

# UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL CAMPUS CERRO LARGO CURSO DE AGRONOMIA

#### LEONARDO MACIEL OBREGÃO

EFEITO DA MICROBIOLIZAÇÃO DE SEMENTES COM DIFERENTES NÍVEIS DE VIGOR, NA SEVERIDADE DE DOENÇAS E RENDIMENTO DA SOJA

> CERRO LARGO – RS 2019

#### LEONARDO MACIEL OBREGÃO

# EFEITO DA MICROBIOLIZAÇÃO DE SEMENTES COM DIFERENTES NÍVEIS DE VIGOR, NA SEVERIDADE DE DOENÇAS E RENDIMENTO DA SOJA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Agronomia da Universidade Federal da Fronteira Sul como requisito para a obtenção de grau de Bacharel em Agronomia.

Orientadora: Prof. Dra. Juliane Ludwig

CERRO LARGO – RS 2019

#### Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Obregão, Leonardo Maciel

Efeito da Microbiolização de Sementes com Diferentes Níveis de Vigor, na Severidade de Doenças e Rendimento da Soja / Leonardo Maciel Obregão. -- 2019. 47 f.:il.

Orientadora: Doutora Juliane Ludwig. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de Agronomia, Cerro Largo, RS, 2019.

1. Glycine max. 2. Bacillus spp. 3. Controle Biológico. 4. Severidade de Doenças. 5. Produtividade. I. Ludwig, Juliane, orient. II. Universidade Federal da Fronteira Sul. III. Título.

Elaborada pelo sistema de Geração Automática de Ficha de Identificação da Obra pela UFFS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

# LEONARDO MACIEL OBREGÃO

# EFEITO DA MICROBIOLIZAÇÃO DE SEMENTES COM DIFERENTES NÍVEIS DE VIGOR, NA SEVERIDADE DE DOENÇAS E RENDIMENTO DA SOJA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Agronomia da Universidade Federal da Fronteira Sul como requisito para a obtenção de grau de Bacharel em Agronomia.

Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e aprovado pela banca em

25 155 12059

**BANCA EXAMINADORA** 

Prof. Dra. Juliane Ludwig - UFFS

Orientadora

Prof. Dr. Luciano Campos Cancian - UFFS

foncina Silva Sarzi
Eng. Agr. M.Sc Janaina Silva Sarzi

#### **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus por me proporcionar saúde e força durante toda a minha vida.

Aos meus pais, Anna Vani e João pelo apoio, incentivo e confiança em meu progresso, que serviram de alicerce para as minhas realizações.

A minha irmã, Suzana, por estar sempre ao meu lado e por me fazer confiar em minhas decisões durante minha formação acadêmica.

A minha namorada, Eduarda Kreutz, por todo apoio e ajuda durante a realização do trabalho, os quais foram essenciais para superar os momentos difíceis.

Aos demais familiares pelo incentivo e confiança em mim depositado.

Agradeço à minha orientadora, Prof. Dr<sup>a</sup>. Juliane Ludwig, que apesar da intensa rotina de sua vida acadêmica aceitou me orientar, suas valiosas indicações fizeram toda a diferença.

Sou grato a Universidade Federal da Fronteira Sul - *Campus* Cerro Largo e todo o seu corpo docente que demonstrou estar comprometida com a qualidade e excelência do ensino.

A todos os amigos, pela incansável ajuda sempre que solicitada para condução do experimento, pelas trocas de ideia e sugestões, sua ajuda foi essencial para a realização do trabalho.

Aos meus colegas do curso de Agronomia pela oportunidade de convívio e pela cooperação mútua durante estes cinco anos. Juntos conseguimos avançar e ultrapassar todos os obstáculos.

E por todas aquelas outras pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a minha formação.

Muito Obrigado!

#### **RESUMO**

A soja possui em âmbito mundial uma elevada importância comercial, e, devido ao desenvolvimento de inúmeros produtos oriundos dos grãos, a produção por safra vem apresentando acréscimos significativos. Atrelado a isso, limitadores de ordem biótica e abiótica vem gerando dificuldades para que se alcance o máximo potencial produtivo, com destaque para as doenças, que fazem parte do grupo mais significativo destes e são capazes de causar danos severos à cultura da soja, sendo as principais a ferrugem asiática, míldio e o oídio. Para evitar os danos causados por patógenos podemos lançar mão do controle cultural, genético, químico e biológico, este último merece destaque por ser efetivo no controle de várias doenças e que consiste na utilização de um organismo para controle de outro, e por isso os seus agentes de biocontrole possuem grande importância para a pesquisa. É neste contexto que o objetivo do trabalho foi verificar os efeitos da microbiolização com isolados de Bacillus, em sementes de soja com diferentes níveis de vigor e avaliar a interação destas variáveis na severidade da ferrugem asiática, míldio e oídio, bem como o efeito em seus componentes de rendimento. O experimento foi conduzido em fatorial 4 x 2 (níveis de vigor x microbiolização), com 4 repetições, em delineamento experimental de blocos ao acaso (DBC). Para a implantação do experimento, as sementes foram submetidas à microbiolização utilizando um isolado de Bacillus (RD34). As sementes utilizadas foram da cultivar M6410 IPRO com 4 níveis de vigor: 74%, 77%, 97% e 99%. Avaliações semanais foram realizadas para quantificar a severidade de doenças como a ferrugem asiática, míldio e oídio, sendo estes dados utilizados no cálculo da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD). Também foram avaliados o índice de desfolha e contabilizados o número total de legumes por planta, o número de legumes férteis e inférteis, bem como o diâmetro de grãos (mm), produtividade (Kg. ha<sup>-1</sup>) e peso de mil grãos (PMG) (g). A microbiolização com o isolado de Bacillus, em sementes que possuíam diferentes níveis de vigor, não surtiu efeito na diminuição da severidade de ferrugem asiática, míldio e oídio. As plantas oriundas de sementes com níveis de vigor mais baixos apresentaram severidade mais elevada ao oídio em comparação a plantas provenientes de níveis de vigor mais elevados. O vigor mais elevado proporcionou um diâmetro de grão maior. A microbiolização de sementes de baixo vigor reduziu a desfolha das plantas de soja. O número mais elevado de legumes por planta foi observado em plantas oriundas de sementes que receberam a microbiolização de isolados de Bacillus.

Palavras-chaves: Bacillus spp. Glycine max. Controle Biológico. Produtividade.

#### **ABSTRACT**

Soybeans have a high commercial importance worldwide, and, due to the development of numerous products derived from grains, the production per crop has been presenting significant increases. Linked to this, biotic and abiotic limiters have been causing difficulties to reach the maximum productive potential, especially the diseases, which are part of the most significant group of these and are capable of causing severe damage to soybean crop major Asian rust, downy mildew and powdery mildew. To avoid the damage caused by pathogens we can use cultural, genetic, chemical and biological control, the latter deserves to be highlighted for being effective in the control of various diseases and which consists in the use of one organism to control another, and therefore its Biocontrol agents are of great importance for research. It is in this context that the objective of this work was to verify the effects of microbiolization with Bacillus isolates on soybean seeds with different vigor levels and to evaluate the interaction of these variables on the severity of Asian rust, downy mildew and powdery mildew, yield components. The experiment was conducted in a 4 x 2 factorial (vigor x microbiolization levels), with 4 replications, in a randomized block design (DBC). For the implementation of the experiment, the seeds were submitted to microbiolization using a Bacillus isolate (RD34). The seeds used were from cultivar M6410 IPRO with 4 vigor levels: 74%, 77%, 97% and 99%. Weekly evaluations were performed to quantify the severity of diseases such as Asian rust, downy mildew and powdery mildew. These data were used to calculate the area under the disease progress curve (AACPD). The defoliation index was also evaluated and the total number of vegetables per plant, the number of fertile and infertile vegetables, as well as the grain diameter (mm). yield (Kg. Ha<sup>-1</sup>) and weight of one thousand grains (PMG) were counted.) (g). Microbiolization with Bacillus isolate in seeds with different vigor levels had no effect on reducing the severity of Asian rust, downy mildew and powdery mildew. Plants from seeds with lower vigor levels showed higher severity to powdery mildew compared to plants from higher vigor levels. Higher vigor provided a larger grain diameter. Microbiolization of low vigor seeds reduced defoliation of soybean plants. The highest number of vegetables per plant was observed in plants from seeds that received the microbiolization of Bacillus isolates.

Keywords: Bacillus spp. Glycine max. Biological control. Productivity.

#### **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 - Croqui do experimento desenvolvido com a cultivar de soja M6410 IPRO
com diferentes níveis de vigor, submetidas ou não a microbiolização das sementes
com o isolado RD3425
Figura 2 - Escala diagramática para avaliação de severidade de ferrugem asiática
da soja27
Figura 3 - Escala diagramática para severidade de míldio em soja causado por
Peronospora manshurica (porcentagem de área foliar coberta com sintomas) 27
Figura 4 - Escala diagramática para quantificação da severidade do oídio da soja
(Erysiphe diffusa) (Mattiazzi, 2003)
Figura 5 - Escala diagramática para avaliação de desfolha provocada por doenças
em soja28

### **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Área abaixo da curva de progresso da ferrugem asiática, míldio e oídic
(AACPD) na parte superior de plantas de soja oriundas de sementes com diferentes
níveis de vigor30
Tabela 2 - Área abaixo da curva de progresso da ferrugem asiática, míldio e oídio
(AACPD) na parte superior de plantas de soja cujas sementes foram microbiolizadas
ou não com <i>Bacillus</i> (RD34)31
Tabela 3 - Área abaixo da curva de progresso da ferrugem asiática, míldio e oídio
(AACPD) na parte inferior de plantas de soja oriundas de sementes com diferentes
níveis de vigor32
Tabela 4 - Área abaixo da curva de progresso da ferrugem asiática, míldio e oídic
(AACPD) na parte inferior de plantas de soja cujas sementes foram microbiolizadas
ou não com <i>Bacillus</i> (RD34)
00 1100 00111 <i>Daomao</i> (1120 1)
Tabela 5 - Porcentagem de desfolha de plantas de soja oriundas de sementes com
diferentes níveis de vigor e microbiolizadas ou não com <i>Bacillus</i> (RD34) 33
Tabela 6 - Número total de legumes, legumes férteis e legumes inférteis de plantas
de soja oriundas de sementes com diferentes níveis de vigor
Tabela 7 - Número total de legumes, legumes férteis e legumes inférteis de plantas
de soja cujas sementes foram microbiolizadas ou não com Bacillus (RD34) 35
Tabela 8 - Diâmetro de grãos (mm), peso de mil grãos (g) e a produtividade (Kg.
ha <sup>-1</sup> ) de plantas de soja oriundas de sementes com diferentes níveis de vigor 36
Tabela 9 - Diâmetro de grãos (mm), peso de mil grãos (g) e a produtividade (Kg.
ha <sup>-1</sup> ) de plantas de soja cujas sementes foram microbiolizadas ou não com <i>Bacillus</i>
(RD34)
(11DOT)

# SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	.10
2	REVISÃO DE LITERATURA	.12
2.1	CULTURA DA SOJA	. 12
2.2	FATORES QUE AFETAM A CULTURA DA SOJA	.13
2.3	VIGOR DE SEMENTES NO ESTABELECIMENTO E RENDIMENTO DA CULTURA DA SOJA	
2.4	DOENÇAS DA CULTURA DA SOJA	18
2.4.1	Ferrugem asiática ( <i>Phakopsora pachyrhizi</i> )	18
2.4.2	Míldio (Peronospora manshurica)	. 20
2.4.3	Oídio (Microsphaera difusa)	20
2.5	MANEJO DE DOENÇAS NA CULTURA DA SOJA	21
2.5.1	Controle biológico	22
3	MATERIAIS E MÉTODOS	. 24
3.1	IMPLANTAÇÃO DO EXPERIMENTO	. 24
3.2	AVALIAÇÕES	.26
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	.30
5	CONCLUSÃO	38
REFE	RÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	. 39

### 1 INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é a oleaginosa de maior destaque a nível mundial, estando sua produção em crescimento constante devido ao aumento de produtos oriundos do grão, além de se levar em conta as demandas do mercado consumidor (HIRAKURI; LAZZAROTTO, 2014). Em relação aos produtos procedentes da soja, tem-se que o farelo representa 40% da comercialização, sendo esse considerado um importante componente na dieta animal e bastante representativo na alimentação humana, além do fato de que o esmagamento dos grãos para obtenção do óleo de soja se refere a pelo menos 20% do montante da produção total a nível mundial (DALL'AGNOL; HIRAKURI, 2008).

O crescimento da produção pode ser observado de maneira direta ao crescente da produção, uma vez que, nos últimos anos, está vem apresentando acréscimos de pelo menos 3,5% por safra, comparado com as anteriores, ultrapassando 119 milhões de toneladas (CONAB, 2018). Entre os fatores ligados a esse crescimento no Brasil pode estar o fato da expansão da fronteira agrícola (FREITAS, 2011), além das adequadas condições edafoclimáticas observadas durante o ciclo da soja nas últimas safras (HIRAKURI, 2016).

No sentido de crescimento e aumento da produção de soja, o vigor de sementes é um dos principais atributos da qualidade fisiológica a ser considerado ao se implantar uma lavoura (SCHEEREN et al., 2010). Sementes de elevada qualidade são essenciais para termos acesso aos avanços genéticos, com garantias de qualidade e tecnologias de adaptação às mais diversas regiões, e proporcionando a germinação das plântulas mais rapidamente, resultando em plantas de alto desempenho, com potencial produtivo mais elevado (FRANÇANETO et al., 2016).

O melhoramento genético vem selecionando os melhores alelos, que garantem o aprimoramento das gerações futuras (ARRUDA, 2012), o melhoramento genético na soja trouxe benefícios como a adaptação às baixas latitudes, por meio da introdução de genes para o "período juvenil longo" podendo assim ser expandida a semeadura para a região Nordeste, incremento da resistência às principais doenças, nematoides, e aumento da produtividade (CALVO; KIIHL, 2006).

Por outro lado, um possível limitador desse crescimento pode estar atrelado ao fato da ocorrência de fatores bióticos e abióticos durante o ciclo da cultura,

gerando dificuldades na busca pelo máximo potencial produtivo no cultivo da soja (NAVARRO; COSTA, 2002). Dentre esses fatores, as doenças fazem parte do grupo mais significativo, estimando-se cerca de 40 patógenos capazes de causar danos identificados para a cultura da soja no Brasil (TECNOLOGIAS..., 2013). Em relação a essas doenças, a ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*) é a mais significativa, podendo reduzir até 90% a produtividade (SINCLAIR; HARTMANN, 1999). Além dessa, outras doenças vêm apresentando crescente desenvolvimento e capacidade de reduzir significativamente a produtividade, dentre elas tem-se o míldio (*Peronospora manshurica*) e o oídio (*Microsphaera difusa*) (KOWATA et al., 2008).

O míldio é uma doença com potencial de disseminação muito elevado, pode causar danos de 8 a 14% na produtividade (RHANE E RUHL, 2003). Esse patógeno é capaz de causar danos a cultura da soja quando exposto a condições de elevada umidade e temperaturas amenas sendo sua disseminação pelo vento (PICININI; FERNANDES, 2000). O oídio, que também é uma doença com vasto potencial em causar danos, pode atingir a planta de soja em qualquer estágio de desenvolvimento, sendo favorecida por condições de baixa umidade e de temperaturas variando entre 18 e 24°C (GODOY et al., 2014).

Para contornar os danos causados por patógenos podemos lançar mão do controle cultural, genético, químico ou biológico, sendo que o controle biológico consiste na utilização de um organismo para controle de outro, ocorrendo dessa forma uma interação com o patógeno, o hospedeiro e o antagonista (BETTIOL; GHINI; 1995). Ainda são raros os trabalhos utilizando organismos procariotos para o controle de doenças causadas por fitopatógenos biotróficos (BETTIOL; GARIBALDI; MIGHELI, 1997). Nesse contexto, o objetivo do trabalho foi verificar o impacto da microbiolização com um isolado de *Bacillus* em sementes de soja, com diferentes níveis de vigor na severidade da ferrugem asiática, míldio e oídio, bem como, em componentes de rendimento da cultura.

#### 2 REVISÃO DE LITERATURA

#### 2.1 CULTURA DA SOJA

A soja (*Glycine max* L.), teve sua primeira referência como alimento a mais de 5.000 anos, sendo sua domesticação realizada de forma gradual pelos chineses, através de sucessivos cruzamentos naturais que possibilitaram a sua utilização na alimentação humana e animal. A sua chegada ao Brasil foi por volta do século XX (NUNES, 2016), entretanto, sua distribuição foi lenta devido às condições climáticas e adaptabilidade, e, apenas na década de 70 houve o maior ritmo de expansão em termos econômicos da mesma (BONATO; BONATO, 1987).

Devido ao intenso melhoramento, os grãos de soja apresentam atualmente cerca de 40% de proteína, 21% de óleo, 34% de carboidrato e 5% de cinzas na base seca (PERKINS, 1995 apud PÍPOLO et al., 2015, p. 01), desta forma a soja pode ser destinada a produzir mais de 400 produtos industriais que vão desde a alimentação humana e animal, até lubrificantes e graxas, detergentes, adjuvantes para pesticidas agrícolas, isolantes e adesivos, plásticos, aditivos para o diesel, espuma para extintores de incêndio, anticorrosivos, antibióticos, substitutos do couro, tintas, etc. (DALL'AGNOL, 2004).

Conforme números divulgados pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) os principais países produtores de soja no mundo na safra 2017/18 foram Brasil, Estados Unidos, Argentina e China, respectivamente (USDA apud CONAB, 2019). Ainda conforme números divulgados pela CONAB o Brasil se mantém como o maior exportador de soja em grão, com cerca de 76,18 milhões de toneladas, seguido dos Estados Unidos com 57,95 e Argentina com 2,11 milhões de toneladas.

A soja é o quarto grão mais consumido e produzido globalmente, atrás somente do milho, trigo e arroz (HIRAKURI; LAZZAROTTO, 2014), sendo que o processo de melhoramento proporcionou, por meio de programas de otimização, a expansão do cultivo da soja no mundo, impulsionando a produção.

O aumento da produção da soja no Brasil pode ser alavancado pela disponibilidade de tecnologias e pesquisas, por uma cadeia produtiva bem estruturada além de um mercado sólido (HIRAKURI, 2016). Adicionalmente, podese atrelar esses ganhos com o aumento da área plantada para outras regiões e a

correta utilização de técnicas de manejo visando obter o máximo de produtividade da cultura (HIRAKURI; LAZZAROTTO, 2014).

Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em comparação a área cultivada com soja no Brasil, que em 2018 foi de 34,9 milhões de hectares, em 2019 teve um acréscimo de mais de meio milhão de hectares chegando a 35,5 milhões de hectares (IBGE, 2019). No que se refere a produção, o Brasil produziu 115,030 milhões de toneladas do grão na safra 2018/2019 (CONAB, 2019), com destaque para as regiões Sul e Centro-Oeste comportando 81,04% da área nacional de produção de soja. O estado do Mato Grosso é líder na produção de soja no Brasil (FREITAS, 2011), alcançando, na safra 2018/19, 31,6 milhões de toneladas do grão (IBGE, 2019).

Na região Sul, em referência o estado do Rio Grande do Sul segundo dados da CONAB (2019), a área cultivada ganhou um incremento quando comparada à última safra 17/18, sendo que na safra 18/19 a área total cultivada foi de 8.702,8 milhões de hectares, apresentando assim um aumento de 0,5%, e a área cultivada com a oleaginosa foi de 5.709,034 milhões de hectares. A produtividade na última safra foi de 3.104 Kg por hectare IBGE (2019), e a produção atingiu 17.538.575 mil toneladas no RS, entretanto, para a safra 19/20 projeta-se que a produção tenha acréscimos.

#### 2.2 FATORES QUE AFETAM A CULTURA DA SOJA

Apesar da crescente expansão da produção e das áreas de cultivo, a cultura da soja é facilmente prejudicada por fatores abióticos, com destaque para os fatores climáticos, dentre os quais aparecem a disponibilidade hídrica, a temperatura e o fotoperíodo (FARIAS; NEPOMUCENO; NEUMAIER, 2007).

O déficit hídrico é o fator que pode acarretar em maiores prejuízos de rendimento na cultura da soja, uma vez que a distribuição das chuvas é desuniforme em algumas regiões do país (BALARDIN et al., 2011). Vale ressaltar que a água faz parte de 90% do peso da planta e que participa de processos fisiológicos e bioquímicos, ainda tem a função de solvente, proporcionando que minerais, gases e outros entrem nas células e acabam se movendo pela planta (FARIAS; NEPOMUCENO; NEUMAIER, 2007). Assim, a falta de água em qualquer estádio de desenvolvimento da planta pode acarretar em alterações significativas na

produção de massa e, desta forma, afetar o balanço entre o crescimento vegetativo e reprodutivo na planta (MUNDSTOCK; THOMAS, 2005).

A água, tanto em falta como em excesso, no estádio de germinaçãoemergência é prejudicial para o estabelecimento da cultura, pois a semente necessita absorver cerca de 50% do seu peso em água para se obter um índice considerável de germinação (FARIAS; NEPOMUCENO; NEUMAIER, 2007).No estádio de floração-enchimento de grão a necessidade de água atinge o maior pico devido à grande área foliar e os processos que estão ocorrendo de maneira isolada, em caso de falta o resultado será o abortamento de flores, óvulos e legumes e posteriormente redução do tamanho de grãos (MUNDSTOCK; THOMAS, 2005).

Quando nos referimos a temperatura ideal para o desenvolvimento da cultura da soja tem-se uma média de 20°C a 30°C, sendo o ideal próximo aos 30°C, mas, para uma boa germinação e posterior emergência, recomenda se que a semeadura seja realizada com a temperatura do solo superior a 20°C (EMBRAPA, 2010). Quando a temperatura for menor que 10°C o crescimento vegetativo da soja é nulo ou insignificante e, quando ultrapassa os 40°C ocorrem efeitos adversos no crescimento da cultura, havendo então prejuízos na floração e diminuição na retenção de vagens, tendo esses problemas agravados quando há também um déficit hídrico ocorrendo nesta fase, ainda que a floração só é induzida quando há temperaturas acima de 13°C (FARIAS; NEPOMUCENO; NEUMAIER, 2007).

Da mesma forma, o fotoperíodo é outra variável determinante no cultivo da soja pois, é considerada uma planta de dias curtos (EMBRAPA, 2010), em que cada cultivar tem seu fotoperíodo crítico, sendo que acima deste o florescimento é atrasado, fazendo com que a adaptabilidade da soja varie de acordo com o deslocamento tanto para o norte quanto para o sul. Desta forma, uma solução para essa sensibilidade ao fotoperíodo é o chamado "período juvenil longo", cujas plantas/cultivares possuem maior adaptabilidade possibilitando a sua utilização em faixas mais amplas de latitudes e distintas épocas de semeadura (FARIAS; NEPOMUCENO; NEUMAIER, 2007).

Além dos fatores abióticos já citados, a soja é dependente de condições nutricionais para que seu máximo rendimento seja expressado, desta forma o solo deve ser capaz de dar suporte para o crescimento e ancoragem das plantas, e favorecer o suprimento de água, nutrientes e oxigênio para as mesmas (BLAINSKI; FIDALSKI; GUIMARÃES, 2008). Quanto ao nitrogênio (N), nutriente fundamental

para a formação de proteínas, aminoácidos e outros ácidos (TAIZ; ZIEGER, 2009), a soja não requer adubação nitrogenada mineral, devido a fixação biológica suprir as demandas da planta (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2001). Dados têm mostrado que no Brasil se economiza cerca de 3,2 bilhões de dólares na compra de adubos nitrogenados (FAGAN, 2007).

Além do nitrogênio, outros minerais são essenciais para a ativação enzimática, constituição de enzimas e funções estruturais (MALAVOLTA, 2006). Como é o caso do fósforo (P), que atua na planta fornecendo energia para reações biossintéticas e para o metabolismo vegetal, sendo absorvido predominantemente na forma iônica H<sub>2</sub>PO<sub>2</sub>. Em caso de deficiência, o P pode acabar saindo da célula e ser direcionado para órgãos mais jovens da planta (SFREDO, 2008).

O potássio (K) é o segundo elemento mais absorvido pelas plantas de soja sendo que para cada 1.000 kg de sementes produzidas são extraídos 20 kg de K<sub>2</sub>O (MASCARENHAS et al., 2004). Ele é absorvido como K<sup>+</sup> e sua função nas células é de ativador enzimático, devido mais de 60 enzimas requererem sua presença, é responsável pela regulação do fechamento e abertura dos estômatos das célulasguarda e pela turgidez do tecido, bem como sua presença diminui a incidência de doenças e aumenta a resistência ao acamamento (SFREDO, 2008).

Outros nutrientes importantes para o desenvolvimento da soja e contribuição na elevação dos índices produtivos são o cálcio (Ca) e o magnésio (Mg), que tem baixo custo e são adicionados por meio da calagem para elevar o pH do solo (BERGAMIN et al., 2011).

Assim como os fatores discutidos anteriormente contribuem para garantir a produção, a utilização de sementes de alta qualidade é de fundamental importância para assegurar o estabelecimento de uma população de plantas vigorosas e em número adequado e, quando associada a boas práticas de semeadura, contribui para que máximas produtividades sejam alcançadas (KRZYZANOWSKI et al., 2008). Além disso, sementes de qualidade permitem o acesso aos avanços genéticos, com as garantias de qualidade e tecnologias de adaptação nas diversas regiões, da mesma forma que se assegura o estabelecimento de uma população adequada de plantas, mesmo sob condições de estresses (FRANÇA-NETO et al., 2016).

Além dos fatores abióticos, que tem forte influência sobre os rendimentos da cultura da soja, os fatores bióticos também acometem a cultura causando injúrias,

dentre os quais podemos destacar as plantas daninhas, os insetos-pragas e as doenças. As plantas daninhas acarretam perdas na produtividade devido, principalmente, à competição por luz, nutrientes e água, além de dificultarem a colheita (TECNOLOGIAS..., 2013). Segundo dados de Nepomuceno et al., (2007), a interferência das plantas daninhas durante todo o ciclo da cultura reduz a produtividade de grãos de soja, em média, 46% no sistema de semeadura direta (SSD) e 32% no sistema de semeadura convencional (SSC) e ainda atuam como hospedeiras de pragas e doenças e exercem pressão de natureza alelopática.

No que se refere a insetos-praga, a cultura da soja pode ser prejudicada da semeadura a colheita (DEGRANDE; VIVAN, 2011/2012), e, dentre os que mais prejudicam a cultura destacam-se o complexo de lagartas, que se alimentam de folhas, e os percevejos, que sugam o conteúdo dos grãos (TECNOLOGIAS..., 2013). Populações de insetos-praga podem ser controladas naturalmente por predadores, parasitoides e entomopatógenos, conhecidos como inimigos naturais (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000), no entanto, quando se utiliza inseticidas, acaba-se por eliminar alguns destes microorganismos benéficos podendo resultar em um aumento das pragas após cessado o efeito do inseticida (ROSSETTO; LOURENÇÃO; MIRANDA, 1984).

Visando minimizar esses impactos negativos, desenvolveu-se uma ferramenta denominada Manejo Integrado de Pragas (MIP), que visa a utilização da combinação de práticas como o controle biológico, a rotação de culturas, o uso de cultivares resistentes, o manejo do solo, a manipulação da época de semeadura e a utilização de inseticidas que se enquadram no MIP no controle dos insetos (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000).

Com relação as injurias causadas por doenças, a ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*) é a mais significativa, podendo reduzir até 90% de toda a produtividade (SINCLAIR; HARTAMANN, 1999). Além dessa, outras doenças vêm apresentando crescente desenvolvimento e capacidade em reduzir significativamente a produtividade, dentre elas tem-se o míldio (*Peronospora manshurica*) e o oídio (*Microsphaera difusa*) (KOWATA et al., 2008).

# 2.3 VIGOR DE SEMENTES NO ESTABELECIMENTO E RENDIMENTO DA CULTURA DA SOJA

Podemos definir vigor de sementes como sendo a soma de atributos, os quais conferem a semente o potencial para germinar, emergir e resultar rapidamente em plântulas normais sob ampla diversidade de condições ambientais. Observa-se então sua importância para a agricultura, que é o rápido e uniforme estabelecimento da população adequada de plantas no campo (KRYZANOWSKI, 1999 apud SILVA, 2010).

Ao implantar uma lavoura, o vigor de sementes é um dos principais atributos da qualidade fisiológica a ser considerado (SCHEEREN et al., 2010), pois ao se usar sementes de elevada qualidade temos acesso aos avanços genéticos, com garantias de qualidade e tecnologias de adaptação nas mais diversas regiões o que assegura maiores produtividades. O alto vigor também proporciona a germinação das plântulas mais rapidamente, resultando em plantas de alto desempenho, com potencial produtivo mais elevado (FRANÇA-NETO et al., 2016).

Uma maior velocidade de emergência e produção de plântulas com maior tamanho, faz com que as plântulas oriundas de sementes vigorosas tenham uma vantagem no aproveitamento de água, luz e nutrientes, devido essas plântulas emergirem mais rapidamente, e começarem seu processo fotossintético mais cedo, o que por sua vez favorece o desenvolvimento da parte aérea e do sistema radicular (KOLCHINSKI; SCHUCH; PESKE, 2005). Resultados encontrados por Scheeren et al., (2010) mostram que a produtividade por área obtidas dos lotes de alto vigor podem ser 9% superiores aos de baixo vigor e que as plantas provenientes de sementes de alto vigor apresentam maior altura aos 21 dias após a semeadura.

O uso de sementes com baixa qualidade no campo compromete a obtenção de um estande de plantas adequado (KRZYZANOWSKI et al., 2008), bem como desuniformidade, má distribuição e desenvolvimento, o que pode afetar o rendimento econômico (MELO, 2005 apud SILVA, 2010).

A qualidade das sementes de soja pode ser afetada pelos mais diversos fatores que vão desde a fase de produção no campo, na operação de colheita, na secagem, no beneficiamento, armazenamento, transporte e na semeadura. Estes fatores abrangem temperaturas extremas durante a maturação, flutuações de umidade do ambiente, o que inclui seca, injúrias causadas por insetos e deficiências na nutrição das plantas, bem como utilização de técnicas inadequadas de colheita, secagem e armazenamento (FRANÇA-NETO et al., 2016).

#### 2.4 DOENÇAS DA CULTURA DA SOJA

A soja é uma das culturas mais suscetíveis ao ataque de patógenos uma vez que, segundo Henning et al., (2009), um produtor pode perder de 15 a 20% em cada safra devido a ocorrência de doenças. Em âmbito mundial, cerca de 100 patógenos podem causar danos a cultura, e, em termos de país, considerando as condições edafoclimáticas do Brasil, cerca de 40 patógenos distintos podem atingir a cultura. As doenças de maior ocorrência fazem menção a ferrugem asiática, oídio, míldio, mancha alvo e antracnose, sendo objetos de estudo, no presente trabalho, as três primeiras.

Considerando a cultura como suscetível a uma ampla gama de doenças, é imprescindível o uso de métodos de controle de forma a evitar perdas de produtividade, dentre os quais se destaca o uso de sementes com qualidade sanitária e de cultivares resistentes aliado ao tratamento fitossanitário adequado (MERTZ; HENNING; ZIMMER, 2009). Além disso, é necessária uma adubação correta, rotação de culturas e o uso de formas de manejo do solo viáveis (TECNOLOGIAS..., 2013).

Em relação aos patógenos, os que se desenvolvem no sistema radicular das plantas de soja podem se tornar prejudiciais ao estabelecimento da cultura (MICHEREFF, ANDRADE, MENEZES, 2005). No caso da ferrugem, que se desenvolve apenas na parte aérea das plantas, os danos podem chegar a 90% (SINCLAIR; HARTMANN, 1999).

#### 2.4.1 Ferrugem asiática (Phakopsora pachyrhizi)

A ferrugem asiática é classificada como a doença mais importante da cultura da soja quando considerada sua potencialidade de causar danos (HENNING et al., 2009). O agente causal é o fungo *Phakopsora pachyrhizi Syd.* & P. Syd., classificado como biotrófico em função de ter sua sobrevivência apenas nos tecidos vivos (ARAÚJO, 2009).

As consequências da ocorrência desta doença condizem com a diminuição da área fotossintética causada pela desfolha precoce (CARVALHO, 2010). Em relação ao fator histórico da doença, ela é considerada nova no Brasil, visto que seu

primeiro aparecimento foi registrado na safra de 1999/2000 (YORINORI; LAZZAROTTO, 2004). Mesmo com esse reconhecimento recente, estima-se que nesse período a ferrugem asiática já tenha causado prejuízos superiores a 16 bilhões apenas na América do Sul, incluídos nesse valor o uso de controles químicos e perdas de produtividade (LIMA et al., 2012).

Os sintomas de ataque da doença podem ser observados em qualquer estádio da planta, embora sejam mais visíveis no início da floração até o período de enchimento de grãos (GRIGOLLI, 2014). As lesões iniciam apresentando uma coloração verde-acinzentada e acabam por se tornar marrom-avermelhadas (UGALDE, 2005). Na face abaxial da folha, tem-se a ocorrência de pústulas que se rompem e liberam os uredósporos (OLIVEIRA; GODOY; MARTINS, 2005), sendo que esses se disseminam facilmente pelo vento e acabam por afetar outras plantas e em vezes até mesmo outras lavouras (ARAÚJO, 2009).

Os processos que ocorrem dentro do ciclo da relação patógeno-hospedeiro são diretamente influenciados por fatores abióticos (ALVES et al., 2007). Deste modo, a penetração do patógeno ocorre através da cutícula presente nas folhas da soja (ARAÚJO, 2009) e a infecção ocorre com condições de umidade relativa em torno de 75% e temperaturas variando entre 15°C e 28°C (GRIGOLLI, 2014). Além disso tem a necessidade de molhamento foliar, de forma a esse ter ocorrência em pelo menos seis horas/dia (HENNING et al., 2005).

Em relação a plantas hospedeiras do fungo *P. pachyrhizi*, tem-se em torno de 87 espécies e 40 gêneros (ANDRADE; ANDRADE, 2002), desses o kudzú (*Pueraria lobata*) é visto como a principal planta hospedeira do fungo (PARK et al., 2008).

O controle da ferrugem asiática inicia com o manejo adequado da cultura, tratando como prioridade nesse a semeadura antecipada, considerando o início da época indicada para a soja na região de referência, além do uso eminente de cultivares com procedência como forma de evitar que se tenha nessas uredosporos produzidos no final do ciclo anterior (YORINORI; JUNIOR, LAZZAROTTO, 2004).

As cultivares consideradas como resistentes a ferrugem tem nomenclatura popularmente conhecida como soja Inox (FREITAS, 2011). Segundo Siqueri et al., (2011), existem diferentes níveis de suscetibilidade entre as cultivares certificadas como inox, e, mesmo que essas cultivares apresentem resistência, há possibilidade

de quebra da mesma, uma vez que o fungo apresenta dezoito raças já identificadas (YAMAOKA et al., 2002).

Anterior a comercialização da soja inox, o único meio de controle da ferrugem asiática era controle químico, entretanto Fiallos (2011) expõe a necessidade de, mesmo com o uso dessas cultivares, o complemento com o uso de fungicidas com vistas a evitar ataques mais severos do fungo em condições de quebra de resistência.

#### 2.4.2 Míldio (Peronospora manshurica)

O míldio é uma doença que afeta a cultura da soja e é amplamente disseminada no Brasil (RHANE E RUHL, 2003). Sendo identificada no país tendo como referência a cidade de Pelotas, estado do Rio Grande do Sul, na safra de 1966/67 (VERNETTI; FERREIRA, 1970). A doença pode causar danos de 8 a 14% quando relacionados ao total de produtividade, além da redução no peso de grãos e também no teor de proteínas desses (FERREIRA; LEHMAN; ALMEIDA, 1979 apud WARPECHOWSKI, 2018).

O agente causador do míldio é *Peronospora manshurica* (Naoumoff) Sydow ex Gäuman, capaz de causar danos à cultura quando submetida a condições de elevada umidade e temperaturas amenas, sendo os esporos do fungo conduzidos pelo vento (GODOY et al., 2014). Os sintomas são manchas de coloração verde claro, que posteriormente evoluem e passam a apresentar coloração amarelada (HENNING et al., 2005). Infecções na vagem podem resultar em deterioração da semente (HENNING et al., 2014), além de apresentarem aspecto pulverulento devido a presença de oósporos nas mesmas (REIS; DANELLI; CASA, 2010).

Em relação às condições edafoclimáticas, a doença é favorecida por períodos de molhamento foliar superior a 12 horas e temperaturas entre 20 e 22° C, durante qualquer um dos estágios fenológicos da cultura (PICININI; FERNANDES, 2000).

#### 2.4.3 Oídio (Microsphaera difusa)

O oídio é causado pelo fungo *Microsphaera diffusa* Cooke & Peck e pode atacar a planta de soja em quaisquer de seus estágios de desenvolvimento, sendo

favorecida em condições de baixa umidade relativa do ar e temperaturas entre 18°C e 24°C (GODOY et al., 2014).

O fungo germina na superfície da folha e produz uma camada de micélio de coloração acinzentada, sendo esse o fator que propicia a identificação da doença. Em casos de ataque severo da mesma tem-se a diminuição da área fotossintética com a queda prematura das folhas (YORINORI, 1997).

Em relação ao controle dessa doença o mais indicado, segundo Henning et al., (2005), é a utilização de cultivares resistentes, embora seja possível o uso de fungicidas triazóis e estrobilurinas, os quais também são recomendados para o controle da ferrugem asiática (HENNING et al., 2009).

#### 2.5 MANEJO DE DOENÇAS NA CULTURA DA SOJA

Em relação aos métodos e estratégias de controle de doenças na cultura da soja, destaca-se o controle cultural, o qual visa a eliminação do patógeno mediante a destruição do substrato, base da sobrevivência dos mesmos. Pode ser realizado fazendo uso da rotação de culturas, preparo do solo ou escolha da época de plantio (FORCELINI; REIS, 1995).

Outra forma é o controle biológico, que dentre os métodos de controle, é o que vem ganhando mais espaço com o passar dos anos. Sua metodologia consiste na utilização de um organismo para controle de outro, ocorrendo dessa forma uma interação entre patógeno, o hospedeiro e o antagonista (BETTIOL; GHINI; 1995). Esse mecanismo envolve densidade recíproca, onde uma população é controlada por outra população, isto é, um inseto praga é sempre controlado por outro inseto, que por sua vez é predador da inseto praga (BARBOSA, 2006).

Além disso, o uso de óleos ou mesmo extratos vegetais vem apresentando resultados positivos quando a questão é o controle de doenças, possuindo ainda outra vantagem, a qual seria de apresentar mais sítios de ação no controle de fungos, aumentando dessa forma seu potencial de controle de doenças (BORGES, 2007).

O controle genético é outra alternativa que vem, ao longo dos anos, aprimorando suas metodologias, visto que cada vez mais são utilizados genes, na agricultura, com potencial de fornecerem resistência às plantas (MICHEREFF,

2001). É considerado um dos métodos mais eficazes e tem atuação direta na ativação dos mecanismos de defesa da planta (MENEGHETTI et al., 2010). Entretanto devido à grande diversidade e origem de novas raças de patógenos, o uso de controle genético é, em partes prejudicado pela quebra da resistência das cultivares (SINCLAIR; HARTMANN, 1999).

Visto as adversidades da execução dos métodos de controles citados, o controle químico apresenta-se como uma alternativa mais eficaz e otimizada, levando em conta principalmente um controle com resposta a curto prazo (KIMATI, 1995). Atualmente é o método mais utilizado no controle de doenças para a cultura da soja, levando em consideração sua facilidade de aplicação e resultados imediatos (NAVARINI et al., 2007).

#### 2.5.1 Controle biológico

O controle biológico com o passar dos anos vem conquistando espaço de destaque em relação à pesquisa científica, devido principalmente a inserção da agroecologia na pauta de debates acadêmicos. A agroecologia como ciência pode ser entendida como uma forma de transição entre os atuais modelos de produção e desenvolvimento agrícola convencional para um modelo de agricultura sustentável (CAPORAL e COSTABEBER, 2004).

No que se refere ao controle biológico, conforme explica Bettiol et al., (2009), os microorganismos com potencial para o biocontrole de doenças de plantas são considerados ideais visto que apresentam um grande número de características desejáveis, como por exemplo baixa frequência de mutações, resistência tanto a altas como a baixas temperaturas, fácil adaptação ao agroecossistema ao qual serão posteriormente introduzidos, considerável capacidade de sobrevivência, colonização, competição e multiplicação no ambiente, e, compatibilidade com agrotóxicos para que, se necessário, se possa combinar esses dois métodos de controle distintos.

Dentre as principais interações antagônicas que ocorrem entre os microorganismos pode-se citar a antibiose, o parasitismo, a competição e a indução de resistência em plantas.

A antibiose faz referência a interação entre organismos, sendo que esses secretam metabólicos prejudiciais ao desenvolvimento de determinados indivíduos

de outras espécies, inibindo-os (BEDENDO, 2011). O parasitismo, por sua vez, faz referência a interação entre organismos, em que determinado microrganismo se nutre das estruturas vegetativas e/ou reprodutivas do outro (BETTIOL et al., 2009). Em relação a competição, o que ocorre é a interação entre dois ou mais organismos, empenhados na disputa por alimentos (carboidratos e fatores de crescimento) e espaço (MICHEREFF, 2001).

Já a indução de resistência consiste em ativar mecanismos de defesa da planta ou parte desta, contra o ataque de patógenos (GUIMARÃES et al., 2008). A possibilidade de ativação desses genes, em determinadas condições, torna as plantas mais resistentes aos patógenos, sendo que o agente indutor pode ser um ativador químico, extratos de células de microrganismos ou microrganismos vivos (ARAUJO; MENEZES, 2009).

Em âmbito geral o uso de agentes para fins de controle biológico de doenças em plantas tem grande importância, seja para a seleção de antagonistas com considerável ação de controle sobre o patógeno como também na indução de resistência desses.

Dentre os microorganismos com maior potencial destaca-se o gênero *Trichoderma*. Trata-se de um fungo que pode ser aplicado via tratamento de sementes garantindo a colonização da espermosfera e também das raízes das plântulas e protegendo as mesmas do ataque de parasitas não especializados (LOHMANN et al., 2007) ou adicionado ao substrato podendo proporcionar o crescimento de plântulas ou o controle de patógenos que atacam os tecidos jovens desta (LUCON, 2008).

Dentre os procariotos, merece destaque o gênero *Bacillus*. A utilização desse agente no controle biológico tem se mostrado eficiente devido ao mesmo ocupar nichos ecológicos distintos, muitos deles em associação com plantas, estabelecendo-se na rizosfera, rizoplano, filoplano e nos tecidos internos, onde se multiplicam, sobrevivem e se protegem da ação antagonista do restante da microflora autóctone (ONGENA et al., 2005 apud LANNA FILHO; FERRO; PINHO, 2010). Em trabalho realizado anteriormente por Mattos (2017), foi evidenciado o potencial de um isolado de *Bacillus* na promoção de crescimento de soja a campo, no entanto, ainda se tem um entrave para a consolidação definitiva do controle biológico a base de *Bacillus* devido a dificuldades na obtenção de formulação para uso comercial (MERTZ; HENNING; ZIMMER, 2009).

#### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

O presente experimento foi conduzido durante o período de novembro de 2018 e abril de 2019, no campo da área experimental da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), campus Cerro Largo, localizada em Cerro Largo (latitude 28º08´29.7´´S, longitude 54º45´30.9´´W e altitude de 197 metros). A área utilizada vinha sendo manejada sob semeadura direta de nabo, ervilhaca e azevém em consórcio. A classificação do clima da região é Cfa, subtropical úmido (KUINCHTNER; BURIOL, 2001), e o solo conforme a classificação da Unidade de mapeamento Santo Ângelo é Latossolo Vermelho (EMBRAPA, 2013).

## 3.1 IMPLANTAÇÃO DO EXPERIMENTO

Para a implantação do experimento, a área foi revolvida com grade aradora, para que fosse possível o controle das plantas invasoras e fosse incorporada a matéria orgânica ao solo, bem como para facilitar a semeadura manual das sementes. Devido os patógenos em estudo serem biotróficos a palhada revolvida não afeta a incidência dos mesmos na cultura, devido seu inoculo primário ser transmitido de lavouras vizinhas através do vento.

Utilizou se a cultivar de soja M6410 IPRO que, segundo a detentora (MONSOY®), possui grupo de maturação 6.4, hábito de crescimento indeterminado, arquitetura de planta semi ereta, resistente ao acamamento, moderada resistência a podridão vermelha, mofo branco, mancha alvo, macrofomina e doenças de final de ciclo, porém é suscetível a nematóide de cisto, nematóide de galha (*Meloidogyne javanica*), nematóide de galha (*Meloidogyne incognita*) e podridão de fitóftora (*Phytophthora sojae*). Para o experimento foram utilizados 4 lotes desta cultivar com os seguintes níveis de vigor: 74%, 77%, 97%, 99%, segundo constatado no teste de emergência em areia.

Antes da semeadura, a área do experimento foi adubada com o auxílio de uma semeadora-adubadora KF 7/50–A COMPACTA que realizou a demarcação e efetuou a distribuição dos fertilizantes nas linhas do experimento. A adubação utilizada foi conforme a necessidade apresentada pela análise de solo realizada na área e segundo a interpretação dos resultados através do Manual de Calagem e

Adubação (GATIBONI; SILVA; ANGHINONI, 2016). Sendo necessário apenas a aplicação de fósforo (P) na quantidade de 116 Kg. ha-1 de Superfosfato Triplo (45% de P). A semeadura foi realizada manualmente, no dia 13 de novembro de 2018, seguindo orientações da detentora da cultivar, cuja população recomendada para a região do experimento é de 10 plantas por metro linear, não houve ajuste na densidade de plantas devido o intuito de observar o comportamento das plantas bem como a interação dos fatores avaliados.

Cada unidade experimental (parcela) foi composta por 5 linhas de 5 metros de comprimento e espaçamento de 0,50 m entre linhas, o que resultou em uma área de 12,5 m² por parcela. Foram utilizadas 32 unidades experimentais, compreendendo uma área de 400 m². O experimento foi conduzido em fatorial 4 x 2 (níveis de vigor x microbiolização), com 4 repetições, em delineamento experimental de blocos ao acaso (DBC) (Figura 1). Para área útil (AU) de cada parcela foram utilizadas as 3 linhas centrais de cada parcela, descartando-se 0,5 m nas extremidades, correspondendo a 6 m² de AU.

Figura 1 - Croqui do experimento desenvolvido com a cultivar de soja M6410 IPRO com diferentes níveis de vigor, submetidas ou não a microbiolização das sementes com o isolado RD34.

V99 R4	V97 M R3	V77 R2	V74 M R1
V74 R4	V77 M R3	V97 R2	V99 R1
V99 M R4	V97 R3	V74 M R2	V77 M R1
V74 M R4	V74 R3	V99 R2	V74 R1
V77 R4	V99 R3	V77 M R2	V99 M R1
V97 I R4	V74 I R3	V99 I R2	V97 I R1
V97 R4	V77 R3	V97 I R2	V77 R1
V77 I R4	V99 I R3	V74 R2	V97 R1

Nível de vigor das sementes: V74, V77, V97, V99. Sementes microbiolizadas: V74 M, V77 M, V97 M, V99 M. Sementes não microbiolizadas: V74, V77, V97, V99.

Elaborado pelo autor, 2019.

Antes da semeadura as sementes foram submetidas à microbiolização a qual consiste em aplicar microrganismos vivos as sementes para o controle de doenças ou para promover o crescimento de plantas (MELO, 1996). Utilizando assim um isolado de *Bacillus* (RD34), o qual foi repicado e isolado em placas de Petri contendo meio ágar-nutriente, e, após 48 horas de crescimento, a bactéria foi diluída com solução salina (NaCl 0,85%). A suspensão foi calibrada com a ajuda de um espectrofotômetro o qual através de um feixe de luz sobre uma amostra da suspensão interpola a quantidade de luz que passa pela amostra e nos informa a concentração, sendo que a mesma foi de OD540= 0,5 nanômetros. Dessa suspensão, foram vertidos 6,5mL em 1 Kg de sementes de soja, tendo o cuidado para não ocorrer um molhamento excessivo. Para cada nível de vigor, os lotes foram separados em 2 partes, sendo metade submetida a microbiolização e a outra metade recebeu apenas 6,5mL de solução salina 0,85%.

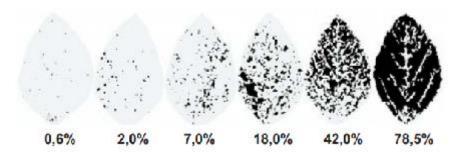
Durante a condução do experimento as condições climáticas favoráveis não exigiram que houvesse a irrigação das unidades experimentais, pois as chuvas foram frequentes desde o estabelecimento da cultura até o estádio de maturação para colheita, porem foram realizadas duas capinas durante os estádios iniciais da cultura para evitar a competição e realizar o controle de plantas daninhas.

# 3.2 AVALIAÇÕES

Quando as plantas iniciaram o seu florescimento, ou seja, pelo menos uma flor visível em qualquer nó do caule (estádio R1), iniciou-se as avaliações de severidade das seguintes doenças: ferrugem asiática, míldio e oídio. Para isso, foram escolhidas semanalmente, 10 plantas aleatórias na área útil de cada parcela, as quais foram divididas em duas porções visuais, sendo em 5 plantas coletadas 1 folíolo por planta na metade superior, e, nas outras 5 plantas 1 folíolo por planta na metade inferior, totalizando 10 folíolos por unidade experimental. As coletas/avaliações foram realizadas a cada 7 dias, até as plantas atingirem o estádio de maturação R7.

Para realizar as avaliações de severidade da ferrugem asiática utilizou se a escala diagramática proposta por Godoy, Koga e Canteri (2006) (Figura 2).

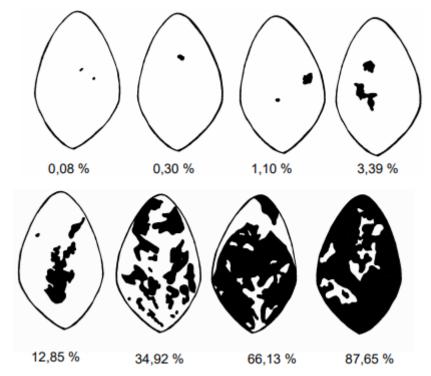
Figura 2 - Escala diagramática para avaliação de severidade de ferrugem asiática da soja.



Fonte: Godoy, Koga e Canteri (2006).

Da mesma forma para a avaliação da severidade causada por míldio foi utilizada a escala diagramática proposta por Kowata et al., (2008) (Figura 3).

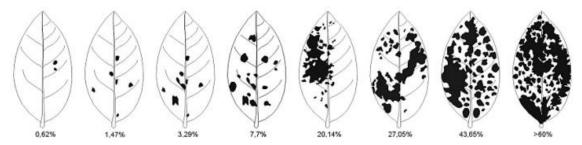
Figura 3 - Escala diagramática para severidade de míldio em soja causado por Peronospora manshurica (porcentagem de área foliar coberta com sintomas).



Fonte: Kowata et al., (2008).

Para a estimativa de severidade causada por oídio utilizou se a escala diagramática proposta por Mattiazzi (2003) (Figura 4).

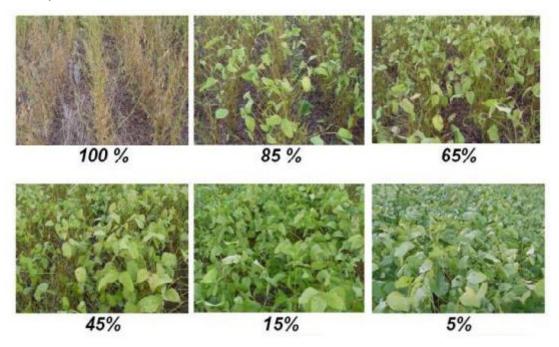
Figura 4 - Escala diagramática para quantificação da severidade do oídio da soja (*Erysiphe diffusa*) (Mattiazzi, 2003).



Fonte: Mattiazzi (2003).

Quando as plantas de soja atingiram o estádio R6 foi realizada a avaliação quanto a desfolha, seguindo a escala diagramática proposta por Hirano et al., (2010), a qual traz em porcentagem os níveis de desfolha em cada unidade amostral (Figura 5).

Figura 5 - Escala diagramática para avaliação de desfolha provocada por doenças em soja.



Fonte: Hirano et al., (2010).

A partir dos dados coletados em cada uma das avaliações de severidade para cada uma das doenças, os mesmos foram integrados em função do tempo (dias decorridos entre leituras consecutivas) para determinar a Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD). Para tanto foi utilizado a equação de

Campbell e Madden (1990) (NERBASS et al., 2008), a qual está demonstrada a seguir:

AACPD = 
$$\sum_{i}^{n-1} \left( \underbrace{y_{i} + y_{i+1}}_{2} \right) (t_{i+1} - t_{i})$$

#### Onde:

n = número de avaliações

y = intensidade da doença

t =tempo quando da avaliação da intensidade da doença.

Após a cultura atingir o estádio de maturação para a colheita (estádio R8), realizou se a coleta de dez plantas aleatoriamente dentro da área útil de cada parcela. Nestas plantas foi contabilizado o número total de legumes por planta, o número de legumes férteis e inférteis, sendo que para a contagem dos legumes inférteis eram analisados aqueles que não possuíam sementes, ou a mesmas eram deterioradas e legumes deformados, bem como foi avaliado o diâmetro de grãos (mm), onde foram coletadas 20 sementes de cada amostra e realizada a medição de uma dimensão da semente com o auxílio de um paquímetro (CALDEIRA et al., 2015).

Para a avaliação dos demais componentes de rendimento, realizou-se manualmente a colheita da área útil de cada parcela sendo a debulha realizada com o auxílio da debulhadora de parcelas. As amostras foram armazenadas em sacos de papel para determinação da produtividade (Kg. ha<sup>-1</sup>), com umidade corrigida para 13%. Posteriormente foi determinado o peso de mil grãos (PMG) (g) segundo metodologia descrita nas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro no software Sisvar 5.6 (FERREIRA, 2011).

#### **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A ferrugem asiática teve seus primeiros sintomas observados aos 69 dias após a emergência, quando as plantas se encontravam em estádio R1. Nesse estádio, as condições para a instalação e progresso da doença eram propícias com a umidade relativa em torno de 75% e temperaturas variando entre 15°C e 28°C (GRIGOLLI, 2014) (dados não mostrados), e também devido à alta incidência de inóculo primário proveniente das lavouras vizinhas (YORINORI, JUNIOR, LAZZAROTTO, 2004).

A partir dos dados da AACPD da ferrugem asiática, míldio e oídio, tanto na parte superior quanto inferior de plantas de soja oriundas de sementes com diferentes níveis de vigor, microbiolizadas ou não com *Bacillus* isolado RD34, não se observou interação significativa entre as variáveis (Tabelas 1, 2, 3 e 4).

Quando se avaliou a AACPD da ferrugem asiática, míldio e oídio na parte superior, não foi possível observar diferença significativa nas referidas doenças entre as plantas oriundas de sementes com diferentes níveis de vigor (Tabela 1). O vigor das sementes pode influenciar na uniformidade de emergência bem como no tamanho inicial das plantas e nas taxas de crescimento das culturas (KOLCHINSKI; SCHUCH; PESKE, 2006). Assim, plântulas originadas de sementes com baixo vigor podem apresentar maior sensibilidade a estresses (MARCOS-FILHO, 2005), dentre os quais encontram-se as doenças, fato esse não comprovado para as doenças avaliadas no presente trabalho dentro dos níveis de vigor testados.

Tabela 1 - Área abaixo da curva de progresso da ferrugem asiática, míldio e oídio (AACPD) na parte superior de plantas de soja oriundas de sementes com diferentes níveis de vigor.

Níveis de Vigor		AACPD	
	Ferrugem <sup>*</sup>	Míldio*	Oídio*
74	11,32 <sup>n. s</sup>	10,44 <sup>n. s</sup>	0,00 <sup>n. s</sup>
77	18,51	12,54	0,00
97	21,72	14,59	0,00
99	22,14	11,63	0,07
C.V %	29,20	20,59	3,12

No que se refere a AACP da ferrugem asiática, míldio e oídio na parte superior em função da microbiolização ou não das sementes, também não foram encontradas diferenças significativas entre ambos (Tabela 2). Em trabalho desenvolvido por Dorighello (2013), o uso de *Bacillus subtilis* QST 713 inibiu a germinação de uredósporos e reduziu a ferrugem asiática da soja explicado, possivelmente, devido a produção e consequente presença de outros metabólitos em relação ao isolado de *Bacillus* utilizado no presente trabalho. O uso de *Bacillus* já se mostrou eficiente no controle de doenças nas culturas do café (CACEFO; ARAÚJO; PACHECO, 2016), pepino (MELO; VALARINI, 1995), melão (SANTOS et al., 2006) e em florestais (GOMES; GRIGOLETTI JUNIOR; AUER, 2001).

Tabela 2 - Área abaixo da curva de progresso da ferrugem asiática, míldio e oídio (AACPD) na parte superior de plantas de soja cujas sementes foram microbiolizadas ou não com *Bacillus* (RD34).

Microbiolização —		AACPD	
Microbiolização	Ferrugem*	Míldio*	Oídio*
Microbiolizado	15,70 <sup>n. s</sup>	12,36 <sup>n. s</sup>	0,01 <sup>n. s</sup>
Não Microbiolizado	21,14	12,24	0,03
C.V. %	29,20	20,59	3,12

<sup>\*</sup> Para efeito da análise estatística os dados foram transformados em raiz (x+1), as médias apresentadas são as originais.

Quando as análises de AACPD foram direcionadas para a parte inferior das plantas, plantas oriundas de sementes com diferentes níveis de vigor, observou-se diferença significativa entre os tratamentos para a ferrugem asiática e oídio, não havendo diferença estatística entre os níveis de vigor para míldio (Tabela 3).

No que se refere a ferrugem, plantas originadas de sementes cujo vigor era de 99% apresentaram a maior média, diferindo daquelas oriundas de sementes com vigor de 74% (Tabela 3). Isso deve se ao fato de que lotes com vigor mais elevado tendem a apresentar uma emergência total mais rápida e uma velocidade maior de emergência o que faz com que as plantas tenham contato mais rapidamente com o inóculo da doença, e por apresentarem um estande de plantas mais elevado a disseminação da doença torna se mais fácil devido haver a formação de um

<sup>\*</sup> Para efeito da análise estatística os dados foram transformados em raiz (x+1), as médias apresentadas são as originais.

<sup>&</sup>lt;sup>n. s</sup> Não significativo.

<sup>&</sup>lt;sup>n. s</sup> Não significativo.

microclima ideal na região inferior do dossel facilitando o desenvolvimento de doenças (KNEBEL et al., 2006 apud JUNIOR, 2012).

Dados semelhantes foram observados por Vanzolin (2002), o qual em seus estudos constatou que lotes de menor vigor tendem a apresentar velocidade de emergência reduzida e um estande total de plantas menor, o que por sua vez atrasa o desenvolvimento da mesma, quando comparado a lotes de vigor elevado.

Tabela 3 - Área abaixo da curva de progresso da ferrugem asiática, míldio e oídio (AACPD) na parte inferior de plantas de soja oriundas de sementes com diferentes níveis de vigor.

Níveis de		AACPD	
Vigor	Ferrugem*	Míldio*	Oídio*
74	345,92b <sup>1</sup>	4,75 <sup>n. s</sup>	9,63ab <sup>1</sup>
77	402,32ab	1,47	16,30a
97	444,80ab	3,97	12,26ab
99	462,69 <sup>a</sup>	2,17	7,80b
C.V. %	9,24	30,40	25,82

<sup>\*</sup> Para efeito da análise estatística os dados foram transformados em raiz (x+1), as médias apresentadas são as originais.

Quanto ao oídio (Tabela 3) pode-se observar que a severidade foi mais acentuada em plantas oriundas de sementes com níveis de vigor de 77%, diferindo significativamente apenas das originadas de sementes com 99% de vigor. Esses resultados corroboram com os encontrados por Henning et al., (2010), onde plantas com níveis de vigor mais baixo possuem menores teores de proteínas solúveis, amido e açúcares solúveis, e menor capacidade de mobilização das reservas na germinação, o que resulta em plantas mais suscetíveis ao ataque de patógenos, e, devido ao estande de plantas ser menor, a ação disseminadora de inóculo entre as plantas, provocada pelo vento, ajudou a multiplicar a doença.

Da mesma forma que ocorreu na parte superior, na parte inferior também não houve diferença significativa entre as sementes que foram microbiolizadas e as que não foram para as doenças ferrugem asiática, míldio e oídio (Tabela 4).

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

n.s Não significativo.

Tabela 4 - Área abaixo da curva de progresso da ferrugem asiática, míldio e oídio (AACPD) na parte inferior de plantas de soja cujas sementes foram microbiolizadas ou não com *Bacillus* (RD34).

Miorobiolização		AACPD	
Microbiolização —	Ferrugem*	Míldio*	Oídio*
Microbiolizado	409,34 <sup>n. s</sup>	3,73 <sup>n. s</sup>	11,48 <sup>n. s</sup>
Não Microbiolizado	418,52	2,45	11,52
C.V. %	9,24	30,40	25,82

<sup>\*</sup> Para efeito da análise estatística os dados foram transformados em raiz (x+1), as médias apresentadas são as originais.

Avaliando os resultados obtidos para a desfolha das plantas, é possível perceber que houve interação significativa entre os variáveis níveis de vigor x sementes microbiolizadas ou não (Tabela 5), sendo que o nível de vigor de 77% apresentou diferença significativa em relação aos demais níveis de vigor. Vanzolin (2002), constatou que lotes de menor vigor resultaram em prolongamento da fase vegetativa das plantas, desta maneira explica-se os resultados encontrados no presente trabalho, onde as plantas de níveis de vigor mais baixo (77%), tendem a estender sua fase vegetativa, com nível de desfolha menor quando a avaliação foi realizada.

Tabela 5 - Porcentagem de desfolha de plantas de soja oriundas de sementes com diferentes níveis de vigor e microbiolizadas ou não com *Bacillus* (RD34).

Níveis de Vigor	Microbiolizado	Não Microbiolizado
74	37,5aA*	43,1aA
77	15,0bB	49,4aA
97	55,6aA	43,1aA
99	49,4aA	55,6aA
C V 21 92%		

<sup>\*</sup> Médias seguidas de mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Por outro lado, quando analisados os resultados do efeito da microbiolização sobre a variável desfolha, é possível verificar que não houve diferença significativa nos dados obtidos quando as sementes foram ou não microbilizadas na maioria dos tratamentos, exceto no nível de vigor de 77% que apresentou porcentagem de desfolha menor quando microbiolizado (Tabela 5). Para esse nível de vigor foi

n.s Não significativo.

observado um dos menores valores de AACPD da ferrugem e, desta forma, a microbiolização pode ter contribuído ainda mais na redução da ferrugem asiática causando a redução da desfolha, que é um dos principais danos da ferrugem, comprometendo a formação e o enchimento de vagens e o peso final do grão (OLIVEIRA; GODOY; MARTINS, 2005).

Levando em consideração que não houve interação entre os níveis de vigor x microbiolizado ou não, os resultados obtidos para o número total de legumes, legumes férteis e legumes inférteis foram analisados estatisticamente em cada uma das variáveis (Tabelas 6 e 7).

Relacionado ao número total de legumes nas plantas oriundas de sementes com diferentes níveis de vigor, pode-se perceber que houve diferença significativa entre os tratamentos, onde plantas oriundas de sementes com níveis de vigor mais baixos (77 e 74%) apresentaram maiores números de legumes e de legumes férteis, diferindo significativamente das oriundas de vigores mais altos (97 e 99%) (Tabela 6). Vanzolini e Carvalho (2002) observaram que o número médio de vagens produzidas por planta é maior nos lotes de menor vigor, que apresentam menor estande. Knebel et al., (2006) em suas pesquisas observou que ocorria uma diminuição do número de legumes por planta quando se aumentou a população nos espaçamentos de 45,0 e de 67,5 cm entrelinhas, corroborando com os dados obtidos neste experimento onde, sementes com níveis de vigor baixo por si só causam a diminuição do estande de plantas, que por sua vez diminui a população, proporcionando uma menor competição de plantas por recursos para o seu desenvolvimento.

Para o número de legumes inférteis, plantas oriundas de sementes com o vigor de 77% foram as que apresentaram o menor valor para essa variável, diferindo significativamente dos demais tratamentos, os quais não diferiram entre si (Tabela 6).

Tabela 6 - Número total de legumes, legumes férteis e legumes inférteis de plantas
de soja oriundas de sementes com diferentes níveis de vigor.

Níveis de	Número Total de		
Vigor	Legumes	Legumes Férteis	Legumes Inférteis
74	136,9a <sup>1</sup>	131,6a	5,6a
77	135,2a	129,4a	3,1b
97	96,5b	91,8b	4,7ab
99	97,4b	93,0b	4,4ab
C.V. %	15,27	15,68	27,75

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Foi possível verificar que não houve diferença significativa quando analisadas as variáveis, número total de legumes, legumes férteis e legumes inférteis quando as sementes foram ou não microbiolizadas (Tabela 7). Esses resultados diferem dos encontrados por Mattos (2017) que observou o aumento do número de vagens de soja quando realizada a microbiolização das sementes com esse mesmo isolado de *Bacillus*.

Tabela 7 - Número total de legumes, legumes férteis e legumes inférteis de plantas de soja cujas sementes foram microbiolizadas ou não com *Bacillus* (RD34).

Microbiolização	Número Total de		
	Legumes	Legumes Férteis	Legumes Inférteis
Microbiolizado	121,5 <sup>n. s</sup>	116,8 <sup>n. s</sup>	4,5 <sup>n. s</sup>
Não Microbiolizado	111,5	106,0	4,4
C.V. %	15,27	15,68	27,75

<sup>&</sup>lt;sup>n.s</sup> Não significativo.

Analisando as variáveis diâmetro de grão, peso de mil grãos e produtividade, não foi observada interação significativa entre os níveis de vigor x microbiolizado ou não (Tabelas 8 e 9).

É possível perceber que a variável diâmetro de grãos apresentou diferença significativa quando as plantas foram oriundas de sementes com o nível de vigor de 74% para aquelas oriundas de sementes com um nível de vigor de 97%, sendo que as demais não diferiram dessas e nem entre si (Tabela 8). Segundo Derre et al., (2017), sementes com diâmetros maiores podem ter interferência significativa em germinação, no índice de velocidade de germinação (IVG) e no vigor inicial, desta

forma corroborando com os dados obtidos e evidenciando que sementes vigorosas apresentam plantas que produzem grãos de tamanho maior.

Tabela 8 - Diâmetro de grãos (mm), peso de mil grãos (g) e a produtividade (Kg. ha<sup>-1</sup>) de plantas de soja oriundas de sementes com diferentes níveis de vigor.

Níveis de Vigor			
	Diâmetro de Grãos	PMG	Produtividade
74	5,4b <sup>1</sup>	121,1 <sup>n. s</sup>	2.734 <sup>n. s</sup>
77	5,6ab	120,9	2.791
97	5,7a	124,2	2.551
99	5,6ab	124,6	2.530
C.V. %	3,69	6,22	15,17

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Quanto a variável peso de mil grãos, não foi observada diferença significativa entre os diferentes níveis de vigor das sementes (Tabela 8). Plantas oriundas de sementes de alta e baixa qualidade fisiológica tendem a não diferir quanto ao número de ramificações por planta e no peso de 1000 sementes (SCHUCH, 2009).

Referente a produtividade, também não foram observadas diferenças entre as plantas oriundas de sementes com diferentes níveis de vigor (Tabela 8). Autores como Knebel et al., (2006), mostraram que não houve diferença significativa na produtividade entre as diferentes populações de plantas, o que pode ser relacionado com a compensação da população (ex. maior número de ramificações) em lotes com níveis de vigor baixos.

Ao analisar as variáveis diâmetro de grãos, peso de mil grãos e a produtividade quando as sementes foram microbiolizadas ou não (Tabela 9), foi observado que não houve diferença significativa entre as variáveis, fato este também constatado no estudo de Maciel (2018), onde a microbiolização com *Bacillus subtilis* não surtiu efeitos sobre a produtividade e peso de mil grãos.

Tabela 9 - Diâmetro de grãos (mm), peso de mil grãos (g) e a produtividade (Kg. ha<sup>-1</sup>) de plantas de soja cujas sementes foram microbiolizadas ou não com *Bacillus* (RD34).

<sup>&</sup>lt;sup>n.s</sup> Não significativo.

Microbiolização	Diâmetro de Grãos	PMG	Produtividade
Microbiolizado	5,5 <sup>n. s</sup>	123,0 <sup>n. s</sup>	2.752 <sup>n.s</sup>
Não Microbiolizado	5,6	122,4	2.551
C.V. %	3,69	6,22	15,17

n.s Não significativo.

## **5 CONCLUSÃO**

A microbiolização de sementes com o isolado de *Bacillus* (RD34), em sementes da cultivar M6410 IPRO com diferentes níveis de vigor, não proporciona efeito na redução da severidade de ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*), míldio (*Peronospora manshurica*) e oídio (*Microsphaera diffusa*).

Houve aumento do diâmetro de grão em plantas oriundas de sementes com níveis de vigor elevados, porém sem reflexos positivos sobre as variáveis Peso de Mil Grãos (PMG) e produtividade.

A microbiolização de sementes com o isolado RD34 de *Bacillus* não proporciona efeitos sobre as variáveis de rendimento avaliadas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, M. C. et al. Intensidade da ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi* H. Sydow & P. Sydow) da soja [*Glycine max* (L.) Merr.] nas cultivares Conquista, Savana e Suprema sob diferentes temperaturas e períodos de molhamento foliar. **Summa Phytopathologica**, v. 33, n. 3, p. 239-244, 2007.
- ANDRADE, P. J. M.; ANDRADE, D. F. A. A. Ferrugem asiática: uma ameaça à sojicultura brasileira. Dourados: **Embrapa Agropecuária Oeste**; Chapadão do Sul: Fundação Chapadão, (Embrapa Agropecuária Oeste. Circular técnica, 11). 11 p. 2002.
- ARAUJO, F.F. MENEZES, D. Indução de resistência a doenças foliares em tomateiro por indutores biótico (*Bacillus subtilis*) e abiótico (Acibenzolar-S-Metil). **Summa Phytopathologica**. Botucatu, v.35, n.3, p.169-172, 2009.
- ARAÚJO, M. M. Caracterização e seleção de linhagens de soja resistentes ou tolerantes à ferrugem asiática. Dissertação (Mestrado em Agronomia). ESALQ Mestrado em Genética e melhoramento de plantas, Piracicaba, 2009. 77 p. 2009.
- ARRUDA, R. Biotecnologia: Melhoramento Genético Vegetal Da Soja. Rural Centro, 2012. Disponível em:<a href="http://www.ruralcentro.com.br/noticias/biotecnologia-melhoramento-genetico-vegetal-da-soja-62151">http://www.ruralcentro.com.br/noticias/biotecnologia-melhoramento-genetico-vegetal-da-soja-62151</a>. Acesso em: 03 dez. 2019.
- BALARDIN, R. S. et al. Tratamento de sementes com fungicidas e inseticidas como redutores dos efeitos do estresse hídrico em plantas de soja. **Ciência Rural**, v. 41, n. 7, 2011.
- BARBOSA, B. C. Controle Biológico. 2006. Disponível em:<a href="https://www.infoescola.com/ecologia/controle-biologico/">https://www.infoescola.com/ecologia/controle-biologico/</a>. Acesso em: 03 dez. 2019.
- BEDENDO, I. P. Murchas vasculares. In: AMORIN, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIM FILHO, A. (Eds.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 4.ed, v.1. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, p. 451-458, 2011.
- BERGAMIN, A. C. et al. Respostas de duas cultivares de soja e adubação a lanço e em sulco no município de rolim de moura/ro. **Revista de Ciências Agrárias/Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**. v. 50, n. 1, p. 155-166, 2011.
- BETTIOL, W. et al. **Bioprotetores Comerciais para o Controle de Doenças de Plantas Parte 1**. 111- 147 p. v. 17, 2009.
- BETTIOL, W. et al. Supressividade a Fitopatógenos Habitantes do Solo. In: Bettiol, W.; Morandi, M. A. B. (editores) **Biocontrole de Doenças de Plantas: Uso e Perspectivas**, Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP: 2009.
- BETTIOL, W.; GARIBALDI, A.; MIGHELI, Q. *Bacillus subtilis* para o controle do módulo em pó no espaço de pepino e abacaxi. **Bragantia**, Campinas, v. 56, n. 2, p. 281-287, 1997. Disponível em:

- <a href="http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\_arttext&pid=S0006-87051997000200007&lng=en&nrm=iso>">http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\_arttext&pid=S0006-87051997000200007&lng=en&nrm=iso>">http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\_arttext&pid=S0006-87051997000200007&lng=en&nrm=iso>">http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\_arttext&pid=S0006-87051997000200007&lng=en&nrm=iso>">http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\_arttext&pid=S0006-87051997000200007&lng=en&nrm=iso>">http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\_arttext&pid=S0006-87051997000200007&lng=en&nrm=iso>">http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\_arttext&pid=S0006-87051997000200007&lng=en&nrm=iso>">http://www.scielo.br/scie
- BETTIOL, W.; GHINI, R. Controle Biológico. In: FILHO, A. B.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. Volume 1: Terceira edição. Editora Agronômica Ceres Ltda, 1995. cap.38. p.761-785.
- BLAINSKI, E. C. A.; FIDALSKI, J.; GUIMARÃES, R. M. L. Quantificação da degradação física do solo por meio da curva de resistência do solo à penetração. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, p. 975-983, 2008.
- BONATO, E. R.; BONATO, A. L. V. **A soja no Brasil: história e estatística.** Londrina, EMBRAPA-CNPSo, 1987. 12 p. (EMBRAPA-CNPSo. Documentos, 21).
- BORGES, D. I. Óleos e extratos vegetais no controle da ferrugem-asiática da soja (*Glycine max* (I.) Merrill.). 2007. 99 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) Universidade Federal de Lavras, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Lavras, 2007.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: Mapa/ACS, 2009. 395p.
- CACEFO, V.; ARAÚJO, F. F.; PACHECO, A. C. Controle Biológico da Ferrugem com *Bacillus Subtilis* e Alterações Bioquímicas no Cafeeiro. **Coffee Science**, Lavras, v. 11, n. 4, p. 567 574, out./dez. 2016.
- CALDEIRA, T. I. R. et al. Classificação de semente de soja e o efeito sobre a caracterização física dos grãos produzidos. São Pedro, p. 1 4, 2015.
- CALVO, É. S.; KIIHL, R. A. S. Melhoramento genético: de onde partimos e para onde vamos. **Visão Agrícola**. Mato Grosso, n.5, p. 50 53, jan/jun 2006.
- CAPORAL, F. R.; COSTABEBER, J. A. **Agroecologia: alguns conceitos e princípios.** Brasília: MDA/SAF/DATER-IICA, 24 p., 2004.
- CARVALHO, E. A. Indutores de resistência no manejo da ferrugem da soja (*Phakopsora pachyrhizi* Sydow & P. Sydow). Tese (Doutorado em Agronomia/Fitopatologia) Universidade Federal de Lavras, Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, Lavras, 65 p. 2010.
- CONAB Companhia Nacional do Abastecimento. Acompanhamento safra brasileira de grãos. 1- 25 p. v. 7 **Safra 2019/20 Segundo levantamento**, Brasília, novembro 2019.
- CONAB Companhia Nacional do Abastecimento. Acompanhamento safra brasileira de grãos. 139p. v. 7 **Safra 2017/18 Sétimo levantamento**, Brasília, abril 2018.
- CONAB. **Acompanhamento da Safra Brasileira**. 2019. Disponível em: <a href="https://www.conab.gov.br/info-agro/safras">https://www.conab.gov.br/info-agro/safras</a> >. Acesso em: 17 mar. 2019.

CONAB. Histórico Mensal Soja. 2019. Disponível em:

<file:///C:/Users/User/Downloads/SojaZ-ZAnliseZMensalZ-ZMarcoZ2019\_1.pdf >.
Acesso em: 17 mar. 2019.

DALL' AGNOL, A.; HIRAKURI, M. H. Realidade e Perspectivas do Brasil na Produção de Alimentos e Agroenergia, com Ênfase na Soja. Londrina: Embrapa Soja, 2008. 8 p. (Embrapa Soja. Circular Técnica, 59).

DALL'AGNOL. A. **Usos Industriais da Soja**, Agrolink, 2004. Disponível em: <a href="https://www.agrolink.com.br/culturas/soja/informacoes/historico\_361541.html">https://www.agrolink.com.br/culturas/soja/informacoes/historico\_361541.html</a>. Acesso em: 15 mar. 2019.

DEGRANDE, P. E.; VIVAN, L. M. Pragas da soja. **Boletim de Pesquisa de Soja e Milho**, v. 12, p. 206, 2011/2012.

DERRE, L. O. et al. Influência do Tamanho de Sementes na Germinação e Vigor Inicial da Soja (*Glycine max*). In: DERRE, L. O. et al. **Colloquium Agrariae**, Faculdade Centro Mato-Grossense - FACEM, 2017, vol. 13, n. Especial, p. 100-107.

DORIGHELLO, D.V. Controle da Ferrugem Asiática da Soja (*Phakopsora Packyrhizi*) dom óleo de Café e *Bacillus* Spp. 2013. 55 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Curso de Pós-graduação Agronomia (Proteção de Plantas) - FCA, Botucatu, 2013.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Soja. **Tecnologias de produção de soja** - região central do Brasil, 2011. Londrina: Embrapa Soja: Embrapa Cerrados: Embrapa Agropecuária Oeste, 255p. 2010.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos (Rio de Janeiro, RJ). **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 3. ed. p. 353. – Rio de Janeiro: EMBRAPA-SPI. 2013.

FAGAN, E. B. et al. Fisiologia da fixação biológica do nitrogênio em soja-Revisão. **Revista da FZVA**, v. 14, n. 1, 2007.

FARIAS, J. R. B.; NEPOMUCENO, A. L.; NEUMAIER, N. Ecofisiologia da soja. **Embrapa Soja**. Circular técnica, 9 p. 2007.

Ferreira, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. Ciência e Agrotecnologia, Lavras, v. 35, n.6, p.1039-1042, 2011.

FIALLOS, F. R. G. A ferrugem asiática da soja causada por *Phakopsora pachyrhizi* Sydow. **Revista Ciencia y Tecnología**, v. 4, n. 2, p. 45-60, 2011.

FORCELINI, C.A.; REIS, E. M. A. Controle Cultural. In: FILHO, A. B.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. Volume 1: Terceira edição. Editora Agronômica Ceres Ltda, 1995. cap.38. p.761-785.

FRANÇA-NETO, J. B. et al. Tecnologia da produção de semente de soja de alta qualidade. 2016. Londrina: **Embrapa Soja**, 2016. 82 p. il. – (Documentos / Embrapa Soja, ISSN 21762937; n.380).

- FREITAS, M. C. M. A Cultura da Soja no Brasil: O Crescimento da Produção Brasileira e o Surgimento de Uma Nova Fronteira Agrícola. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer- Goiânia, v. 7, n.12, p.12, 2011.
- GATIBONI, L. C.; SILVA, L. S.; ANGHINONI, I. Diagnóstico da fertilidade do solo e recomendação da adubação. In.COMISSÃO, DE QUÍMICA E. FERTILIDADE DO SOLO. **Manual de adubação e calagem para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina**.11 eds. Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo-Núcleo Regional Sul, 2016. cap. 6, p.130-131.
- GODOY, C. V. et al. Doenças da soja (*Glycine max* (L.) Merrill). **Embrapa SojaFôlder/Folheto/Cartilha (INFOTECA-E)**, 2014.
- GODOY, C.V.; KOGA, L.J; & CANTERI, M.G. Diagrammatic scale for assessment of soybean rust severity. **Fitopatologia Brasileira** 31:063-068. 2006.
- GOMES, N. S. B.; GRIGOLETTI JUNIOR, A.; AUER, C. G. Seleção de antagonistas para o controle de *Cylindrocladium spathulatum* em erva-mate. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 43, p. 123-138, jul./dez. 2001.
- GRIGOLLI, J. F. J. Manejo de doenças na cultura da soja. **Tecnologia e Produção: Soja 2014/2015**. p. 134-156, 2014.
- GUIMARÃES, L.M.P. et al. Efeito de metil jasmonato e silicato de potássio no parasitismo de *Meloidogyne incognita* e *Pratylenchus zeae* em cana-deaçúcar. v. 32. 6 p. São Paulo (SP). 2008.
- HENNING A. A. et al. **Manual de identificação de doenças de soja**. 5.ed. Londrina: Embrapa Soja (Embrapa Soja Documentos 256). 76p. 2005.
- HENNING, A. A. et al. **Manual de identificação de doenças de soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2009. 3.ed. 74p. (Documentos / Embrapa Soja, ISSN 1516-781X; n.256).
- HENNING, F. A. et al. Composição Química e Mobilização de Reservas em Sementes de Soja de Alto e Baixo Vigor. In: HENNING, F. A. et al. **Bragantia**, Instituto Agronômico de Campinas Campinas, 2010, vol. 69, núm. 3, pp. 727-733.
- HENNING; A.A.; ALMEIDA, A.M.R.; GODOY, C.V.; SEIXAS, C.D.S.; YORINORI, J.T.; COSTAMILAN, L.M.; FERREIRA, L.P.; MEYER, M.C.; SOARES, R.M.; DIAS, W.P. **Manual de identificação de doenças de soja**. 5. ed. Londrina: Embrapa Soja, 2014. 76p.
- HIRAKURI, M. H. Impactos econômicos de estresses na produção de soja da safra 2015/16. Londrina: Embrapa Soja, 2016. 7p.: il. (Embrapa Soja. Circular técnica, 125).
- HIRAKURI, M. H.; LAZZAROTTO J. J. **O** agronegócio da soja nos contextos mundial e brasileiro. Londrina: Embrapa Soja, 2014. 70p.: il. (Documentos / Embrapa Soja, ISSN 2176-2937; n. 349).
- HIRANO M. et al. Validação de escala diagramática para estimativa de desfolha provocada pela ferrugem asiática em soja. **Summa Phytopathologica**, v.36, n.3, p.248-250, 2010.

HOFFMANN-CAMPO, C. B. et al. Pragas da soja no Brasil e seu manejo integrado.Londrina: **Embrapa Soja**, 2000.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. Fixação Biológica do Nitrogênio na Cultura da Soja. Londrina: **Embrapa Soja**. 2001. 48p. (Circular Técnica / Embrapa Soja, ISSN 1516- 7860; n.35) (Circular Técnica / Embrapa Cerrados, ISSN 1517-0187; n.13).

IBGE. **Levantamento Sistemático da produção Agrícola.** Disponível em: <a href="https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1618#resultado">https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1618#resultado</a> >. Acesso em: 19 nov. 2019.

JUNIOR, A. A. B. Acamamento de plantas na cultura da soja. **Revista Agropecuária Catarinense**, v.25, n.l, mar. 2012.

KIMATI, H. Controle Químico. In: FILHO, A. B.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. V. 1, ed. 3. Editora Agronômica Ceres Ltda, 1995. cap.38. p.761-785.

KNEBEL, J. L. et al. Influência do espaçamento e população de plantas sobre doenças de final de ciclo e oídio e caracteres agronômicos em soja. In: KNEBEL, J. L. et al. **Acta Scientiarum. Agronomy**. Universidade Estadual de Maringá, 2006, vol. 28, núm. 3, pp. 385-393.

KOLCHINSKI, E. M.; SCHUCH, L. O. B.; PESKE, S. T. Crescimento Inicial de Soja em Função do Vigor das Sementes. **Brasil Agrociência**, Pelotas, v. 12, n. 2, p. 163-166, abr-jun, 2006.

KOLCHINSKI, E. M.; SCHUCH, L. O. B.; PESKE, S. T. Vigor de sementes e competição intraespecífica em soja. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.6, p.1248-1256, nov-dez, 2005.

KOWATA, L. S. et al. Escala diagramática para avaliar severidade de míldio na soja. **Scientia Agraria**, v. 9, n. 1, 2008.

KRZYZANOWSKI, F. C. et al. O controle de qualidade agregando valor à semente de soja. Londrina, **EMBRAPA-CNPSo**, 2008. 11p. (EMBRAPA-CNPSo. Circular Técnica, 54).

KUINCHTNER, A.; BURIOL, G. A. Clima do Estado do Rio Grande do Sul Segundo a Classificação Climática de Köppen e Thornthwaite. **Disciplinarum Scientia**, Série: Ciências Exatas, S. Maria, v.2, n.1, p.171-182, 2001.

LANNA FILHO, R.; FERRO, H. M.; PINHO, R. S. C. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Trópica**. Ciências Agrárias e Biológicas, v. 4, p. 12-20, 2010.

LIMA, W. F. et al. Resistência da soja à ferrugem asiática avaliada pela análise da produtividade de grãos. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 38, n. 1, p. 73-78, 2012.

LOHMANN, T. R. et al. Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. para controle de *Sclerotium rolfsii* em soja. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v.2, n.2, p.1665-1668, 2007.

- LUCON, C. M. M. Trichoderma no controle de doenças de plantas causadas por patógenos de solo. **Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Vegetal**, São Paulo, 2008.
- MACIEL, J. F. S. **Desempenho da Soja Submetida a Diferentes Métodos de Inoculação e Coinoculação.** 2018. 40 f. Trabalho de conclusão de curso Universidade Federal de Santa Catarina. Curso de Bacharel em Agronomia, Curitibanos, 2018.
- MALAVOLTA, E. **Manual de Nutrição mineral de Plantas**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 2006. 638p.
- MARCOS-FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005. 495p.
- MASCARENHAS A. A. H. et al. Potássio para soja. Informações Agronômicas. **Potafos Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato**, n. 105, p. 2, 2004.
- MATTIAZZI, Patricia; CÂMARA, Gil Miguel de Sousa. **Efeito do oídio** (*Microsphaera diffusa* Cooke & Peck) na produção e duração da área foliar sadia da soja. 2003.Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.
- MATTOS, Maicol. Promoção do Crescimento de Soja a Partir da Inoculação de Sementes com Microrganismos não Noduladores. 2017. 39 f. Trabalho de conclusão de curso Universidade Federal da Fronteira Sul. Curso de Bacharel em Agronomia, Cerro Largo, 2017.
- MELO, I. S. *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.4, p. 261 295, 1996.
- MELO, L. S.; VALARINI, P. J. Potencial de Rizobactérias no Controle de *Fusarium Sotaní* (Mart.) Sacc. Em Pepino (Cucumis Sativum L.). **Sci. agric.**, Piracicaba, p. 326-330, mai./ago., 1995.
- MENEGHETTI, R. C. et al. Avaliação da Ativação de Defesa em Soja contra *Phakopsora pachyrhizi* em Condições Controladas. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 4, p. 823829, jul./ago., 2010.
- MERTZ, L. M.; HENNING, F. A.; ZIMMER, P. D. Bioprotetores e fungicidas químicos no tratamento de sementes de soja. **Ciência Rural**, v. 39, n. 1, p. 13-18, 2009.
- MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; MENEZES, M. **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**. Universidade Federal e Rural de Pernambuco, 2005.
- MICHEREFF, S.J. Fundamentos de Fitopatologia: Apostila Laboratório Epidemiologia de Doenças de Plantas. UFRPE. un.17. p.125-129. Recife, 2001.
- MUNDSTOCK, C. M.; THOMAS, A. L. **Soja: fatores que afetam o crescimento e rendimento de grãos.** Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 31p. 2005.

- NAVARINI, L. et al. Controle químico da ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi* Sidow) na cultura da soja. **Summa Phytopathologica**, v. 33, n. 2, p. 182-186, 2007.
- NAVARRO J., H. M.; COSTA, J. A. Expressão do potencial de rendimento de cultivares de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira:** v.37, n. 3 (mar. 2002), p. 275-279, 2002.
- NEPOMUCENO, M. et al. Períodos de Interferência das Plantas Daninhas na Cultura da Soja nos Sistemas de Semeadura Direta e Convencional. **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v. 25, n. 1, p. 43-50, 2007.
- NERBASS, J. M. J. et al. Controle de doenças foliares na aveia branca e danos na produção em resposta à dose e ao número de aplicações de fungicida. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 7, n. 2, p. 127-134, 2008.
- NUNES, J. L. S. **Soja, Histórico**, Agrolink, 2016. Disponível em:<a href="https://www.agrolink.com.br/culturas/soja/informacoes/historico\_361541.html">https://www.agrolink.com.br/culturas/soja/informacoes/historico\_361541.html</a>. Acesso em: 15 mar. 2019.
- OLIVEIRA, A. C. B.; GODOY, C. V.; MARTINS, M. C. Avaliação da tolerância de cultivares de soja à ferrugem asiática no Oeste da Bahia. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, p. 6, 2005.
- PARK, S. et al. Viability of *Phakopsora pachyrhizi* urediniospores under simulated southern Louisiana winter temperature conditions. **Plant Disease**, v. 92, n. 10, p. 1456-1462, 2008.
- PICININI, E. C.; FERNANDES, J. M. Doenças de soja: diagnose, epidemiologia e controle. **Embrapa Trigo-Documentos** (INFOTECA-E), 2000.
- PÍPOLO. A. E. et al. Teores de ÓLEO e Proteína em Soja: Fatores Envolvidos e Qualidade para a Indústria. Londrina: **Embrapa Soja**, 2015. P. 16. (Comunicado Técnico/Embrapa Soja, ISSN 2176-2889; n.86).
- REIS, E. M.; DANELLI, A.; CASA, R. T. Ciclo do míldio da soja. **Revista Plantio Direto**. Passo Fundo, RS, ed. 117, mai/jun. 2010.
- RHANE, K.; RUHL, G. Soybean: Crop diseases in corn, soybean and wheat, 2003.
- ROSSETTO, C. J.; LOURENÇÃO, A. L.; MIRANDA, M. A. C. **Resistência de soja a insetos**. II. Teste de livre escolha entre a linhagem IAC 73/228 e o cultivar Paraná, infestados por *Nezara viridula* (L.) em telado. 1984.
- SANTOS, E. R. et al. Controle biológico da mancha-aquosa do melão por compostos bioativos produzidos por *Bacillus spp.* **Summa Phytopathol.**, Botucatu, v. 32, n. 4, p. 376-378, 2006.
- SCHEEREN. B.R. et al. Qualidade Fisiológica e Produtividade de Sementes de Soja. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n. 3, p. 035-041, 2010. Disponível em: <a href="http://www.scielo.br/pdf/rbs/v32n3/v32n3a04.pdf">http://www.scielo.br/pdf/rbs/v32n3/v32n3a04.pdf</a> >. Acesso em: 24 mar. 2019.

- SCHUCH, L. O. B.; KOLCHINSKI, E. M.; FINATTO, J. A. Qualidade Fisiológica da Semente e Desempenho de Plantas Isoladas em Soja. In: SCHUCH, L. O. B.; KOLCHINSKI, E. M.; FINATTO, J. A. **Revista Brasileira de Sementes**, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas (FAEM/UFPel), 2009, vol. 31, nº 1, p.144-149.
- SFREDO, G. J. Soja no Brasil: calagem, adubação e nutrição mineral. **Embrapa Soja**, 2008.
- SILVA, C. S. **Vigor de Sementes de Soja e Desempenho da Cultura**. 2010. 60.f. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Pelotas, 2010.
- SINCLAIR, J.B.; HARTMANN, G.L. Soybean rust. In: HARTMAN, G.L.; SINCLAIR, J.B.; RUPE, J.C. (Ed.). **Compendium of soybean diseases**. 4. ed. Saint Paul: APS Press, 1999. p. 25-26.
- SIQUERI, F. V. et al. A nova cultivar Inox (TMG 803) em interação com o fungicida azoxystrobin & ciproconazole no controle da ferrugem asiática da soja. **Biodiversidade**, v. 10, n. 1, 2011.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal.** 4. Ed. Porto Alegre, Artmed, 2009. 848p.; 28cm.
- TECNOLOGIAS de produção de soja Região Central do Brasil 2014. Londrina: **Embrapa Soja**, 2013. 265p. (Sistemas de Produção / Embrapa Soja, ISSN 2176-2902; n.16).
- UGALDE, M. G. Controle de ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi* Sidow) na cultura da soja, 66 p. 2005.
- VANZOLIN, S. **Efeito do Vigor de Sementes de Soja sobre o seu Desempenho em Campo**. 2001. p.33-41. Tese de doutorado em Agronomia/Produção Vegetal, Depto. de Produção Vegetal, FCAV/ UNESP, Jaboticabal, 2002.
- VANZOLINI, S.; CARVALHO, N.M. Efeito do vigor de sementes de soja sobre o seu desempenho em campo. **Revista Brasileira de Sementes**, v.24, n.1, p.33-41, 2002.
- VERNETTI J. F.; FERREIRA, L. P. Uma nova doença da soja no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 5, n. 1, p. 219-226, 1970.
- WARPECHOWSKI, L. Efeito de Fungicida Protetor Clorotalonil Sobre o Mildio e Outras Doenças na Cultura da Soja. 2018. 46 f. Trabalho de conclusão de curso Universidade Federal da Fronteira Sul. Curso de Bacharel em Agronomia, Cerro Largo, 2018.
- YAMAOKA, Y. et al. Pathogenic races of *Phakopsora pachyrhizi* on soybean and wild host plants collected in Japan. **Journal of General Plant Pathology**, v. 68, n. 1, p. 52-56, 2002.
- YORINORI, J. T.; LAZZAROTTO, J. J. Situação da ferrugem asiática da soja no Brasil e na América do Sul. Londrina: **Embrapa Soja**. (Documentos, 236). 30 p. 2004.

YORINORI, J.T. Oídio da Soja. Londrina: **Embrapa Soja**. (Documentos, 13). 13 p. 1997.

YORINORI, J.T.; JUNIOR, J.N.; LAZZAROTTO, J.J. Ferrugem "asiática" da soja no Brasil: evolução, importância econômica e controle. Londrina: **Embrapa Soja**. (Documentos, 247), v.1, f. 40, 2004.