2016). Asian soybean rust in Brazil: Past, present, and future. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 51(5), 407–421. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2016000500002>

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

- Hartman, G. L.; Rupe, J. C.; Sikora, E. J., Domier, L. L., Davis J. A., and K. L. Steffey, E. (2015). Compendium of Soybean Diseases and Pests, Fifth Editio. *The American Phytopathological Society*, 167–173. <https://doi.org/10.1094/9780890544754.005>
- Hartman, G. (2011). Interaction of soybean and *Phakopsora pachyrhizi*, the cause of soybean rust. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, 6(025). <https://doi.org/10.1079/PAVSNR20116025>
- Hartman, G. L.; J. B. Sinclair; J. C. Rupe. (1999). Compendium of Soybean Diseases. *APS Press, Minnesota*. 128.
- Hartman, G. L., Hill, C. B., Twizeyimana, M., Miles, M. R., & Bandyopadhyay, R. (2011). Interaction of soybean and *Phakopsora pachyrhizi*, the cause of soybean rust. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, 6(025). <https://doi.org/10.1079/PAVSNR20116025>
- Hartman, Glen L., West, E. D., & Herman, T. K. (2011). Crops that feed the World 2. Soybean-worldwide production, use, and constraints caused by pathogens and pests. *Food Security*, 3(1), 5–17. <https://doi.org/10.1007/s12571-010-0108-x>
- Hennings, V. P. (1903). [A few new Japanese Uredinaceae]. *Hedwigia* 42, 107–108.
- Hoeksma, J., Misset, T., Wever, C., Kemmink, J., Kruijtzter, J., Versluis, K., ... den Hertog, J. (2019). A new perspective on fungal metabolites: identification of bioactive compounds from fungi using zebrafish embryogenesis as read-out. *Scientific Reports*, 9(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54127-9>
- Hooker, A. L., & Yarwood, C. E. (1966). Culture of *Puccinia sorghi* on detached leaves of corn and *Oxalis corniculata*. *Phytopathology*, 56, 536–539.
- Hymowitz, T. (1970). On the domestication of thw soybean. *Economic Botany*, 24 (4).
- Index Fungorum. (2018a). *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokīn. *Entomophthora anisopliae* Metschn. 1879. Retrieved from <http://www.indexfungorum.org/names/NamesRecord.asp?RecordID=121037>
- Index Fungorum. (2018b). *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd., *Annls mycol.* 12(2): 108 (1914). Retrieved April 7, 2020, from <http://www.indexfungorum.org/names/NamesRecord.asp?RecordID=121037>
- Jaber, L. R., & Ownley, B. H. (2018). Can we use entomopathogenic fungi as endophytes for dual biological control of insect pests and plant pathogens? *Biological Control*, 116, 36–45. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.01.018>
- Judd, W. S.; Campbell, C. S.; Kellogg, E. A.; Donoghue, M. J. (2009). *Sistemática vegetal, um enfoque filogenético*. (3rd ed.). Porto Alegre: Artmed.

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



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

- Nascimento, J. M. do, Gavassoni, W. L., Bacchi, L. M. A., & Melo, E. P. de. (2016). Germinação de uredinósporos de *Phakopsora pachyrhizi* e *Puccinia kuehnii* sob diferentes adjuvantes. *Arquivos Do Instituto Biológico*, 82(0), 1–6. <https://doi.org/10.1590/1808-1657001242013>
- O'Brien, P. A. (2017). Biological control of plant diseases. *Australasian Plant Pathology*, 46(4), 293–304. <https://doi.org/10.1007/s13313-017-0481-4>
- Oliveira, M. D. M., Varanda, C. M. R., & Félix, M. R. F. (2016). Induced resistance during the interaction pathogen x plant and the use of resistance inducers. *Phytochemistry Letters*, 15(October 2017), 152–158. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2015.12.011>
- Ownley, B. H., Griffin, M. R., Klingeman, W. E., Gwinn, K. D., Moulton, J. K., & Pereira, R. M. (2008). *Beauveria bassiana*: Endophytic colonization and plant disease control. *Journal of Invertebrate Pathology*, 98(3), 267–270. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2008.01.010>
- Ownley, B. H., Gwinn, K. D., & Vega, F. E. (2010). Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: Ecology and evolution. *BioControl*, 55(1), 113–128. <https://doi.org/10.1007/s10526-009-9241-x>
- Ownley, B. H., Pereira, R. M., Klingeman, W. E., Quigley, N. B., & Leckie, B. M. (2004). *Beauveria bassiana*, a dual purpose biocontrol organism, with activity against insect pests and plant pathogens. In: Lartey RT, Caesar A (Eds) *Emerging Concepts in Plant Health Management. Research Signpost, Kerala*, (August 2016), 255–269.
- Pal, K. K. and B. M. G. (2006). Biological control of plant pathogens. *The Plant Health Instructor*, 1–25. <https://doi.org/10.1094/PHI-A-2006-1117-02>.
- Pal, S., St. Leger, R. J., & Wu, L. P. (2007). Fungal peptide destruxin a plays a specific role in suppressing the innate immune response in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Biological Chemistry*, 282(12), 8969–8977. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605927200>
- Parsa, S., Ortiz, V., & Vega, F. E. (2013). Establishing fungal entomopathogens as endophytes: towards endophytic biological control. *Journal of Visualized Experiments*, (74). <https://doi.org/10.3791/50360>
- Pascholati, S. F.; Dalio, R. J. D. (2018). Fisiologia do parasitismo: Como as plantas se defendem dos patógenos. In A. Amorim, L.; Rezende, J.A.M.; Bergamin-Filho (Ed.), *Manual de fitopatologia. Vol.1. Princípios e conceitos* (5th ed., pp. 424–450). São Paulo: Agr. Ceres.
- Paxton, J. D. (1981). Phytoalexins — A Working Redefinition. *Journal of Phytopathology*, 101(2), 106–109. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1981.tb03327.x>
- Pereira, S., A. Rodrigues, F., Carré-Missio, V., Goreti A. Oliveira, M., & Zambolim, L. (2009). Aplicação foliar de silício na resistência da soja à ferrugem e na atividade de enzimas de

- defesa. *Tropical Plant Pathology*, 34(3). <https://doi.org/10.1590/S1982-56762009000300005>
- Pinheiro, J. C. & Bates, D. M. (2000). Mixed-effects models in s and splus, springer series in statistics and computing, New York.
- Ravindran, K., Chitra, S., Wilson, A., Sivaramakrishnan, S. (2014). Evaluation of antifungal activity of *Metarhizium anisopliae* against plant phytopathogenic fungi. In *Microbial Diversity and Biotechnology in Food Security* (pp. 251–255). [https://doi.org/10.1007/978-81-322-1801-2\\_22](https://doi.org/10.1007/978-81-322-1801-2_22)
- Reis, E. M., A. C. R. Bresolin, e M. C. (2006). Doenças da soja I: Ferrugem asiática. *Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo*.
- Reis, E. M., O. Scheer, e J. R. (2005). Kudzú (*Pueraria lobata*) hospedeiro secundário de *Phakopsora pachyrhizi*, no Brasil. *Fitopatologia Brasileira (Resumo)*, S130.
- Rencher, A. C., & Schaalje, G. B. (2007). *Linear Models in Statistics*. <https://doi.org/10.1002/9780470192610>
- Rigby, R. A., & Stasinopoulos, D. M. (2005). Generalized additive models for location, scale and shape (with discussion). *Journal of the Royal Statistical Society: Series C (Applied Statistics)*, 54(3), 507–554. <https://doi.org/10.1111/j.1467-9876.2005.00510.x>
- Rossi, R. L. (2003). First Report of *Phakopsora pachyrhizi*, the Causal Organism of Soybean Rust in the Province of Misiones, Argentina. *Plant Disease*, 87(1), 102–102. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.1.102A>
- Rupe, J. and L. S. (2008). Soybean Rust. *Plant Health Instructor*. <https://doi.org/10.1094/phi-i-2008-0401-01>
- Saboki, E., Usha, K., & Singh, B. (2011). Pathogenesis related ( PR ) proteins in plant defense mechanism age-related pathogen resistance. *Curr. Res. Technol. Adv.*, (January), 1043–1054.
- Sarven, M. S., Hao, Q., Deng, J., Yang, F., Wang, G., Xiao, Y., & Xiao, X. (2020). Biological control of tomato gray mold caused by *Botrytis Cinerea* with the entomopathogenic fungus *Metarhizium Anisopliae*. *Pathogens*, 9(3), 213. <https://doi.org/10.3390/pathogens9030213>
- Sasan, R. K., & Bidochka, M. J. (2012). The insect-pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* (Clavicipitaceae) is also an endophyte that stimulates plant root development. *American Journal of Botany*, 99(1), 101–107. <https://doi.org/10.3732/ajb.1100136>
- Sasan, R. K., & Bidochka, M. J. (2013). Antagonism of the endophytic insect pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* against the bean plant pathogen *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*.

- Canadian Journal of Plant Pathology*, 35(3), 288–293.  
<https://doi.org/10.1080/07060661.2013.823114>
- Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 3(6), 1101–1108. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>
- Schmitz, H. K., Medeiros, C.-A., Craig, I. R., & Stammer, G. (2014). Sensitivity of *Phakopsora pachyrhizi* towards quinone-oxidase-inhibitors and demethylation-inhibitors, and corresponding resistance mechanisms. *Pest Management Science*, 70(3), 378–388. <https://doi.org/10.1002/ps.3562>
- Schneider, R. W., Hollier, C. A., Whitam, H. K., Palm, M. E., McKemy, J. M., Hernández, J. R., ... DeVries-Paterson, R. (2005). First report of soybean rust caused by *Phakopsora pachyrhizi* in the Continental United States. *Plant Disease*, 89(7), 774–774. <https://doi.org/10.1094/PD-89-0774A>
- Schwan-Estrada, K. R. F., Stangarlin, J. R., & Cruz, M. E. D. S. (2000). Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos. *Floresta*, 30(12), 129–137. <https://doi.org/10.5380/rf.v30i12.2361>
- Shah, P. A., & Pell, J. K. (2003). Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61(5–6), 413–423. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1240-8>
- Siqueira, A. C. O. (2016). *Uso de Metarhizium spp. na produção de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar e seus efeitos na planta, em pragas e doenças* (Universidade de São Paulo). <https://doi.org/10.11606/D.11.2016.tde-25042016-183101>
- Small, C.-L. N., & Bidochka, M. J. (2005). Up-regulation of Pr1, a subtilisin-like protease, during conidiation in the insect pathogen *Metarhizium anisopliae*. *Mycological Research*, 109(3), 307–313. <https://doi.org/10.1017/S0953756204001856>
- St Leger, R., Joshi, L., Bidochka, M. J., & Roberts, D. W. (1996). Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(13), 6349–6354. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.13.6349>
- Thakur, M., & Sohal, B. S. (2013). Role of elicitors in inducing resistance in plants against pathogen infection: A Review. *ISRN Biochemistry*, 2013, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2013/762412>
- Tremblay, A. (2011). Soybean Rust: Five Years of Research. In A. Sudaric (Ed.), *Soybean - Molecular Aspects of Breeding* (pp. 293–334). <https://doi.org/10.5772/15121>
- USDA. (2020). Soybeans. Data & Analysis. Retrieved April 7, 2020, from <https://www.fas.usda.gov/commodities/soybeans>

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

subtractive hybridization. *Current Genetics*, 55(4), 399–407.  
<https://doi.org/10.1007/s00294-009-0254-x>

Zimmermann, G. (1993). The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its potential as a biocontrol agent. *Pesticide Science*, 37(4), 375–379.  
<https://doi.org/10.1002/ps.2780370410>

Zimmermann, G. (2007). Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Science and Technology*, 17(9), 879–920.  
<https://doi.org/10.1080/09583150701593963>