UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM FITOSSANIDADE E BIOTECNOLOGIA APLICADA

TAMIRIS DOS SANTOS LOPES

COMPATIBILIDADE E EFEITOS PROMOTORES DE CRESCIMENTO VEGETAL DA COINOCULAÇÃO DE *Metarhizium–Bradyrhizobium* EM SOJA (*Glycine max*)

SEROPÉDICA
2026

TAMIRIS DOS SANTOS LOPES

COMPATIBILIDADE E EFEITOS PROMOTORES DE CRESCIMENTO VEGETAL DA COINOCULAÇÃO DE *Metarhizium–Bradyrhizobium* EM SOJA (*Glycine max*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências, Área de concentração: Fitossanidade.

Orientadora: D. Sc. Patrícia Silva Gôlo.

Coorientadora: D. Sc. Emily Mesquita.

SEROPÉDICA
2026

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central/Central de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
Com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

L864c

Lopes, Tamiris dos Santos, 1995-
COMPATIBILIDADE E EFEITOS PROMOTORES DE CRESCIMENTO VEGETAL DA COINOCULAÇÃO DE Metarhizium-Bradyrhizobium EM SOJA (Glycine max) / Tamiris dos Santos Lopes. - São João de Meriti, 2026.
79 f.: il.

Orientadora: Patrícia Silva Gôlo.
Coorientadora: Emily Mesquita.
Dissertação(Mestrado). -- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada, 2026.

1. Metarhizium. 2. Bradyrhizobium. 3. soja. 4. endófitos. 5. promoção de crescimento vegetal. I. Gôlo, Patrícia Silva , 1987-, orient. II. Mesquita, Emily, 1994-, coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada. IV. Título.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

É permitida a cópia parcial ou total desta Dissertação, desde que seja citada a fonte.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOSSANIDADE E BIOTECNOLOGIA APLICADA

TAMIRIS DOS SANTOS LOPES

COMPATIBILIDADE E EFEITOS PROMOTORES DE CRESCIMENTO VEGETAL DA COINOCULAÇÃO DE *Metarhizium–Bradyrhizobium* EM SOJA (*Glycine max*)

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada, Área de concentração em Fitossanidade.

Dissertação aprovada em 30 de Junho de 2026.

BANCA EXAMINADORA:

gov.br Documento assinado digitalmente
PATRICIA SILVA GOLO
Data: 23/09/2026 15:08:37-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Patrícia Silva Gôlo - Orientadora – UFRRJ

gov.br Documento assinado digitalmente
IRENE DA SILVA COELHO
Data: 03/09/2026 09:28:24-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Irene da Silva Coelho - Membro interno – UFRRJ

gov.br Documento assinado digitalmente
CLAUDIA PANDOLFO PAZ
Data: 08/09/2026 11:34:13-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Claudia Pandolfo Paz - Membro externo – ESALQ/USP

Dedico este trabalho aos meus pais e à minha avó, Glória Belém (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, sou grata a Deus, por ter me sustentado e permitido chegar até aqui. Meu amigo fiel, presente em todas as horas: nos momentos de desânimo e incerteza; na cansativa correria dos dias; nas viagens de metrô e ônibus entre São João de Meriti, Seropédica e Cidade Nova; nas caminhadas e aventuras de moto entre a Rural e a Embrapa; nos experimentos que precisei repetir; no processo de escrita; nas renúncias; o Senhor me viu. Como é bom poder pertencer a um Deus de amor!

Aos meus pais, Andreia e Antônio Marcos. Ufa! Quantos momentos difíceis enfrentamos durante este período de mestrado. Minha alegria é termos chegado até aqui juntos. Obrigada pelo encorajamento, pelo apoio incondicional e por todo o amor. Amo vocês!

Aos meus familiares, pelo incentivo e apoio. À minha avó, Glória Belém (*in memoriam*), pelo cuidado e pelo amor que fizeram parte desta realização.

Aos meus queridos amigos, pela companhia e pelos muitos momentos que aqueceram meu coração para continuar. Por me escutarem, me animarem e torcerem por mim. É precioso ter amigos como vocês!

À equipe CEA/SMAC, especialmente à minha amiga e chefinha Márcia. Sem sua compreensão, empatia e apoio neste período, esta conquista não seria possível. Agradeço também aos meus amigos, Priscila Marques, Priscila Pinto, Kleiton e Duda, pelas palavras de incentivo e pelos momentos de alegria e de lamento compartilhados.

À minha comunidade de fé, pelas orações e palavras de esperança, e pelos lembretes de que a vida vale muito mais do que qualquer título acadêmico.

Aos alunos de iniciação científica e pós-graduação do LCM, bem como aos funcionários da estação, agradeço por todo o aprendizado, suporte e bons momentos. Em especial, à Joana e Talita (foi um doce presente ter conhecido vocês!), à Thaís, pela cooperação e apoio, à Rebecca e ao Vinícius, pela ajuda e pelas conversas.

À Embrapa Agrobiologia, em especial ao pesquisador Jerri Édson Zilli, pela valiosa contribuição para este estudo. Agradeço por toda disponibilidade e atenção. Aos parceiros de laboratório do CRB-JD, agradeço pelas trocas de conhecimento, pelos cafés, risadas e apoio, especialmente à Jaqueline, Alyson, Peter, Gabi e Samily. Ao Ernani e à Ivana, pelo auxílio com os materiais utilizados nos experimentos.

À banca examinadora, Profa. Dra. Irene da Silva Coelho e Dra. Claudia Pandolfo Paz, pela participação e contribuição neste momento tão importante.

Ao Dr. Tadeu Augusto van Tol de Castro e Prof. Dr. Andrés Calderín Garcia, pela parceria e ajuda nas análises das raízes.

À minha co-orientadora, Dra. Emily Mesquita, pela disponibilidade, pelo cuidado e pelo importante suporte.

À minha orientadora, Profª. Patrícia Silva Gôlo, que me acompanhou ao longo de todo este período. Sou grata pelos ensinamentos, pela motivação e por toda a paciência.

Ao Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada, aqui representado pelo Prof. Brioso, agradeço pela constante disponibilidade e parceria. Agradeço também aos professores das disciplinas cursadas, pelos ensinamentos, e aos colegas de turma, especialmente Francismara e Franciele, pela convivência agradável e momentos partilhados.

À CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pela oportunidade e suporte. Mais diretamente à PROPPG e PROAF, por todo o auxílio.

“É lá de casa que eu ganho a estrada
E corro o mundo inteiro
Tento, tombo, ergo, canto, luto,
Vou e volto pra lá.”
(Marcos Almeida)

BIOGRAFIA

Tamiris dos Santos Lopes, filha de Andréia Belém dos Santos Lopes e Antônio Marcos Lino Lopes, nasceu em 19 de maio de 1995, no município de São João de Meriti, estado do Rio de Janeiro, Brasil. Concluiu o ensino médio técnico em Controle Ambiental pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), campus Nilópolis, no ano de 2014. Em agosto de 2015, ingressou no curso de graduação em Agronomia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), obtendo o título de Engenheira Agrônoma em outubro de 2021. Durante a graduação, atuou como bolsista de Iniciação Científica (PIBIC/CNPq) entre julho de 2016 e janeiro de 2020, desenvolvendo pesquisas nas áreas de ecologia microbiana e fixação biológica de nitrogênio junto à Embrapa Agrobiologia. No ano de 2018, integrou a empresa júnior do curso de Agronomia, Rural Consultoria Júnior, exercendo a função de assessora de marketing. Em 2020, realizou estágio supervisionado na empresa Agrivalle, localizada em Salto, São Paulo, atuando no setor de Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) de produtos biológicos. Em 2022, foi aprovada na primeira turma do Programa de Residência Ambiental da Secretaria Municipal de Meio Ambiente e Clima do Rio de Janeiro (SMAC), sendo lotada no Programa Hortas Cariocas e no Centro de Educação Ambiental, onde permanece atuando como engenheira agrônoma até o momento. Em 2024, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada da UFRRJ, em nível de mestrado, como bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), sob orientação da Profa. Dra. Patrícia Silva Gôlo. Ao longo de sua trajetória acadêmica, participou ativamente de eventos científicos, com apresentação e publicação de trabalhos em simpósios e congressos da área.

RESUMO

LOPES, Tamiris dos Santos. **Compatibilidade e efeitos promotores de crescimento vegetal da coinoculação de *Metarhizium–Bradyrhizobium* em soja (*Glycine max*)**. 2026. 79 páginas. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada) - Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2026.

Os fungos entomopatogênicos vêm sendo cada vez mais reconhecidos como bioinsumos multifuncionais, mas avaliar sua compatibilidade com inoculantes tradicionais é essencial para viabilizar consórcios microbianos. Este estudo avaliou as interações *Metarhizium–Bradyrhizobium* em soja (*Glycine max*), integrando ensaios laboratoriais e em casa de vegetação. Primeiro, *Metarhizium anisopliae* LCM S04 e *Metarhizium brunneum* LCM S11 foram confrontados *in vitro* com *Bradyrhizobium diazoefficiens* BR 85 (=SEMIA 5080) e *Bradyrhizobium japonicum* BR 86 (=SEMIA 5079). Posteriormente, os microrganismos foram avaliados em casa de vegetação por meio da inoculação direta nas sementes. Cada semente recebeu cultura bacteriana, suspensão fúngica ou ambas, com os volumes totais padronizados em todos os tratamentos (incluindo os controles absoluto e nitrogenado) utilizando uma solução veículo de Tween 80 a 0,01%. Aos 47 dias pós-inoculação, a nodulação, a biomassa e a arquitetura radicular foram determinadas. Os ensaios *in vitro* demonstraram compatibilidade entre os microrganismos e ausência de zonas de inibição, destacando-se a estirpe BR 86 por estimular o crescimento radial do isolado LCM S04. Em casa de vegetação, a presença de *Metarhizium* não afetou a eficiência da nodulação, preservando a simbiose rizóbio-leguminosa. Em termos de desenvolvimento vegetativo, o consórcio BR 85 + LCM S04 promoveu ganhos em altura e massa seca da parte aérea, enquanto a interação BR 86 + LCM S04 incrementou a complexidade da arquitetura radicular, aumentando o comprimento radicular, número de raízes finas e bifurcações. Adicionalmente, confirmou-se o estabelecimento endofítico de *Metarhizium* spp. em fragmentos de raiz, caule e folhas, enquanto sua recuperação do substrato atestou a persistência rizosférica dos isolados. Estes resultados ampliam a compreensão sobre as interações multifuncionais entre fungos entomopatogênicos e rizóbios na soja, validando o potencial biotecnológico desses consórcios para a agricultura tropical sustentável e justificando futuras investigações em campo.

Palavras-chave: *Metarhizium*; *Bradyrhizobium*; soja; endófitos; promoção de crescimento vegetal

ABSTRACT

LOPES, Tamiris dos Santos**. Compatibility and plant growth–promoting effects of *Metarhizium–Bradyrhizobium* co-inoculation in soybean (*Glycine max*)**. 2026. 79 pages. Dissertation (Master in Fitossanity and Applyed Biotecnology) - Institute of Biological and Health Sciences, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2026.

Entomopathogenic fungi are increasingly recognized as multifunctional bioinputs, but evaluating their compatibility with traditional inoculants is essential to enable microbial consortia. This study evaluated *Metarhizium–Bradyrhizobium* interactions in soybean (*Glycine max*), integrating laboratory and greenhouse assays. First, *Metarhizium anisopliae* LCM S04 and *Metarhizium brunneum* LCM S11 were confronted *in vitro* with *Bradyrhizobium diazoefficiens* BR 85 (=SEMIA 5080) and *Bradyrhizobium japonicum* BR 86 (=SEMIA 5079). Subsequently, the microorganisms were evaluated in a greenhouse through direct seed inoculation. Each seed received bacterial culture, fungal suspension, or both, with total volumes standardized across all treatments (including absolute and nitrogen-fertilized controls) using a 0.01% Tween 80 vehicle solution. At 47 days post-inoculation, nodulation, biomass, and root architecture were determined. The *in vitro* assays demonstrated compatibility between the microorganisms and the absence of inhibition zones, with strain BR 86 standing out for stimulating the radial growth of isolate LCM S04. In the greenhouse, the presence of *Metarhizium* did not affect nodulation efficiency, fully preserving the rhizobium–legume symbiosis. In terms of vegetative development, BR 85 + LCM S04 consortium promoted gains in plant height and shoot dry weight, whereas BR 86 + LCM S04 interaction enhanced the complexity of root architecture by increasing root length, fine root number, and bifurcations. Additionally, the endophytic establishment of *Metarhizium* spp. was confirmed in root, stem, and leaf fragments, while its recovery from the substrate attested to the rhizospheric persistence of the isolates. These results expand the understanding of the multifunctional interactions between entomopathogenic fungi and rhizobia in soybean, validating the biotechnological potential of these consortia for sustainable tropical agriculture and justifying future field investigations.

Keywords: *Metarhizium*; *Bradyrhizobium*; soybean; endophytes; plant growth promotion.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Características morfológicas das estirpes *Bradyrhizobium diazoefficiens* BR 85 (A) e *Bradyrhizobium japonicum* BR 86 (B) em meio YMA+VC.

Figura 2 – Preparo e desinfestação superficial das sementes de soja. (A) Lotes das cultivares Brasmax Olimpo IPRO, BRS 1064 e TMG 7362 IPRO após beneficiamento; (B) Imersão das sementes nas soluções para desinfestação e (C) Lavagem das sementes em água destilada estéril.

Figura 3 – Teste de germinação das sementes de soja conduzido em papel Germitest®. (A) Distribuição das sementes sobre o substrato; (B) Cobertura das sementes com papel umedecido e (C) Montagem dos rolos de papel para incubação.

Figura 4 – Procedimentos de inoculação das suspensões fúngicas de LCM S04 e LCM S11. (A) Inoculação no colo das plântulas; (B) Inoculação por pincelamento na superfície foliar e (C) Vasos com soja em área coberta.

Figura 5 – Processamento de amostras e reisolamento fúngico para confirmação de colonização endofítica. (A) Plantas de soja coletadas; (B) Corte dos tecidos em fragmentos de folha, raiz e diferentes porções do caule (superior, médio inferior e inferior) e (C) Placas de Petri contendo meio de cultura CTC utilizadas para o reisolamento.

Figura 6 – Procedimentos metodológicos em experimento de soja submetida à inoculação de *Bradyrhizobium* spp. e *Metarhizium* spp. (A) Cultivo líquido das estirpes *Bradyrhizobium diazoefficiens* BR 85 e *Bradyrhizobium japonicum* BR 86; (B) Suspensões fúngicas de *Metarhizium anisopliae* LCM S04 e *Metarhizium brunneum* LCM S11; (C) Vasos do experimento revestidos com plástico e preenchidos com substrato e (D) Inoculação das suspensões após semeadura.

Figura 7 – Experimento em casa de vegetação para avaliação do desenvolvimento da cultura da soja. (A) Plantas durante a condução do experimento; (B) corte da parte aérea no momento da coleta; (C) lavagem das raízes para remoção do substrato e (D) nódulos radiculares sob inoculação consorciada.

Figura 8 – Coleta de substrato para confirmação de *M. anisopliae* e *M. brunneum* aos 47 DPI. (A) Coleta com auxílio de espátula estéril; (B) Amostra identificada e homogeneizada; (C)

Pesagem das amostras; (D) Agitação da amostra em vortex e (E) Plaqueamento das amostras em placas com meio de cultura CTC.

Figura 9 – Teste de compatibilidade *in vitro* do isolado LCM S04 (*Metarhizium anisopliae*) em cultivo pareado com as estirpes BR 85 (*Bradyrhizobium diazoefficiens*) e BR 86 (*Bradyrhizobium japonicum*) ao longo do período de incubação. A linha (A) corresponde ao controle (S04); a linha (B) ao tratamento S04 + BR 85; e a linha (C) ao tratamento S04 + BR 86.

Figura 10 – Crescimento radial do isolado LCM S04 (*Metarhizium anisopliae*) em cultivo pareado com as estirpes BR 85 (*Bradyrhizobium diazoefficiens*) e BR 86 (*Bradyrhizobium japonicum*), avaliado aos 4, 7, 11, 13, 15, 18 e 20 DAI.

Figura 11 – Teste de compatibilidade *in vitro* do isolado LCM S11 (*Metarhizium brunneum*) em cultivo pareado com as estirpes BR 85 (*Bradyrhizobium diazoefficiens*) e BR 86 (*Bradyrhizobium japonicum*) ao longo do período de incubação. A linha (A) corresponde ao controle (S11); a linha (B) ao tratamento S11 + BR 85; e a linha (C) ao tratamento S11 + BR 86.

Figura 12 – Crescimento radial do isolado LCM S11 (*Metarhizium brunneum*) em cultivo pareado com as estirpes BR 85 (*Bradyrhizobium diazoefficiens*) e BR 86 (*Bradyrhizobium japonicum*), avaliado aos 4, 7, 11, 13, 15, 18 e 20 DAI.

Figura 13 – Fragmentos de raiz (A), caule (B) e folha (C) de plantas de *Glycine max* do grupo controle, não tratado com suspensão fúngica. Os fragmentos foram cultivados em meio de cultura seletivo CTC por 21 dias.

Figura 14 – Crescimento de colônias do isolado LCM S04 (*Metarhizium anisopliae)* obtidas a partir de fragmentos de raiz, caule e folha de plantas de *Glycine max* inoculadas com suspensão fúngica nas concentrações 10^6 (A) e 10^7 (B). Os fragmentos foram cultivados em meio de cultura seletivo CTC por 21 dias.

Figura 15 – Crescimento de colônias do isolado LCM S11 (*Metarhizium brunneum)* obtidas a partir de fragmentos de raiz, caule e folha de plantas de *Glycine max* inoculadas com suspensão fúngica nas concentrações 10^6 (A) e 10^7 (B). Os fragmentos foram cultivados em meio de cultura seletivo CTC por 21 dias.

Figura 16 – Registro fotográfico das plantas coletadas aos 47 dias após inoculação.

Figura 17 – Média e erro padrão das variáveis agronômicas e de nodulação de plantas de soja (*Glycine max*) submetidas aos seguintes tratamentos: controle (CTR), controle nitrogenado (NIT); BR 85 (*Bradyrhizobium diazoefficiens*), BR 86 (*Bradyrhizobium japonicum*), S04 (*Metarhizium anisopliae*), S11 (*Metarhizium brunneum*) e coinoculações (BR 85 + S04, BR 86 + S04, BR 85 + S11 e BR 86 + S11). (A) Imagem representativa de uma planta de soja no momento da colheita, mostrando detalhes do início do florescimento aos 47 dias após a inoculação (DPI); (B) Altura (cm planta^{-1}); (C) Número de folhas (planta^{-1}); (D) Massa seca da parte aérea (g planta^{-1}); (E) Número de ramificações (planta^{-1}); (F) Número de nódulos (planta^{-1}); (G) Massa seca dos nódulos (g planta^{-1}); e (H) Massa seca de raízes (g planta^{-1}). Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($p < 0,05$), n=7.

Figura 18 – Média e erro padrão dos parâmetros radiculares em plantas de soja (*Glycine max*) submetidas aos seguintes tratamentos: controle (CTR), controle nitrogenado (NIT); BR 85 (*Bradyrhizobium diazoefficiens*), BR 86 (*Bradyrhizobium japonicum*), S04 (*Metarhizium anisopliae*), S11 (*Metarhizium brunneum*) e coinoculações (BR 85 + S04, BR 86 + S04, BR 85 + S11 e BR 86 + S11) aos 47 dias após semeadura. (A) Comprimento radicular (mm planta^{-1}); (B) área da superfície radicular (mm² planta^{-1}); (C) diâmetro radicular (mm raiz^{-1} planta^{-1}); (D) volume radicular (mm³ planta^{-1}); (E) número total de raízes (planta^{-1}); (F) bifurcações (planta^{-1}); (G) cruzamentos (número planta^{-1}); (H) número de raízes finas (número planta^{-1}); (I) número de raízes médias (número planta^{-1}); e (J) número de raízes grossas (número planta^{-1}). Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($p < 0.05$), n=7.

Figura 19 – Imagens do sistema radicular de plantas de soja (47 dias após semeadura) obtidas por meio de scanner WinRhizo, sob diferentes tratamentos: (A) controle (CTR), (B) nitrogenado (NIT), (C) BR 85 (*Bradyrhizobium diazoefficiens*), (D) BR 86 (*Bradyrhizobium japonicum*), (E) LCM S04 (*Metarhizium anisopliae*), (F) LCM S11 (*Metarhizium brunneum*), (G) BR 85 + LCM S04, (h) BR 85 + LCM S11, (I) BR 86 + LCM S04 e (J) BR 86 + LCM S11.

Figura 20 – Recuperação qualitativa de *Metarhizium* spp. a partir de amostras de substrato coletadas dos vasos aos 47 dias pós-inoculação (DPI). Placas representativas dos dez tratamentos: (A) controle (CTR); (B) fertilizado com nitrogênio (NIT); (C) *Bradyrhizobium diazoefficiens* (BR 85); (D) *Bradyrhizobium japonicum* (BR 86); (E) *Metarhizium anisopliae*

(LCM S04); (F) BR 85 + LCM S04; (G) BR 86 + LCM S04; (H) *Metarhizium brunneum* (LCM S11); (I) BR 85 + LCM S11; e (J) BR 86 + LCM S11.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Fatores de diluição utilizados para o cálculo da concentração de unidades formadoras de colônia (UFC mL^{-1}) do inoculante……38

Tabela 2 – Cronograma de adição da solução nutritiva CRS……39

Tabela 3 – Média seguida de erro padrão do raio (mm) da colônia do isolado LCM S04 (*Metarhizium anisopliae*) cultivado com as estirpes BR 85 (*Bradyrhizobium diazoefficiens*) e BR 86 (*Bradyrhizobium japonicum*) ao longo do período de incubação……...45

Tabela 4 – Média e erro padrão do teste de compatibilidade *in vitro* do isolado LCM S11 (*Metarhizium brunneum*) em confronto com as estirpes BR 85 (*Bradyrhizobium diazoefficiens*) e BR 86 (*Bradyrhizobium japonicum*) ao longo do período de incubação…47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BDA Batata Dextrose Ágar

BPCV Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal

CTC Cloranfenicol, Tiabendazol e Cicloheximida

CTR Controle

DAI Dias Após Incubação

DAS Dias Após Semeadura

DPI Dias Pós-Inoculação

DO Densidade Óptica

FE Fungo(s) entomopatogênico(s)

FBN Fixação Biológica de Nitrogênio

LCM Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes de Importância Veterinária

MSN Massa Seca de Nódulos

MSPA Massa Seca de Parte Aérea

MSR Massa Seca de Raízes

NIT Tratamento Nitrogenado

NN Número de Nódulos

NR Número de Ramos

NTR Número Total de Raízes

RAS Regras para Análise de Sementes

UFC Unidade(s) Formadora(s) de Colônia

ULA Unidade de Luz Adicional

UR Umidade Relativa

VC Vermelho Congo

YMA Yeast Mannitol Agar

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO **19**
2 REVISÃO DE LITERATURA **21**
2.1 A cultura da soja (*Glycine max* (L.) Merr.) 21
2.2 Fixação biológica de nitrogênio e coinoculação em soja 23
2.3 Fungos entomopatogênicos e seu potencial endofítico 25
2.4 Interação entre *Metarhizium* spp. e plantas 27
3 MATERIAL E MÉTODOS **29**
3.1 Local do experimento 29
3.2 Origem dos isolados fúngicos e preparo das suspensões 30
3.3 Origem das estirpes bacterianas e cultivo em meio de cultura 31
3.4 Teste de compatibilidade *in vitro* entre isolados de *Metarhizium* spp. e estirpes de *Bradyrhizobium* spp. 31
3.5 Seleção do lote de sementes de *Glycine max* 33
3.6 Estabelecimento endofítico de *Metarhizium* spp. em plantas de soja 34
3.7 Experimento de inoculação em plantas 36
3.7.1 Preparo dos inoculantes bacterianos 36
3.7.2 Quantificação de unidades formadoras de colônia (UFC) de *Bradyrhizobium* spp. 37
3.7.3 Montagem e condução do experimento em casa de vegetação 38
3.7.4 Avaliação de parâmetros vegetais 40
3.7.5 Processamento das amostras de raízes 41
3.7.6 Recuperação fúngica e identificação qualitativa de *Metarhizium* spp. a partir do substrato 41
4 RESULTADOS **43**
4.1 Teste de compatibilidade in vitro entre isolados de *Metarhizium* spp. e estirpes de *Bradyrhizobium* spp. 43
4.2 Seleção do lote de sementes 47
4.3 Estabelecimento endofítico de *Metarhizium* spp. em plantas de soja 47
4.4 Experimento em Casa de Vegetação 49
4.4.1 Crescimento e desenvolvimento da soja 49
4.4.2 Processamento das amostras de raízes 52
4.4.3 Detecção qualitativa de *Metarhizium* spp. no substrato 57
5 DISCUSSÃO **58**
6 CONCLUSÕES **62**
7 REFERÊNCIAS **63**
8 ANEXOS **77**

INTRODUÇÃO

Os fungos entomopatogênicos (FE) são reguladores fundamentais da dinâmica populacional de insetos em ecossistemas agrícolas (Iwanick *et al*., 2019). No mercado brasileiro de bioinsumos, entre os patógenos fúngicos de invertebrados, os gêneros *Beauveria* (Hypocreales: Cordyciptaceae) e *Metarhizium* (Hypocreales: Clavicipitaceae) representam mais de 70% de todos os agentes de controle biológico fúngico comercialmente disponíveis no país (Mascarin e Jaronski, 2016; Mascarin *et al*., 2024). Além de seu papel como patógenos de insetos, as espécies de *Metarhizium* são cada vez mais reconhecidas como microrganismos multifuncionais com potencial significativo como simbiontes radiculares e endófitos (Behie *et al*., 2015; Quesada-Moraga, 2020; Stone e Bidochka, 2020; Mesquita *et al*., 2023). Além disso, interações tripartites envolvendo o solo, a planta e o controle de pragas também são destacadas (Bamisile *et al*. 2023; Aravinthraju *et al*. 2024). Adicionalmente, relata-se que esses fungos melhoram o desempenho das plantas ao conferir resistência contra estresses bióticos e abióticos, tais como fitopatógenos e salinidade (Canassa *et al*., 2020; Holz *et al*., 2023; Khan *et al*., 2012).

A eficácia de isolados como *Metarhizium brunneum*, *Metarhizium anisopliae* e *Metarhizium robertsii* está frequentemente ligada à sua persistência rizosférica (Golo *et al*., 2014; Hu e Bidochka, 2021), particularmente quando aplicados como tratamento de sementes ou por meio de diversas estratégias de inoculação (Liao *et al*., 2014; Sarven *et al*., 2020; Russo *et al*., 2015). Apesar do crescente reconhecimento desses benefícios (Ahmad *et al*., 2020; Hu *et al*., 2023), as informações sobre a associação de *Metarhizium* spp. com culturas no Brasil ainda estão em estágios iniciais (Mesquita *et al*., 2023). A elucidação dessas interações simbióticas no ambiente rizosférico é crucial para o avanço da agricultura sustentável. A rizosfera constitui um centro crítico para interações complexas planta-microrganismo e microrganismo-microrganismo, sendo responsável pela ciclagem de nutrientes, estabilidade do ecossistema e sequestro de carbono (Bais *et al*., 2006; Singh *et al*., 2004).

A soja (*Glycine max*), principal cultura de oleaginosas do mundo, depende extensivamente de bactérias do gênero *Bradyrhizobium* spp. para conduzir a Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN). Esse processo simbiótico é uma alternativa sustentável amplamente utilizada, atendendo à alta demanda de nitrogênio da soja, que excede 80 kg de N por tonelada de grão (Seixas *et al*., 2020). Na América do Sul, a inoculação anual de mais de 40 milhões de hectares com *Bradyrhizobium* permite a fixação de até 10 milhões de toneladas de nitrogênio por ano, com média superior a 200 kg ha^{-1} por colheita (Hungria *et al*., 2006; Hungria e Mendes,

2015; Chibeba *et al*., 2018). No entanto, manter um desempenho consistente no campo continua sendo um desafio devido à competitividade das estirpes e à compatibilidade com diversas comunidades microbianas (Fukami *et al*., 2018).

Nesse sentido, a integração de fungos como *Metarhizium* em sistemas já estabelecidos de produção de soja ainda é pouco compreendida. Pesquisas indicam que a colonização fúngica endofítica ativa defesas sistêmicas nas plantas, aumentando assim a resistência e a tolerância contra insetos herbívoros (Ahsan *et al*., 2024; Rasool *et al*., 2024). Para aproveitar totalmente esses múltiplos benefícios no campo, a combinação do controle biológico de pragas com a FBN surge como uma abordagem promissora. Contudo, à medida que as tendências agrícolas se voltam para os consórcios microbianos, as pesquisas que investigam a compatibilidade entre esses agentes de biocontrole e bactérias fixadoras de nitrogênio, particularmente *Bradyrhizobium* spp., ainda são escassas.

Descobertas recentes de Iberia *et al*. (2026) demonstraram que o desempenho biológico de *Metarhizium* em soja é fortemente dependente do isolado. Ao selecionarem isolados nativos do Uruguai para avaliar a compatibilidade com estirpes comerciais de *B. elkanii* (U1301 e U1302), os autores relataram interações inibitórias *in vitro* para isolados específicos. Estes incluíram sete isolados de *M. lepidiotae* com fortes efeitos inibitórios, bem como *M. robertsii* ILB440 e *M. frigidum* ILB185 com inibição moderada, sugerindo um potencial antagonismo direto sob condições de laboratório. Contudo, esses efeitos inibitórios não foram observados em estudos *in planta*, onde a coinoculação não mostrou interferência na nodulação ou no desempenho das plantas.

A seleção de microrganismos para novas formulações comerciais requer uma avaliação multifacetada. No contexto de consórcios microbianos, o sucesso dependerá da compatibilidade biológica entre os inoculantes e da garantia de sua viabilidade (Blum, 2007). Até onde sabemos, este é o primeiro estudo a explorar a compatibilidade e a coinoculação de isolados nativos de *Metarhizium* com estirpes de *Bradyrhizobium* essenciais para a FBN na cultura da soja no Brasil. Ao avaliar as interações *in vitro* e em casa de vegetação entre as estirpes oficiais *B. diazoefficiens* BR 85 (CPAC 7; SEMIA 5080) e *B. japonicum* BR 86 (CPAC 15; SEMIA 5079) e dois isolados obtidos de solos do Sudeste do Brasil, *M. anisopliae* LCM S04 e *M. brunneum* LCM S11, este trabalho investiga os impactos dessa associação na promoção do crescimento vegetal, na morfologia radicular, no estabelecimento endofítico e na manutenção da simbiose rizobiana.

2 REVISÃO DE LITERATURA

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

A produção global de oleaginosas apresenta tendência de crescimento, passando de 682,1 milhões de toneladas na safra 2024/25 para uma estimativa de 691,6 milhões de toneladas em 2025/26. Nesse contexto, a soja destaca-se como a principal oleaginosa, respondendo por aproximadamente 61,6% da produção mundial projetada para a safra 2025/26 (USDA, 2025). Apesar das divergências entre projeções internacionais, com o USDA indicando leve crescimento e o Conselho Internacional de Grãos apontando pequena redução no volume global produzido, a cultura mantém elevada relevância no cenário agrícola mundial, desempenhando papel estratégico na segurança alimentar, nutricional, energética e econômica (Johnson *et al*., 2023; Ramlal *et al*., 2024; IGC, 2025).

A soja é uma leguminosa pertencente à família Fabaceae, subfamília Papilionoideae e tribo Phaseoleae, originária do leste da Ásia, com centro de domesticação no nordeste da China (Hymowitz, 1970; Sediyama, 2015). Trata-se do principal grão produzido, processado e comercializado mundialmente, sendo amplamente utilizada na produção de óleo, biodiesel e na alimentação humana e animal, em razão de sua elevada qualidade nutricional, baixo custo e alto teor proteico (Castro; Carvalho, 2014; Hirakuri; Lazzarotto, 2014; Mattos, 2015; CONAB, 2019; Hu, 2023; Kim, 2023; Rani, 2023). Os grãos apresentam teores proteicos entre 30% e 40%, com elevada concentração de aminoácidos essenciais, como arginina, leucina e lisina, e ampla diversidade de derivados, o que reforça a versatilidade da cultura e sua importância nas cadeias agroindustriais (Bordingnon; Mandarino, 1994; Silva *et al*., 2006; CONAB, 2022; Qin *et al.*, 2022; Kim, 2023).

Do ponto de vista agronômico, a soja apresenta porte herbáceo, crescimento ereto a semiereto e altura variável conforme a cultivar e as condições ambientais. Possui sistema radicular pivotante, caule cilíndrico e ramificado, folhas trifolioladas e flores predominantemente autógamas, hermafroditas e papilionadas, que originam vagens do tipo legume contendo uma a quatro sementes (Moreira; Siqueira, 2006; Damasio, 2025). O desenvolvimento da cultura é fortemente influenciado pelo fotoperíodo e pela disponibilidade de luminosidade, condicionando a adaptação dos cultivares às diferentes latitudes (Tejo; Fernandes; Buratto, 2019).

No Brasil, a produção de soja apresentou crescimento expressivo nas últimas décadas, passando de 1,9 milhão de toneladas em 1970 para mais de 150 milhões de toneladas em 2023, consolidando o país como líder mundial, posição que deverá ser mantida na safra 2025/26, com

produção estimada em cerca de 175 milhões de toneladas (IBGE, 2022; CONAB, 2024; USDA, 2025). O Centro-Oeste destaca-se como principal polo produtor, concentrando mais de 50% da produção nacional, seguido pela região Sul, com destaque para os estados de Mato Grosso, Goiás e Paraná (Vieira Filho, 2024).

A relevância da soja para o desenvolvimento econômico nacional é evidenciada por sua consolidação como insumo estratégico em múltiplas cadeias produtivas, abrangendo a produção primária, a agroindústria e a cadeia de carnes, refutando a percepção de baixo valor agregado frequentemente associada à cultura (Graziano; Gazzoni; Pedroso, 2021; Vieira Filho, 2024). Além disso, a expansão das exportações não comprometeu a segurança alimentar nacional, uma vez que o consumo interno de derivados manteve trajetória de crescimento. A cadeia produtiva da soja exerce impactos positivos sobre o desenvolvimento local, refletidos na atração de investimentos, geração de empregos e incorporação de ciência, tecnologia e inovação, envolvendo cerca de 240 mil produtores e 1,4 milhão de pessoas empregadas direta e indiretamente no país (CONAB, 2022).

A expansão da soja no bioma Cerrado, por exemplo, que hoje ocupa cerca de 24% do território nacional, foi viabilizada por avanços científicos e tecnológicos conduzidos principalmente pela Embrapa, por meio do Centro de Pesquisa Agropecuária do Cerrado (CPAC), que permitiram a incorporação produtiva de áreas anteriormente consideradas inadequadas ao cultivo agrícola (Kopf; Brum, 2019; Fishlow; Vieira Filho, 2020). Esse processo foi fortalecido por iniciativas de cooperação técnico-científica internacional, como a parceria nipo-brasileira, e pela tropicalização da cultura, envolvendo avanços em melhoramento genético, manejo da fertilidade do solo e adoção de sistemas conservacionistas, como o plantio direto, resultando em expressivos ganhos de produtividade (Embrapa, 2004; Hungria *et al*., 2006; Hosono; Hongo, 2016).

Atualmente, o crescimento do consumo de produtos orgânicos também tem impulsionado a produção de soja orgânica no Brasil, caracterizada pela ausência de agrotóxicos e maior valor agregado, especialmente para a formulação de rações destinadas à produção de carnes orgânicas (Embrapa, 2015; CI Orgânicos, 2021). Contudo, a produção e a comercialização desse sistema exigem certificação específica, uso de sementes não transgênicas e controle biológico de pragas e plantas daninhas, ainda enfrentando desafios como a limitada disponibilidade de cultivares adaptadas (Dadazio *et al*., 2020). Esses movimentos ocorrem em resposta às preocupações ambientais e socioeconômicas associadas ao cultivo convencional, marcado pelo uso intensivo de insumos químicos e seus impactos

sobre o solo, a microbiota edáfica e os recursos hídricos (Johnson *et al*., 2023; Turabi *et al*., 2024; Zhao *et al*., 2024).

2.2 Fixação biológica de nitrogênio e coinoculação em soja

A cultura da soja apresenta elevada exigência por nitrogênio, estimada em cerca de 80 kg de N por tonelada de grãos produzidos, sendo este um nutriente essencial ao crescimento vegetativo e ao enchimento de grãos (Seixas *et al*., 2020). Esse elemento participa diretamente da formação de proteínas, enzimas, ácidos nucleicos e clorofila, influenciando de forma decisiva na fotossíntese e na produtividade final da cultura (Hungria *et al*., 2022). No Brasil, a demanda desse macronutriente pode ser suprida total ou parcialmente pela FBN, um processo biológico que atua como alternativa sustentável ao uso de fertilizantes químicos nitrogenados, conferindo enorme vantagem econômica e ambiental à produção nacional (Embrapa, 2019).

Na cultura da soja, a FBN é um processo simbiótico estabelecido entre a leguminosa e bactérias diazotróficas do gênero *Bradyrhizobium*, que convertem o nitrogênio atmosférico em uma forma assimilável pelas plantas (Mascarenhas *et al*., 2005). Essa transformação é realizada por bactérias que possuem o complexo enzimático nitrogenase, capaz de romper a ligação tripla do N_2 (Hungria e Mendes, 2015). A simbiose baseia-se em uma complexa troca de sinais químicos no sistema radicular, culminando na formação de nódulos radiculares, estruturas dentro das quais a planta regula cuidadosamente a concentração de oxigênio por meio da leghemoglobina para garantir as condições adequadas ao funcionamento da nitrogenase (Hungria e Mendes, 2015).

Embora a prática de inoculação dessas bactérias seja amplamente adotada no agronegócio nacional, sua eficiência é influenciada por condições edafoclimáticas e técnicas de manejo (Hungria e Mendes, 2015; Zilli *et al*., 2019). Fatores ambientais, como temperatura e disponibilidade hídrica, afetam a sobrevivência e o metabolismo dos rizóbios, especialmente em períodos prolongados de seca ou estresse térmico. Além disso, o processo de FBN exige um gasto energético das plantas, que precisam fornecer carbono e energia na forma de ATP às bactérias em simbiose (Stam *et al*., 1987). Diante disso, a inoculação de estirpes de *Bradyrhizobium* em conjunto com outros microrganismos benéficos apresenta-se como uma possibilidade de otimizar esse balanço energético e favorecer o desenvolvimento vegetal.

Nesse cenário de inovação, o manejo microbiológico do solo expandiu-se da inoculação simples para o conceito de coinoculação ou uso integrado de múltiplos microrganismos através de consórcios. Essa abordagem baseia-se na aplicação conjunta de microrganismos de diferentes gêneros e nichos ecológicos, visando explorar efeitos sinérgicos

no ecossistema radicular para potencializar a resiliência da cultura frente a estresses bióticos e abióticos (Domingues, 2019).

Entre as bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) aplicadas à coinoculação, a espécie *Azospirillum brasilense* consolidou-se na cultura da soja por sua habilidade de colonizar a rizosfera e estimular o crescimento radicular (Hungria, 2016). Enquanto o *Bradyrhizobium* realiza a fixação simbiótica, o *Azospirillum* atua por meio da síntese de fitormônios, como auxinas e giberelinas, favorecendo a absorção de água, nutrientes e expandindo a área de exploração do solo (Zuffo *et al*., 2015). Embora contribua com uma pequena quantidade de nitrogênio fixado, seu principal benefício é o estímulo fisiológico que intensifica a nodulação e melhora a eficiência nutricional, promovendo incrementos de produtividade na soja que variam de 8% a 10% dependendo das condições de cultivo (Zuffo *et al*., 2015; Fachinelli, 2018; Prado *et al*., 2019; Hungria *et al*., 2022).

Por outro lado, quando se trata de microrganismos endofíticos, que colonizam os tecidos internos das plantas vivas de forma assintomática durante todo ou parte de seu ciclo de vida (Hartlova *et al*., 2011), a promoção do crescimento vegetal pode ocorrer por mecanismos distintos da fixação direta, como pelo aumento da atividade da enzima redutase do nitrato (Cassán e Salamone, 2008). Esses endófitos exercem efeitos benéficos diretos no desenvolvimento de órgãos, produção de flores e rendimento das culturas (Dey *et al*., 2004).

O potencial dessa estratégia é evidenciado por bactérias do gênero *Bacillus*, como *Bacillus subtilis*, que atuam na promoção do crescimento por vias diretas e indiretas. De maneira direta, esse microrganismo atua na solubilização de fósforo, na produção de fitormônios, sideróforos e na indução de tolerância a estresses abióticos (Hashem *et al*., 2019). Indiretamente, sua capacidade de colonização endofítica (Fall *et al*., 2004) e a formação de biofilme radicular exercem o controle biológico de fitopatógenos através da produção de lipopeptídeos antimicrobianos (Davey *et al*., 2003). Quando associado ao rizóbio, o *B. subtilis* pode aumentar a nodulação, a competitividade bacteriana e a eficiência da FBN, seja pela ampliação dos sítios de infecção ou pela proteção sanitária do sistema radicular, resultando em ganhos expressivos de produtividade de grãos (Li e Alexander, 1988; Araújo e Hungria, 1999; Turner e Backman, 1991; Lazzaretti e Melo, 2005; Araújo *et al*., 2010).

Assim, a combinação entre FBN e coinoculação consolida-se como uma estratégia biotecnológica essencial para a sustentabilidade e competitividade da sojicultura brasileira. Esse panorama bem-sucedido de interações multifuncionais fundamenta a inserção de novos microrganismos aos consórcios bacterianos tradicionais. Nesse contexto, a integração com fungos benéficos surge como uma alternativa promissora para expandir os benefícios

biológicos na cultura, estabelecendo a base para o uso de sistemas tripartites na agricultura tropical.

2.3 Fungos entomopatogênicos e seu potencial endofítico

A produtividade das culturas agrícolas é constantemente desafiada por extremos climáticos, pragas e fitopatógenos, fatores que comprometem desde o estabelecimento inicial até o manejo fitossanitário das lavouras. No cenário brasileiro, a cultura da soja é severamente afetada por uma ampla diversidade de artrópodes-praga. A abordagem convencional para o manejo desses organismos envolve o uso intensivo de inseticidas sintéticos. Embora essa prática apresente eficácia em curto prazo, seu uso contínuo gera impactos ambientais severos, evolução de resistência em populações de pragas e preocupações com a saúde pública (Alves, 2014).

Diante disso, o controle biológico consolida-se como uma alternativa viável e sustentável à dependência desses insumos químicos, apresentando como um dos principais pilares a aplicação de FE, com notório destaque para os gêneros *Metarhizium*, *Cordyceps* e *Beauveria*, táxons bem estabelecidos dentro da ordem Hypocreales (Barra-Bucarel *et al*., 2019; Strom *et al*., 2020; Yapa *et al*., 2025).

No agroecossistema, esses microrganismos desempenham um papel fundamental na regulação natural das populações de insetos (Alves; Farias, 2010). Na cultura da soja, os FE apresentam relevância histórica no controle de importantes pragas desfolhadoras, como *Anticarsia gemmatalis*, *Chrysodeixis includens* e espécies do gênero *Spodoptera*, que podem causar elevados níveis de desfolha e comprometer significativamente o rendimento de grãos (Sosa-Gómez *et al*., 2003).

O processo infeccioso dos FE inicia-se com a adesão dos conídios à cutícula do inseto, mediada por proteínas estruturais como hidrofobinas e adesinas, seguida pela germinação e diferenciação de estruturas especializadas, como o tubo germinativo e o apressório (Leger, 2008; Carolino *et al*., 2014; Tiago *et al*., 2014). A penetração do tegumento ocorre pela ação combinada de pressão mecânica e secreção de enzimas hidrolíticas, incluindo quitinases, proteases e lipases, permitindo a colonização do hemocele e a subsequente morte do hospedeiro por septicemia ou ação de toxinas (Zimmermann, 2007).

A viabilidade do uso prático desses fungos no manejo biológico fundamenta-se na eficiência em suprimir os hospedeiros em diferentes estágios evolutivos, na ampla variabilidade genética, que viabiliza a seleção de isolados altamente virulentos para alvos específicos, e na segurança ecotoxicológica que oferecem aos ecossistemas (Alves, 1998; Samish; Ginsberg;

Glaser, 2004; Thomas; Read, 2007). Entretanto, a eficácia de bioinseticidas em condições de campo depende fortemente das variáveis climáticas, sendo a alta umidade relativa e as temperaturas moderadas fatores essenciais para a sobrevivência, germinação e o pleno desenvolvimento dos conídios (Fontes; Valadares-Inglis, 2020).

Paralelamente ao ciclo patogênico clássico, a compreensão das funções ecológicas desses fungos expandiu-se marcadamente. Desde a origem das plantas terrestres, os microrganismos se associam aos tecidos vegetais por meio de um longo processo coevolutivo, estabelecendo interações que variam de mutualísticas a deletérias (Downie, 2010; Turner; James; Poole, 2013). Nesse contexto, investigações têm relatado que espécies pertencentes aos gêneros *Beauveria* e *Metarhizium*, além de sua atuação fitossanitária direta, possuem a capacidade de colonizar tecidos vegetais de forma assintomática, estabelecendo-se como microrganismos endofíticos em diversas culturas agrícolas (Behie; Bidochka, 2014; Russo *et al*., 2019).

As definições de endófitos fúngicos evoluíram substancialmente ao longo do desenvolvimento das pesquisas nessa área (Schulz; Boyle, 2005; Hyde; Soytong, 2008). Atualmente, esse caráter endofítico compreende a capacidade de o agente se estabelecer no interior dos tecidos das plantas sem causar sintomas de patogenicidade (Nair; Padmavathy, 2014), ocupando nichos específicos em raízes, caules e folhas (Wilson, 1995; Nisa *et al*., 2015).

A associação entre endófitos fúngicos e as plantas hospedeiras pode ocorrer de forma obrigatória ou facultativa, envolvendo um complexo equilíbrio bioquímico (Carroll, 1988). A maioria das espécies vegetais abriga endófitos que influenciam positivamente o crescimento e o estado sanitário vegetal desde as fases iniciais de germinação das sementes (White *et al*., 2019). A introdução do fungo na planta pode ser obtida por diferentes vias, incluindo a colonização via radicular a partir do solo, o tratamento de sementes ou a aplicação foliar, sendo o sucesso do estabelecimento regulado pela espécie fúngica, pelo genótipo da planta e pelas condições microclimáticas (Parsa *et al*., 2013; Jaber; Enkerli, 2016). Uma vez no interior dos tecidos, o ambiente endofítico oferece maior proteção contra estresses ambientais e radiação ultravioleta quando comparado ao solo ou à superfície rizosférica, conferindo uma significativa vantagem ecológica a esses isolados (Berendsen; Pieterse; Bakker, 2012).

Adicionalmente, estudos apontam que a diversidade e a taxa de colonização da comunidade fúngica endofítica variam conforme o genótipo do hospedeiro, o tecido analisado, o estágio fenológico e o sistema de manejo adotado, inclusive sofrendo influência direta da aplicação de defensivos agrícolas (Pimentel *et al*., 2006; Stuart *et al*., 2018; Batzer; Mueller, 2020).

Como resultado dessa simbiose, estabelece-se uma relação de troca na qual o hospedeiro fornece nicho protegido e fotoassimilados (Raman; Suryanarayanan, 2017), enquanto o fungo sintetiza substâncias bioativas, incluindo reguladores de crescimento e compostos com propriedades antibacterianas, antifúngicas e inseticidas, que auxiliam a planta a sobrepor-se a competidores e estresses (Carroll, 1988; Faeth, 2002; Yan *et al*., 2019; Chouhan *et al*., 2022).

Outro aspecto relevante dos FE diz respeito à modulação indireta da interação planta-inseto. Plantas colonizadas por FE endofíticos frequentemente exibem alterações no perfil de metabólitos secundários e na emissão de compostos voláteis, tornando os tecidos vegetais menos atrativos ou adequados ao desenvolvimento de insetos-praga (Ferreira *et al*., 2024). Por fim, essa associação também contribui para a melhoria da eficiência nutricional e para a tolerância a estresses bióticos e abióticos, mecanismos mediados pela produção de fitormônios, solubilização de nutrientes indisponíveis no solo e indução de resistência sistêmica (Zheng *et al*., 2016; Jaber, 2018; Jaber; Alananbeh, 2018; Moloinyane; Nchu, 2019; Poveda *et al*., 2021; Melo *et al*., 2024).

2.4 Interação entre *Metarhizium* spp. e plantas

Fungos entomopatógenos do gênero *Metarhizium* (Clavicipitaceae, Hypocreales) possuem ampla ocorrência geográfica e demonstram uma estreita relação ecológica com o ambiente edáfico (Jaronski, 2007). Esse grupo taxonômico caracteriza-se por uma notável variabilidade genética e plasticidade quanto à especificidade de alvos, dividindo-se entre linhagens generalistas e especialistas de acordo com o potencial biológico de colonizar variadas ordens de insetos-praga (Gao *et al*., 2011; Leger; Wang, 2020). No cenário brasileiro, *Metarhizium* destaca-se como um dos agentes mais importantes no controle biológico de artrópodes-praga, acumulando um histórico consolidado de uso no manejo fitossanitário de grandes culturas, especialmente no controle de cigarrinhas e lagartas em sistemas de produção de cana-de-açúcar e soja (Parra, 2014; Mascarin *et al*., 2019).

Na cultura da soja, espécies como *Metarhizium rileyi* são amplamente reconhecidas pela capacidade de induzir epizootias naturais em populações de *Anticarsia gemmatalis*, atuando como um elemento regulador biológico fundamental (Thorvilson; Pedigo, 1984; Sujii *et al*., 2002). Estudos clássicos corroboram que a aplicação desse entomopatógeno direcionada aos estágios iniciais de desenvolvimento das lagartas resulta em elevadas taxas de mortalidade em curtos intervalos de tempo (Ignoffo *et al*., 1975; Lopes *et al*., 1995). Entretanto, a intensificação do uso de fungicidas sintéticos nos sistemas agrícolas convencionais pode

impactar negativamente a viabilidade dessas populações nativas de *Metarhizium*, reduzindo drasticamente sua persistência no solo e comprometendo a eficiência do controle biológico natural (Sosa-Gómez *et al*., 2003; Lima, 2015).

Para além de sua consolidada função entomopatogênica, espécies de *Metarhizium* são intensamente investigadas devido à capacidade de colonizar a região rizosférica e estabelecer associações endofíticas estáveis com as plantas. Tal comportamento amplia substancialmente o espectro funcional desses microrganismos, inserindo-os em um contexto complexo de interações multifuncionais na interface planta-microrganismo, com reflexos diretos na promoção do crescimento vegetal, na otimização nutricional e na proteção contra fitopatógenos e estresses abióticos (Ahmad *et al*., 2020; Hu; Bidochka, 2021).

Evidências indicam que *Metarhizium robertsii* e *Metarhizium anisopliae* colonizam eficientemente tanto o sistema radicular quanto os tecidos aéreos, promovendo o incremento da biomassa e da área de contato do vegetal. Na rizosfera, os conídios liberados aderem à superfície das raízes e, após a germinação sob estímulos favoráveis, iniciam a colonização interna celular. Esse estabelecimento endofítico induz alterações morfológicas perceptíveis na arquitetura radicular, como o crescimento acelerado e o aumento expressivo na densidade de pelos radiculares (Sasan; Bidochka, 2012).

Essa associação benéfica e multifatorial é mediada pela modulação de vias hormonais, regulação homeostática e secreção de compostos bioativos na rizosfera. Espécies de *Metarhizium* podem atuar diretamente na regulação do ácido jasmônico, estimulando respostas de defesa vegetal, e na síntese de auxinas, como o ácido indolacético (AIA), e giberelinas, fitormônios amplamente implicados no desenvolvimento da fitomassa e no alongamento de raízes e brotos (Deuner *et al*., 2015; Siqueira *et al*., 2020; Jiang, 2022). Paralelamente, espécies de *Metarhizium* possuem a capacidade de estimular a produção de brassinoesteroides e regular sistemas enzimáticos antioxidantes, importantes agentes na manutenção da homeostase redox sob condições adversas (Jiang, 2022). O potencial bioestimulante desses isolados abrange, ainda, mecanismos nutricionais e bioquímicos, como a capacidade de solubilização de fosfatos inorgânicos e a liberação de sideróforos e quitinases no ambiente radicular (Deuner *et al*., 2015).

Um desdobramento relevante dessa regulação metabólica envolve a capacidade de *Metarhizium* em atenuar a fitotoxicidade induzida por contaminantes ambientais. Estudos demonstraram que a inoculação com espécies desse gênero pode reduzir significativamente o acúmulo de metais pesados, como cádmio (Cd) e chumbo, nos tecidos vegetais por meio do estímulo a sistemas antioxidantes (Hussein *et al*., 2011; Jiang, 2022). Ao avaliar essa dinâmica

em arroz, Hussein *et al*. (2011) constataram que a inoculação com *M. robertsii* mitigou a absorção de Cd, mantendo os teores do metal na fitomassa dentro dos níveis seguros recomendados pela FAO, além de promover incrementos na produção de biomassa e na altura da parte aérea sob doses elevadas do elemento no solo.

O isolamento de *Metarhizium* a partir de tecidos radiculares de soja reforça o potencial desse gênero como bioinoculante multifuncional, indicando sua viabilidade em estratégias integradas que combinem o manejo de pragas com a bioestimulação da cultura (Holz *et al*., 2023). Atualmente, a utilização desses microrganismos endofíticos tem despertado interesse devido ao seu potencial de integração e sinergismo com outros componentes do microbioma vegetal, com notório destaque para as bactérias fixadoras de nitrogênio do grupo dos rizóbios, fundamentais para o estabelecimento da simbiose nodular e nutrição nitrogenada (Hungria *et al*., 2015).

Considerando que cada hospedeiro representa um ecossistema complexo, as interações microrganismo-planta exibem grande plasticidade fenotípica, oscilando do mutualismo ao antagonismo a depender da biocomunicação química e das condições ambientais (Schulz; Boyle, 2005). Consequentemente, a eficiência e a estabilidade dessas interações multifuncionais no campo podem variar em função da compatibilidade genética entre as linhagens microbianas envolvidas, do genótipo da planta hospedeira, do método de inoculação e da competição com a microbiota nativa associada (Moreno, 2022). Desse modo, embora o potencial bioprotetor contra pragas seja extensamente documentado (Zheng *et al*., 2016; Yan *et al*., 2019; Mesquita *et al*., 2023), ainda são escassos os estudos detalhados focados especificamente em sua ação bioestimulante e na sua compatibilidade biológica com inoculantes tradicionais em grandes culturas de alto valor econômico, como a soja. Diante disso, a bioprospecção de linhagens nativas com dupla aptidão, apresentando elevada virulência contra insetos aliada a uma robusta capacidade endofítica e compatibilidade simbiótica, consolida-se como um aspecto científico central para viabilizar o desenvolvimento de tecnologias integradas voltadas à agricultura sustentável.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local do experimento

Os experimentos *in vitro* foram conduzidos no Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes de Importância Veterinária (LCM), localizado na Estação Experimental de

Pesquisas Parasitológicas Wilhelm Otto Neitz (EEPPWON) (22°45'54.9" S, 43°41'57.2" W), Departamento de Parasitologia Animal (DPA), Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ, Seropédica, RJ, Brasil). O experimento em casa de vegetação foi realizado na Embrapa Agrobiologia (Seropédica, RJ, Brasil). As análises morfológicas do sistema radicular das plantas foram realizadas no Laboratório de Química Biológica do Solo (LQBS), Departamento de Solos, Instituto de Agronomia (DS/IA) da UFRRJ.

3.2 Origem dos isolados fúngicos e preparo das suspensões

Dois isolados fúngicos foram usados neste estudo: *Metarhizium anisopliae* LCM S04 e *Metarhizium brunneum* LCM S11. Os isolados foram obtidos a partir de amostras de solo coletadas nos municípios de Seropédica (22°46'03.5" S, 43°40'40.9" W) e Maricá (22°32’28.9’’ S, 42°34’31.2’’ W), respectivamente, no estado do Rio de Janeiro, Brasil (Correa *et al*., 2022). *M. anisopliae* foi identificado de acordo com Mesquita *et al*. (2020), enquanto *M. brunneum* foi identificado baseado em dados não publicados. Ambos estão depositados na Coleção de Culturas de Fungos Entomopatogênicos do Laboratório de Controle Microbiano (CCFELCM/UFRRJ) e na Coleção de Culturas de Fungos Filamentosos do Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) (CCFF/IOC), Rio de Janeiro, Brasil, sob os números de acesso IOC 4694 (LCM S04) e IOC 4702 (LCM S11). A seleção desses isolados fundamentou-se em avaliações prévias conduzidas pelo grupo de pesquisa, nas quais foram considerados parâmetros como termotolerância e capacidade de produção conidial.

Os isolados foram cultivados em meio batata-dextrose-ágar (BDA) (39 g L^{-1}, Kasvi, Paraná, Brasil), em placas de Petri de polipropileno (90 × 15 mm) e incubados a 25 ± 1 °C e umidade relativa (UR) ≥ 80% durante 14 dias. Após o crescimento das colônias, os conídios foram raspados das placas de cultivo e suspensos em água estéril contendo 0,01% (v/v) de monooleato de polioxietileno sorbitano (Tween® 80; Vetec Fine Chemicals Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). A suspensão foi homogeneizada e a concentração ajustada a 1×10^7 conídios mL^{-1} utilizando um hemocitômetro.

A viabilidade fúngica foi determinada por meio do plaqueamento de uma alíquota de 20 µL da suspensão previamente diluída para 1×10^5 conídios mL^{-1} em BDA, seguido de incubação a 25 ± 1 °C e UR ≥ 80%. Após 24 h, os conídios foram corados com azul de algodão e a germinação foi avaliada em microscópio óptico (400×) (ECLIPSE E200; Nikon, Tóquio, Japão). Os conídios foram considerados germinados quando os tubos germinativos estavam

visíveis. Os isolados fúngicos utilizados nos experimentos apresentaram viabilidade de pelo menos 95%.

3.3 Origem das estirpes bacterianas e cultivo em meio de cultura

Duas estirpes bacterianas foram utilizadas neste estudo: *Bradyrhizobium diazoefficiens* estirpe BR 85 (CPAC 7; SEMIA 5080) e *Bradyrhizobium japonicum* estirpe BR 86 (CPAC 15; SEMIA 5079). As estirpes foram originalmente isoladas em 1985 no município de Planaltina (15°36'15.2" S, 47°42'51.7" W), Distrito Federal, Brasil, no bioma Cerrado (Menna & Hungria, 2006; Siqueira *et al*., 2014). Ambas estão depositadas no Centro de Recursos Biológicos Johanna Döbereiner da Embrapa Agrobiologia (CRB-JD) (Seropédica, RJ, Brasil). As estirpes bacterianas foram cultivadas em meio sólido YMA (Yeast Mannitol Agar) suplementado com Vermelho Congo (VC) (25 mg L^{-1}) (YMA+VC), conforme descrito por Vincent (1970) (Anexo A; Figura 1A e 1B). O isolamento foi realizado por estriamento em placa utilizando o método de esgotamento por estrias. As placas de Petri foram incubadas a 30 ± 1 °C por um período de 12 dias.

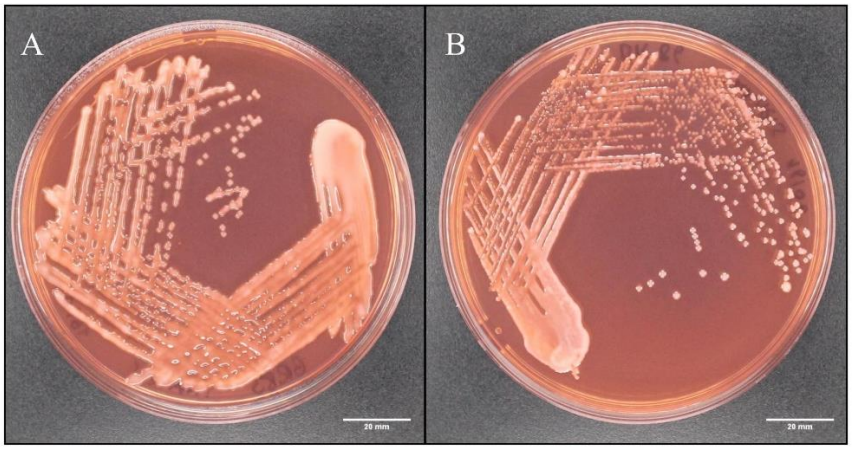


Figura 1 - Características morfológicas das estirpes *Bradyrhizobium diazoefficiens* BR 85 (A) e *Bradyrhizobium japonicum* BR 86 (B) em meio YMA+VC. Fonte: Autora (2026).

3.4 Teste de compatibilidade *in vitro* entre isolados de *Metarhizium* spp. e estirpes de *Bradyrhizobium* spp.

A interação entre os isolados fúngicos *M. anisopliae* LCM S04 e *M. brunneum* LCM S11 e as estirpes bacterianas *B. diazoefficiens* BR 85 e *B. japonicum* BR 86 foi avaliada por meio da técnica de confronto em cultura pareada em placas de Petri (Mariano, 1993), com pequenas adaptações (Fernandes *et al*., 2021). A compatibilidade foi determinada com base no crescimento radial dos fungos.

Colônias bacterianas, previamente cultivadas em meio YMA+VC, foram transferidas para placas contendo meio BDA utilizando alça de platina estéril. Primeiro, a bactéria foi inoculada desenhando um traçado contínuo sobre a superfície do meio, formando um arranjo quadrangular, de modo que o crescimento bacteriano permanecesse a aproximadamente 2 cm de distância do ponto central da placa Em seguida, 20 µL da suspensão fúngica foram adicionados ao centro. Dessa forma, ambos os microrganismos cresceram simultaneamente, permitindo a avaliação da interação entre eles.

Os tratamentos experimentais consistiram em: (I) LCM S04 (*M. anisopliae*) (controle); (II) LCM S04 + BR 85 (*B. diazoefficiens*); (III) LCM S04 + BR 86 (*B. japonicum*); (IV) LCM S11 (*M. brunneum*) (controle); (V) LCM S11 + BR 85; (VI) LCM S11 + BR 86. Placas contendo apenas os isolados fúngicos foram utilizadas como controle e mantidas nas mesmas condições experimentais. As placas foram incubadas em câmara de crescimento a 28 ± 1 °C e UR ≥ 80%, por 20 dias, período estimado para que as colônias fúngicas atingissem a borda das placas.

O crescimento radial foi avaliado aos 4, 7, 11, 13, 15, 18 e 20 dias após a incubação (DAI) por meio da mensuração do raio das colônias em dois eixos perpendiculares, utilizando uma régua milimetrada. A média das duas medições foi considerada representativa do crescimento radial. Para garantir a padronização das avaliações, as placas foram previamente identificadas e marcadas nos eixos vertical e horizontal, mantendo-se a mesma direção das medições ao longo do experimento. A compatibilidade entre os microrganismos foi determinada pela comparação do crescimento fúngico na presença e ausência das estirpes bacterianas.

O experimento foi conduzido em três ensaios independentes, utilizando-se novas suspensões conidiais e cultivos bacterianos a cada repetição. Placas que apresentaram sinais de contaminação foram descartadas, e registros fotográficos foram realizados em todos os dias de avaliação. Adotou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC), com seis repetições por tratamento, considerando-se cada placa de Petri como uma unidade experimental.

Os dados foram primeiramente submetidos aos testes de normalidade de distribuição e de homocedasticidade de variâncias, aplicando-se os testes de Shapiro-Wilk ($p < 0,05$) e de Bartlett ($p < 0,05$), respectivamente. Atestados tais pressupostos, aplicou-se a Análise de Variância (ANOVA) de dois fatores para a observação dos efeitos isolados e de interação. Em seguida, o Teste de Tukey ($p < 0,05$) foi utilizado para comparar os grupos em cada tempo de avaliação e a Análise de Regressão foi empregada para avaliar o comportamento dos grupos ao longo dos períodos de tempo estudados. Os modelos Linear ou Quadrático foram aplicados

considerando, conjuntamente, a significância estatística e o maior coeficiente de determinação (R^2). Todas as análises foram realizadas com o auxílio do software Prism GraphPad 10.4.

3.5 Seleção do lote de sementes de *Glycine max*

Para a condução dos experimentos, a Embrapa Agrobiologia disponibilizou três lotes de sementes de soja não tratadas quimicamente, correspondentes às cultivares Brasmax Olimpo IPRO, BRS 1064 e TMG 7362 IPRO, provenientes de safras anteriores e armazenados sob condições controladas em câmara fria. Os lotes foram submetidos ao beneficiamento, incluindo a remoção de impurezas físicas e o descarte de sementes danificadas ou deterioradas.

Antes da utilização nos experimentos, as sementes foram submetidas à desinfestação superficial por imersão em álcool 70% por dois minutos, seguida de imersão em solução de hipoclorito de sódio a 2% por dois minutos, e posteriormente lavadas oito vezes em água destilada estéril (Figura 2).

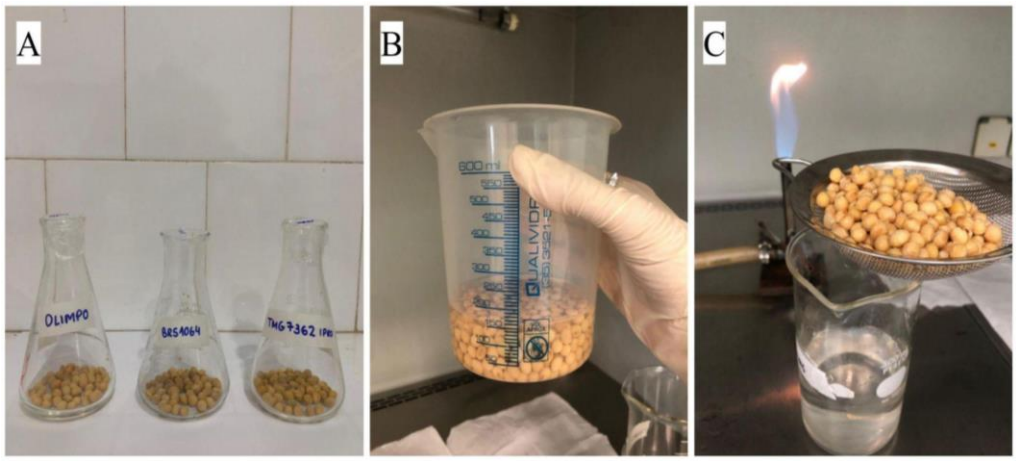


Figura 2 - Preparo e desinfestação superficial das sementes de soja. (A) Lotes das cultivares Brasmax Olimpo IPRO, BRS 1064 e TMG 7362 IPRO após beneficiamento; (B) Imersão das sementes nas soluções para desinfestação e (C) Lavagem das sementes em água destilada estéril. Fonte: Autora (2026).

A seleção da cultivar empregada nos experimentos foi baseada no desempenho fisiológico das sementes, avaliado por meio de teste de germinação. O ensaio foi conduzido pelo método “entre papel”, utilizando papel tipo Germitest® como substrato, conforme as recomendações estabelecidas nas Regras para Análise de Sementes (RAS) (Brasil, 2009) (Figura 3).

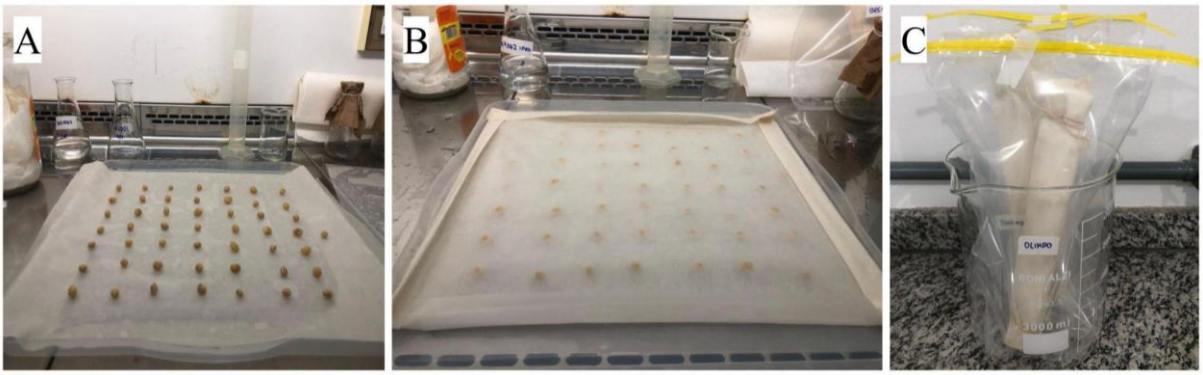


Figura 3 - Teste de germinação das sementes de soja conduzido em papel Germitest®. (A) Distribuição das sementes sobre o substrato; (B) Cobertura das sementes com papel umedecido e (C) Montagem dos rolos de papel para incubação. Fonte: Autora (2026).

3.6 Estabelecimento endofítico de *Metarhizium* spp. em plantas de soja

Foi conduzido um ensaio piloto em ambiente externo com o objetivo de avaliar o estabelecimento endofítico dos isolados fúngicos *M. anisopliae* LCM S04 e *M. brunneum* LCM S11 em plantas de soja (cultivar Brasmax Olimpo IPRO) cultivadas em vasos contendo o condicionador de solo Biomix (Cotia, SP, Brasil) esterilizado. Em cada vaso, foram semeadas seis sementes, sendo mantidas duas plantas após o desbaste. Foram utilizados três vasos por tratamento, com capacidade individual de 0,725 L. As suspensões conidiais foram preparadas nas concentrações de $1{,}0 \times 10^{6}$ e $1{,}0 \times 10^{7}$ conídios mL^{-1}, conforme descrito no item 3.2, sendo cada concentração aplicada aos vasos correspondentes aos respectivos tratamentos.

A inoculação foi realizada de forma combinada, envolvendo aplicação no colo da plântula e inoculação foliar. A aplicação no colo foi realizada com auxílio de ponteiras estéreis de 1000 µL, mediante a deposição de 1 mL da suspensão conidial próxima à base do caule de cada planta, aos 17 dias após semeadura (DAS), no estádio fenológico V1. Após sete dias (V2), procedeu-se à inoculação foliar por meio do pincelamento das suspensões fúngicas nas faces adaxial e abaxial das folhas, utilizando pincéis de cerda (Tigre® 815-12) (Figura 4).

Após a inoculação foliar, os vasos foram colocados por dois dias consecutivos em ambiente coberto, com incidência de luz solar indireta, visando favorecer a manutenção da umidade e o estabelecimento do inóculo. Posteriormente, foram transferidos novamente para a área externa e mantidos sob condições não controladas, com incidência direta de luz solar, chuva e variações de temperatura.

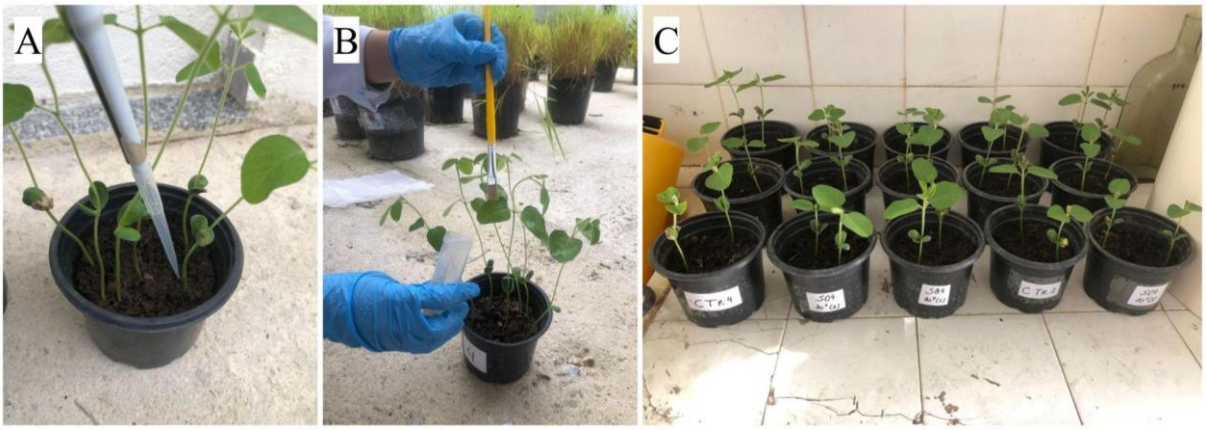


Figura 4 - Procedimentos de inoculação das suspensões fúngicas de LCM S04 e LCM S11. (A) Inoculação no colo das plântulas; (B) Inoculação por pincelamento na superfície foliar; (C) Vasos com soja em área coberta. Fonte: Autora (2026).

As plantas foram coletadas aos 31 DAS. As raízes foram lavadas em água corrente e, para o reisolamento fúngico, fragmentos de aproximadamente 0,5 cm de comprimento de raiz, caule e folhas foram coletados de três plantas por tratamento, selecionadas aleatoriamente, para a confirmação da colonização dos tecidos vegetais pelos isolados *M. anisopliae* LCM S04 e *M. brunneum* LCM S11 (Figura 5). Plantas não inoculadas, mantidas nas mesmas condições experimentais, foram utilizadas como controle negativo.

Os fragmentos foram esterilizados superficialmente conforme descrito por Parsa *et al.* (2013), imergindo-os em hipoclorito de sódio 0,5% por dois min, seguido de dois min em álcool 70% e dois min em água destilada estéril (3×). Em seguida, foram dispostos em meio de cultura CTC (BDA suplementado com cloranfenicol, tiabendazol e cicloheximida), seletivo para FE. As placas de Petri foram acondicionadas a 25°C ± 1°C, UR 80%, sendo avaliadas com 21 dias. A presença de *Metarhizium* spp. nos fragmentos vegetais foi confirmada pela detecção de colônias com morfologia característica.

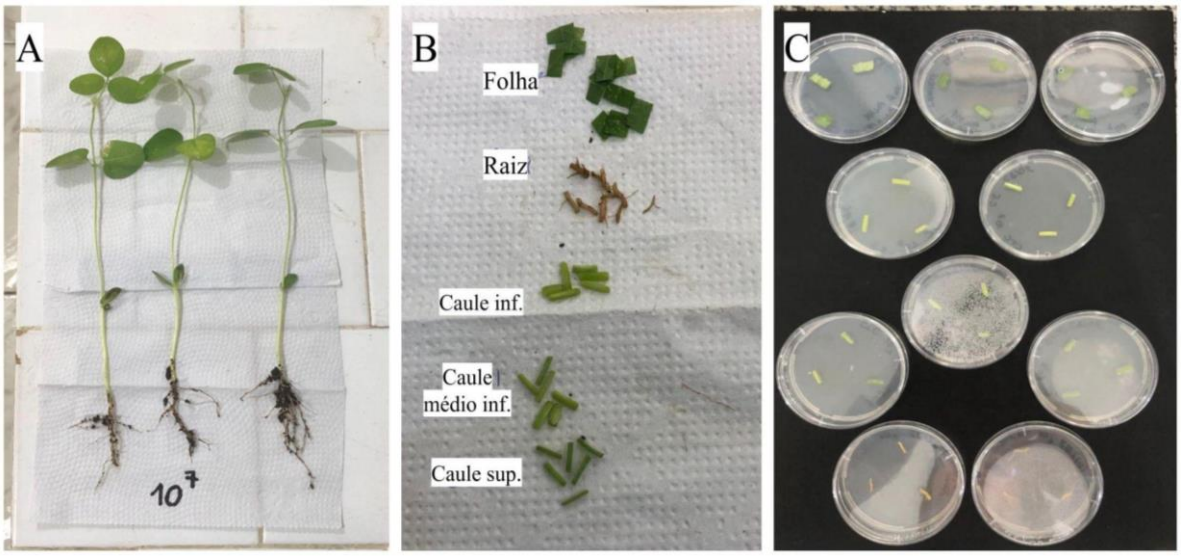


Figura 5 - Processamento de amostras e reisolamento fúngico para confirmação de colonização endofítica. (A) Plantas de soja coletadas; (B) Corte dos tecidos em fragmentos de folha, raiz e diferentes porções do caule (superior, médio inferior e inferior) e (C) Placas de Petri contendo meio de cultura CTC utilizadas para o reisolamento. Fonte: Autora (2026).

3.7 Experimento de inoculação em plantas

O experimento em casa de vegetação foi realizado para avaliar a associação da soja (cv. Brasmax Olimpo IPRO) com os isolados *M. anisopliae* LCM S04 e *M. brunneum* LCM S11, em combinação com *B. diazoefficiens* BR 85 e *B. japonicum* BR 86. O estudo avaliou os efeitos da inoculação sobre o desenvolvimento vegetativo, com avaliações realizadas aos 47 dias pós-inoculação (DPI), correspondendo ao estádio R1 (início do florescimento). Os estádios de desenvolvimento das plantas foram determinados conforme descrito por (Fehr & Caviness, 1977). A desinfestação superficial das sementes foi realizada por meio de imersão em etanol (70%) por 2 min, seguida de hipoclorito de sódio (2%) por dois min e, finalmente, oito lavagens sucessivas com água destilada estéril antes da inoculação.

3.7.1 Preparo dos inoculantes bacterianos

Os inoculantes das estirpes *B. diazoefficiens* BR 85 e *B. japonicum* BR 86 foram previamente cultivados em meio sólido YMA+VC e, posteriormente, colônias foram transferidas para tubos de ensaio contendo 5 mL de meio líquido BP (Anexo B; Scheidt *et al.*, 2020). Os cultivos foram incubados em agitador orbital (shaker) a 30 ± 1 °C e 150 rpm por 72 h (Labinfarma Scientific). Após esse período, o conteúdo de cada tubo foi transferido para frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 50 mL do mesmo meio, sendo novamente incubado sob as mesmas condições por 48 h. Em seguida, uma alíquota de 25 mL de cada cultura foi

inoculada em frascos Erlenmeyer de 1000 mL contendo 250 mL de meio BP, mantendo-se a temperatura e a agitação por mais 48 h.

O crescimento bacteriano foi monitorado por leituras de densidade óptica a 600 nm (DO_{600}), utilizando espectrofotômetro UV-visível (Global Analyzer), sendo os cultivos empregados somente após atingirem $DO_{600} \geq 1,0$. Em cada etapa de escalonamento, alíquotas foram plaqueadas em meio YMA+VC para a verificação da pureza do inóculo. Todo o procedimento foi conduzido em cabine de segurança biológica, utilizando materiais esterilizados e sob condições assépticas.

O preparo e a avaliação dos inoculantes líquidos seguiram as recomendações da Instrução Normativa SDA/MAPA nº 30, de 12 de novembro de 2010 (Brasil, 2010), que estabelece os métodos oficiais para análise de inoculantes quanto à contagem, identificação e pureza microbiológica, bem como a concentração mínima de $1,0 \times 10^9$ unidades formadoras de colônia (UFC) por mililitro de produto para inoculantes contendo bactérias fixadoras de nitrogênio simbióticas.

3.7.2 Quantificação de unidades formadoras de colônia (UFC) de *Bradyrhizobium* spp.

Para a determinação da concentração de células viáveis, as amostras de inoculante foram inicialmente homogeneizadas vigorosamente e, em seguida, submetidas à diluição seriada em solução salina estéril (0,85%). Para isso, 100 µL de cada inoculante foram transferidos para microtubos contendo 900 µL do diluente, obtendo-se a diluição 10^{-1}. A partir desta, foram preparadas diluições sucessivas até 10^{-7}, mediante transferências sequenciais de 100 µL entre microtubos contendo 900 µL de solução salina, com homogeneização em agitador tipo vortex (Genie 2) por aproximadamente 20 s entre cada etapa.

A quantificação das células viáveis foi realizada pelo método de plaqueamento por espalhamento em superfície. Alíquotas de 100 µL das diluições 10^{-5}, 10^{-6} e 10^{-7} foram plaqueadas em triplicata em placas de Petri contendo meio YMA+VC, sendo o inóculo distribuído uniformemente sobre a superfície do meio com auxílio de alça de Drigalski previamente esterilizada. Após o espalhamento, as placas foram identificadas, vedadas, invertidas e incubadas a 30 ± 1 °C.

As avaliações foram realizadas após cinco a sete dias de incubação, selecionando-se para contagem as placas que apresentaram entre 30 e 300 colônias. Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC mL^{-1}) de inoculante.

O cálculo da concentração bacteriana foi realizado utilizando a expressão: UFC mL^{-1} = f × N, em que f corresponde ao fator de diluição (recíproca da diluição na placa multiplicada

por dez, no caso de inoculação de 0,1 mL) e **N** representa o número médio de colônias obtido nas três placas da diluição selecionada (Tabela 1).

Tabela 1: Fatores de diluição utilizados para o cálculo da concentração de unidades formadoras de colônia (UFC mL^{-1}) do inoculante

Diluição	Fator (f)	Nº de células/g ou mL de inoculante
10^{-5}	10^{6}	$N \times 10^{6}$
10^{-6}	10^{7}	$N \times 10^{7}$
10^{-7}	10^{8}	$N \times 10^{8}$

3.7.3 Montagem e condução do experimento em casa de vegetação

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, sob condições estéreis, no período de setembro a novembro de 2025. O delineamento experimental adotado foi o de blocos casualizados (DBC), composto por dez tratamentos e sete repetições, totalizando 70 unidades experimentais (vasos). Inicialmente, foram semeadas oito sementes por vaso, e aos 10 DAS (estádios VE-VC, emergência à expansão dos cotilédones), realizou-se o desbaste onde foram mantidas duas plântulas por vaso.

No momento da avaliação, ambas as plantas de cada vaso foram analisadas individualmente para todas as variáveis mensuradas, resultando em um total de 140 observações de plantas. No entanto, como o vaso foi considerado a unidade experimental, foi realizada a média dos valores obtidos das duas plantas dentro de cada vaso, e esses valores médios foram utilizados para todas as análises estatísticas (n = 7 vasos por tratamento).

Vasos de jardinagem (3 L) foram utilizados como unidades experimentais. Os vasos foram previamente lavados e revestidos internamente com sacos plásticos resistentes (30 × 40 cm), os quais foram desinfestados superficialmente com etanol 70% (v/v). Os vasos foram preenchidos com uma mistura esterilizada e homogeneizada de brita e vermiculita (1:1, v:v) utilizada como substrato. No centro de cada vaso, foi inserido um tubo de policloreto de vinila (PVC) de 20 cm de comprimento, vedado na extremidade superior com uma tampa tipo Falcon, utilizado como sistema de irrigação e fertirrigação. Os tratamentos experimentais consistiram em: (I) controle (CTR); (II) controle nitrogenado (NIT); (III) BR 85 (*B. diazoefficiens*); (IV) BR 86 (*B. japonicum*); (V) LCM S04 (*M. anisopliae*); (VI) LCM S11 (*M. brunneum*); (VII) LCM S04 + BR 85; (VIII) LCM S04 + BR 86; (IX) LCM S11 + BR 85 e (X) LCM S11 + BR 86.

A irrigação foi realizada aplicando-se 60 mL de água estéril a cada três dias, ou conforme a necessidade hídrica das plantas, bem como a aplicação da solução nutritiva CRS - Centre for *Rhizobium* Studies (Tabela 2) (Anexo C).

Tabela 2: Cronograma de adição da solução nutritiva CRS

Dias	+19	+24	+26	+29	+33	+35	+38	+40
Todos os tratamentos	40 mL	40 mL	40 mL	60 mL	60 mL	60 mL	80 mL	80 mL

Os dias indicados com sinal de adição (+) referem-se ao número de dias pós-inoculação (DPI).

Para o tratamento NIT, a adubação nitrogenada (NH_4NO_3, 35% de N; Química Moderna, São Paulo, Brasil) foi previamente diluída em água destilada estéril e aplicada em sete parcelas de 0,6 g por vaso aos 19, 26, 28, 31, 35, 38 e 42 DPI via tubo de PVC para a distribuição da solução. O procedimento experimental foi conduzido conforme metodologia descrita por Yates *et al*. (2016).

As suspensões fúngicas (10^7 conídios mL^{-1}) e os inoculantes bacterianos foram preparadas conforme descrito nos itens 3.2 e 3.7.1, respectivamente. A inoculação foi realizada aplicando-se 1 mL de cultura bacteriana por semente nos tratamentos contendo rizóbio + 1 mL de suspensão fúngica nos tratamentos com *Metarhizium* e 1 mL de solução de Tween 80 (0,01%) nos tratamentos controle e nitrogenado (Figura 6). Para padronizar o volume entre os tratamentos, aqueles que receberam apenas o inóculo individual (bacteriano ou fúngico, bem como os controles) receberam adicionalmente 1 mL de Tween 80 (0,01%), resultando em um volume final de 2 mL por semente em todos os tratamentos. Considerando que foram semeadas 8 sementes por unidade experimental, o volume total aplicado correspondeu a 16 mL.

As sementes foram cobertas com uma fina camada de areia lavada previamente esterilizada. As plantas foram irrigadas manualmente a cada dois ou três dias, conforme a necessidade, e armadilhas entomológicas foram mantidas no ambiente.

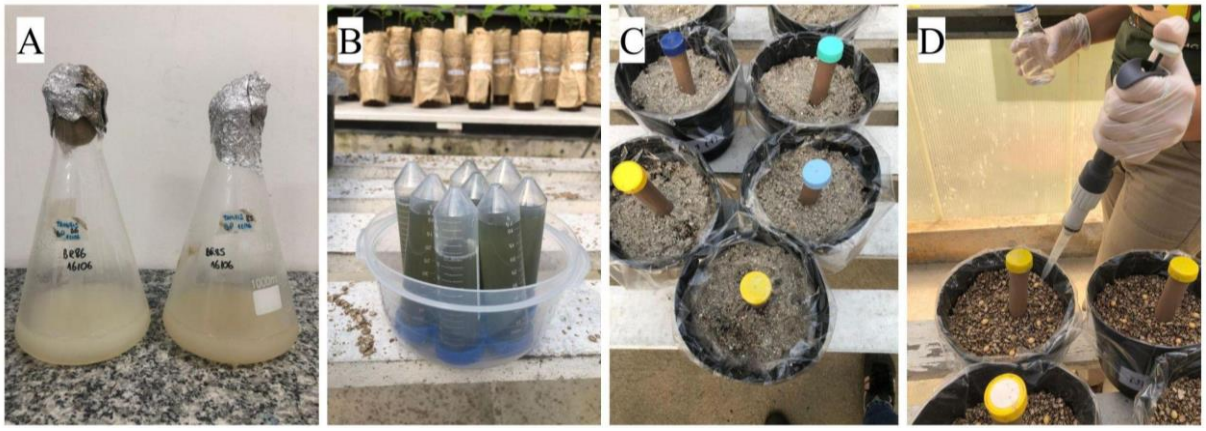


Figura 6 - Procedimentos metodológicos em experimento de soja submetida à inoculação de *Bradyrhizobium* spp. e *Metarhizium* spp. (A) Cultivo líquido das estirpes *Bradyrhizobium diazoefficiens* BR 85 e *Bradyrhizobium japonicum* BR 86; (B) Suspensões fúngicas de *Metarhizium anisopliae* LCM S04 e *Metarhizium brunneum* LCM S11; (C) Vasos do experimento revestidos com plástico e preenchidos com substrato e (D) Inoculação das suspensões após semeadura. Fonte: Autora (2026).

Aos 47 DPI (estádio R1, início da floração), as plantas foram colhidas e separadas em raízes e parte aérea por meio de um corte a aproximadamente 1 cm acima do nível do solo. As raízes foram cuidadosamente lavadas com auxílio de uma peneira em água corrente para a remoção do substrato aderido e evitar a perda de nódulos. Depois foram preservadas em sacos plásticos de 30 × 40 cm contendo uma solução de etanol 50% (v/v) para manter a integridade estrutural até a análise morfológica (Figura 7).

3.7.4 Avaliação de parâmetros vegetais

As seguintes variáveis foram avaliadas: altura de planta (cm), número de ramos (NR) e de folhas (NF), massa seca da parte aérea (MSPA; mg planta^{-1}), número de nódulos (NN), massa seca de nódulos (MSN; mg planta^{-1}) e massa seca de raízes (MSR; mg planta^{-1}).

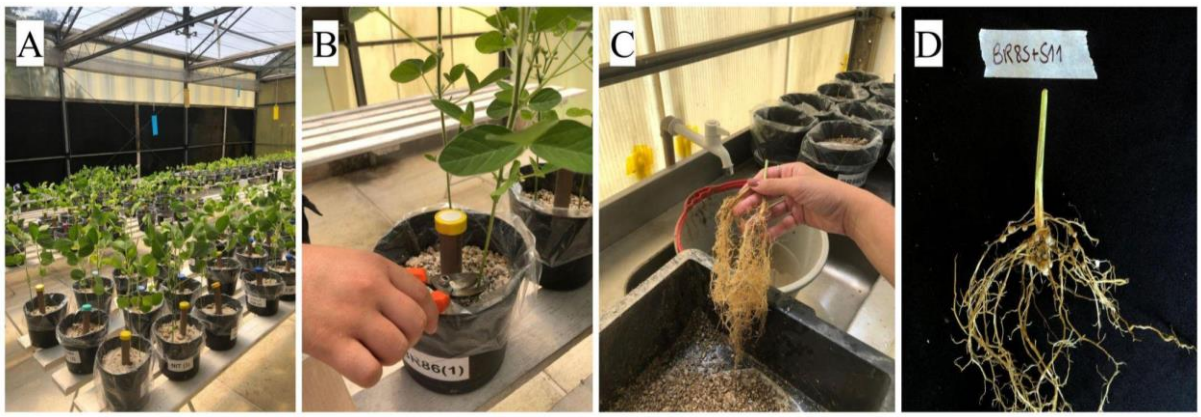


Figura 7 - Experimento em casa de vegetação para avaliação do desenvolvimento da cultura da soja. (A) Plantas durante a condução do experimento; (B) corte da parte aérea no momento da coleta; (C) lavagem das raízes para remoção do substrato e (D) nódulos radiculares sob inoculação consorciada. Fonte: Autora (2026).

A altura das plantas foi medida da base até a extremidade da última folha verdadeira. Os nódulos radiculares foram destacados manualmente e quantificados. A parte aérea, as raízes e os nódulos foram acondicionados separadamente em sacos de papel pardo devidamente identificados e submetidos à secagem em estufa de ventilação forçada a 60 °C por sete dias. Após esse período, o material seco foi pesado para determinação da massa seca.

Os dados foram primeiramente submetidos aos testes de normalidade dos resíduos e de homogeneidade de variâncias, aplicando os testes de Shapiro Wilk ($p < 0,05$) e de Bartlett ($p < 0,05$), respectivamente. As variáveis NR, NN e MSN foram submetidas à transformação log ($x + 0,5$) para atender às pressuposições da análise de variância. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey para a comparação das médias, adotando-se nível de significância de 5%. Todas as análises foram realizadas no software R (versão 4.2.2; R Core Team, 2024), no ambiente RStudio (versão 2025.05.0; Posit Team), utilizando o pacote ExpDes (Ferreira *et al*., 2014).

3.7.5 Processamento das amostras de raízes

A morfologia do sistema radicular foi avaliada seguindo metodologia previamente descrita (Tavares, 2014), com um total de 140 amostras de raízes analisadas. As raízes foram dispostas uniformemente em uma fina camada de água em uma bandeja de acrílico transparente (30 cm x 20 cm). A digitalização das plantas foi realizada a 600 dpi (*dots per inch*) utilizando um *scanner* Epson Expression 10000XL equipado com uma unidade de iluminação adicional (ALU) (Tavares *et al*., 2021). As imagens das raízes foram convertidas para o formato em escala de cinza de 8 bits para processamento. Cada imagem foi analisada individualmente utilizando o *software* WinRHIZO Arabidopsis 2012b (Régent Instruments, Quebec City, Canada Inc.) para a análise das características radiculares e sua quantificação (Arsenault *et al*., 1995).

Foram analisados e quantificados diferentes parâmetros radiculares: número total de raízes (NTR), cruzamentos e bifurcações, comprimento radicular (mm), área de superfície radicular (mm^2), diâmetro radicular (mm) e volume radicular (mm^3). Também foi definido e medido o número de pontas dentro das classes de raízes mediante classificação quanto ao diâmetro, sendo: finas ($1,5 < d < 3,0$ mm), médias ($3,0 < d < 4,5$ mm) e grossas ($d > 4,5$ mm).

As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade utilizando o software Sisvar. Os gráficos foram elaborados pelo software SigmaPlot.

3.7.6 Recuperação fúngica e identificação qualitativa de *Metarhizium* spp. a partir do substrato

Ao final do experimento em casa de vegetação (47 DPI), amostras de substrato foram coletadas dos vasos inoculados com *Metarhizium* para verificar a ocorrência dos fungos. Para os tratamentos controle, fertilizado com nitrogênio ou inoculados apenas com *Bradyrhizobium*, amostras foram coletadas aleatoriamente como controles negativos para confirmar a ausência de *Metarhizium* spp. O substrato foi coletado utilizando uma espátula estéril em três pontos distintos de cada vaso e homogeneizado para formar uma amostra composta.

Alíquotas de 0,35 g de cada amostra composta foram transferidas para microtubos de 1,5 mL contendo 1 mL de água destilada estéril suplementada com Tween 80® a 0,01%. As suspensões foram homogeneizadas em agitador do tipo vortex por 1 min. Posteriormente, alíquotas de 50 µL da suspensão foram semeadas em meio de cultura seletivo CTC e espalhadas uniformemente com o auxílio de uma alça de Drigalski estéril (Figura 8) (Fernandes *et al*., 2010).

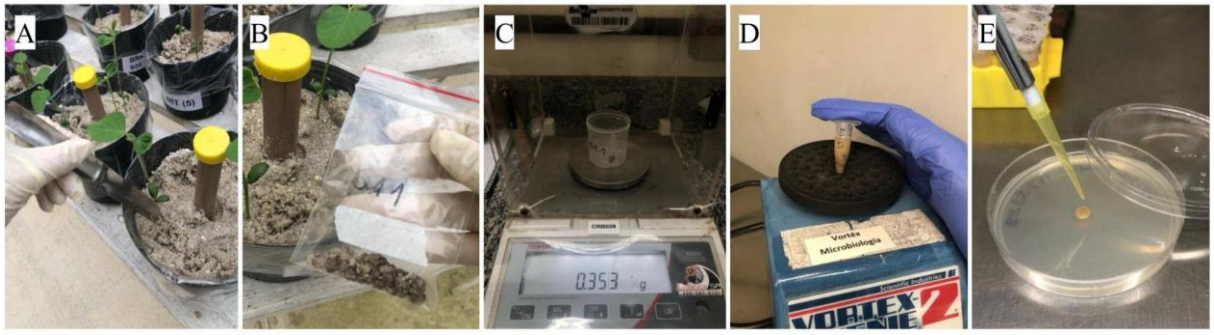


Figura 8 - Coleta de substrato para confirmação de *M. anisopliae* e *M. brunneum* aos 47 DPI. (A) Coleta com auxílio de espátula estéril; (B) Amostra identificada e homogeneizada; (C) Pesagem das amostras; (D) Agitação da amostra em vortex e (E) Plaqueamento das amostras em placas com meio de cultura CTC. Fonte: Autora (2026).

As placas foram incubadas em câmara de crescimento a 25 ± 1 °C e UR de 80%, com avaliações realizadas entre 4 e 14 DAS. A presença de *Metarhizium* spp. no substrato foi confirmada pela detecção de colônias com morfologia característica, demonstrando se os inoculantes fúngicos permaneceram recuperáveis ao longo do período experimental.

4 RESULTADOS

4.1. Teste de compatibilidade *in vitro* entre isolados de *Metarhizium* spp. e estirpes de *Bradyrhizobium* spp.

As interações *in vitro* entre os isolados fúngicos LCM S04 (*M. anisopliae*) e as estirpes bacterianas *B. diazoefficiens* BR 85 e *B. japonicum* BR 86 não apresentaram inibição durante todo o período de incubação avaliado (4–20 dias) (Figura 9). Nas condições experimentais avaliadas, o crescimento radial das colônias ocorreu de forma contínua, mesmo na presença das bactérias, sem evidências visuais de antagonismo direto.

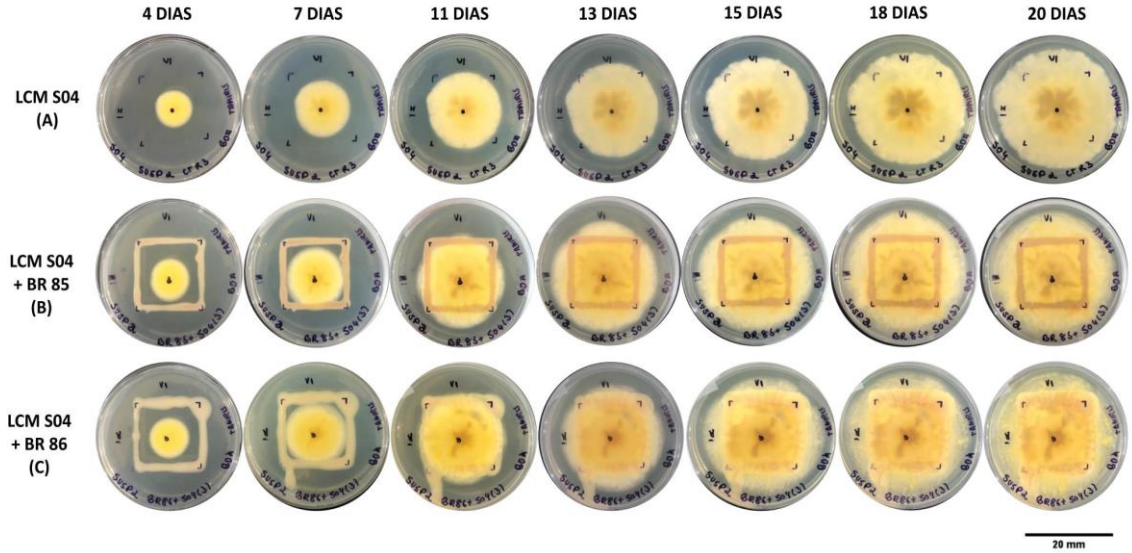


Figura 9 – Teste de compatibilidade *in vitro* do isolado LCM S04 (*Metarhizium anisopliae*) em cultivo pareado com as estirpes BR 85 (*Bradyrhizobium diazoefficiens*) e BR 86 (*Bradyrhizobium japonicum*) ao longo do período de incubação. A linha (A) corresponde ao controle (S04); a linha (B) ao tratamento S04 + BR 85; e a linha (C) ao tratamento S04 + BR 86. Fonte: Elaboração própria (2026).

A análise de regressão evidenciou efeito do tempo sobre o crescimento radial das colônias. Verificou-se ajuste quadrático para todos os tratamentos, caracterizado por aumento inicial do crescimento seguido de redução na taxa de expansão radial nas avaliações finais (Figura 10), quando o crescimento fúngico se aproximou do limite físico da placa, condição típica de sistemas fechados, associada à limitação fisiológica e à restrição de espaço e nutrientes no meio de cultivo.

Diferenças significativas entre os tratamentos foram verificadas em todos os tempos de avaliação (4, 7, 11, 13, 15, 18 e 20 dias), demonstrando influência positiva das estirpes bacterianas sobre o crescimento radial do fungo ao longo do período experimental.

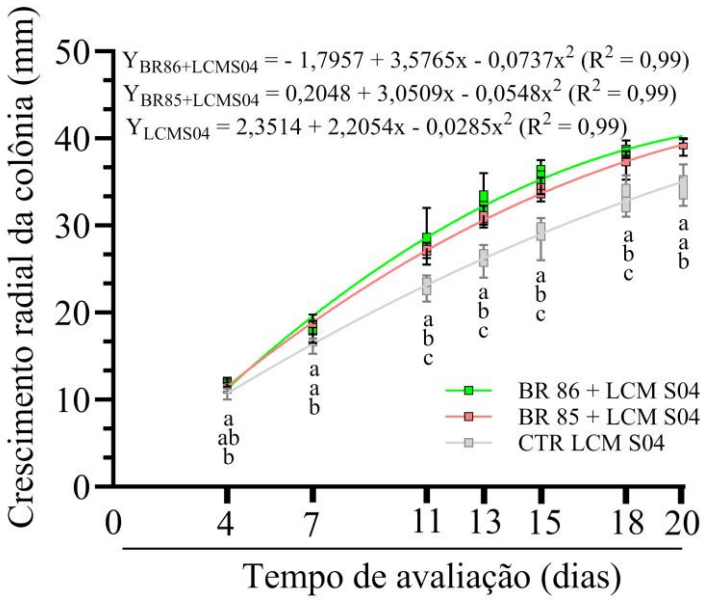


Figura 10 – Crescimento radial do isolado LCM S04 (*Metarhizium anisopliae*) em cultivo pareado com as estirpes BR 85 (*Bradyrhizobium diazoefficiens*) e BR 86 (*Bradyrhizobium japonicum*), avaliado aos 4, 7, 11, 13, 15, 18 e 20 DAI.

O isolado LCM S04, quando em conjunto com ambas as bactérias, teve crescimento maior do que o LCM S04 sozinho (Tabela 3). Aos 4 dias, o tratamento S04 + BR 86 apresentou maior crescimento radial, enquanto S04 + BR85 apresentou valores intermediários em relação ao controle. Já, aos 7 dias, os tratamentos consorciados mantiveram maiores valores de crescimento em comparação ao cultivo isolado do fungo, sem diferença estatística entre as bactérias.

A partir do 11º dia, as diferenças entre os tratamentos tornaram-se mais pronunciadas, com os consórcios apresentando maiores valores de raio da colônia em relação ao controle, padrão que se manteve nas avaliações de 13 e 15 dias. Nas avaliações finais (18 e 20 dias), observou-se desaceleração do crescimento em todos os tratamentos, chegando ao limite da placa, conforme descrito pelo modelo quadrático ajustado, embora as diferenças estatísticas entre os grupos tenham sido mantidas.

As equações de regressão apresentaram elevado coeficiente de determinação ($R^2 = 0,99$) para todos os tratamentos, indicando adequado ajuste do modelo quadrático aos dados experimentais.

Tabela 3 – Média seguida de erro padrão do raio (mm) da colônia do isolado LCM S04 (*Metarhizium anisopliae*) cultivado com as estirpes BR 85 (*Bradyrhizobium diazoefficiens*) e BR 86 (*Bradyrhizobium japonicum*) ao longo do período de incubação.

	Tempo de Avaliação (dias)								
Tratamentos	4	7	11	13	15	18	20	Equação	R^2
LCM S04 CTR	10,80 ± 0,35 b	16,33 ± 0,51 b	23,02 ± 1,24 c	26,18 ± 1,24 c	29,05 ± 1,52 c	35,23 ± 1,68 c	34,77 ± 1,68 b	$y = 2,3514 + 2,2054x – 0,0285x^2$	0,99
LCM S04 +BR86	12,16 ± 0,40 a	18,25 ± 1,08 a	28,36 ± 1,64 a	32,80 ± 1,81 a	35,89 ± 1,32 a	38,78 ± 0,70 a	39,84 ± 0,35 a	$y = - 1,7957 + 3,5765x – 0,0737x^2$	0,99
LCM S04 +BR85	11,86 ± 0,32 ab	18,36 ± 0,48 a	27,00 ± 0,77 b	30,69 ± 0,84 b	34,08 ± 0,93 b	37,38 ± 0,89 b	39,13 ± 0,64 a	$y = 0,2048 + 3,0509x – 0,0548x^2$	0,99

Médias seguidas de mesma letra em cada tempo de avaliação (coluna) não diferem entre si pelo teste de Tukey (p>0,05)

De maneira semelhante, não foi observada formação de halo de inibição nas interações entre o isolado fúngico LCM S11 e as estirpes bacterianas BR 85 e BR 86 ao longo das avaliações (Figura 11). O crescimento radial do fungo manteve-se contínuo nos tratamentos consorciados, indicando compatibilidade *in vitro* entre os isolados fúngicos e as estirpes bacterianas.

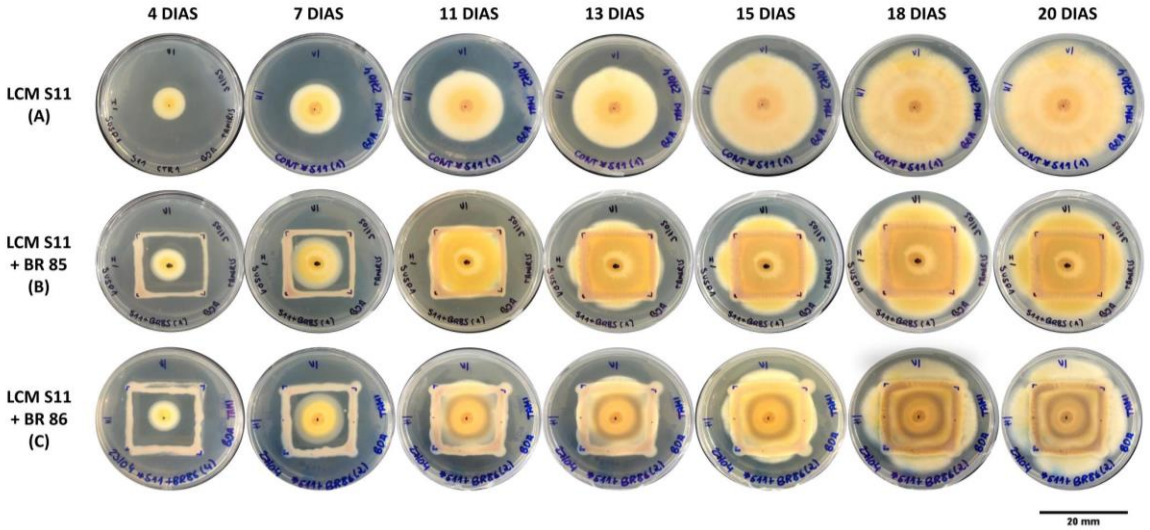


Figura 11 – Teste de compatibilidade *in vitro* do isolado LCM S11 (*Metarhizium brunneum*) em cultivo pareado com as estirpes BR 85 (*Bradyrhizobium diazoefficiens*) e BR 86 (*Bradyrhizobium japonicum*) ao longo do período de incubação. A linha (A) corresponde ao controle (S11); a linha (B) ao tratamento S11 + BR 85; e a linha (C) ao tratamento S11 + BR 86. Fonte: Elaboração própria (2026).

Observou-se aumento progressivo do raio das colônias fúngicas em todos os tratamentos ao longo das avaliações, caracterizando efeito linear significativo do tempo sobre o crescimento radial (Figura 12).

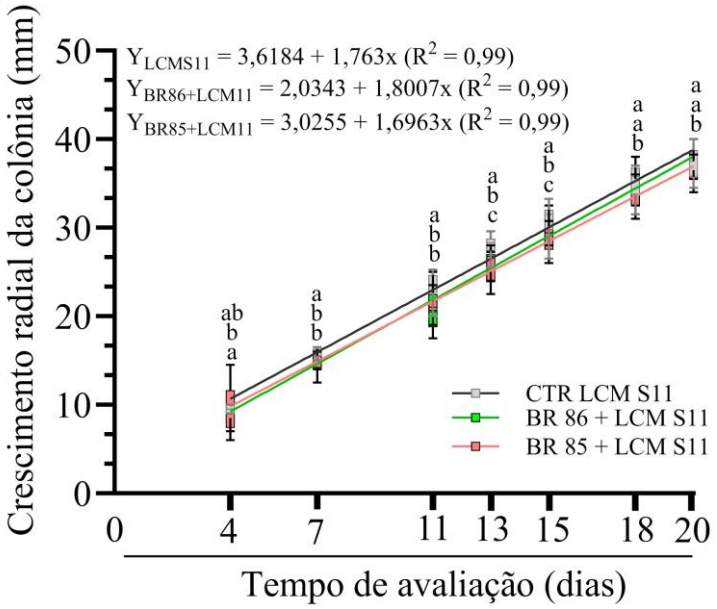


Figura 12 – Crescimento radial do isolado LCM S11 (*Metarhizium brunneum*) em cultivo pareado com as estirpes BR 85 (*Bradyrhizobium diazoefficiens*) e BR 86 (*Bradyrhizobium japonicum*), avaliado aos 4, 7, 11, 13, 15, 18 e 20 DAI.

Na comparação do crescimento radial entre os tratamentos dentro de cada tempo de avaliação, verificaram-se diferenças significativas em todos os períodos analisados (4, 7, 11, 13, 15, 18 e 20 dias). Nos dias 7, 11, 13 e 15, o controle (S11 CTR) apresentou maiores valores médios de raio, diferindo-se estatisticamente dos tratamentos consorciados com bactérias.

Os tratamentos S11 + BR85 e S11 + BR86 apresentaram valores inferiores de crescimento em relação ao controle ao longo de todo o período experimental. Entre os consórcios, observaram-se variações nas médias de crescimento ao longo das avaliações, mantendo-se, contudo, o mesmo agrupamento estatístico em cada tempo avaliado. Ainda assim, não foi observada inibição de crescimento.

As equações de regressão ajustadas para todos os tratamentos apresentaram elevado coeficiente de determinação (R^2 = 0,99), confirmando o comportamento linear do crescimento radial do isolado LCM S11 ao longo do tempo de incubação (Tabela 4).

Tabela 4 – Média e erro padrão do teste de compatibilidade *in vitro* do isolado LCM S11 (*Metarhizium brunneum*) em confronto com as estirpes BR 85 (*Bradyrhizobium diazoefficiens*) e BR 86 (*Bradyrhizobium japonicum*) ao longo do período de incubação.

	Tempo de Avaliação (dias)								
Tratamentos	4	7	11	13	15	18	20	Equação	R^2
LCM S11 CTR	9,50 ± 0,42 ab	15,90 ± 0,49 a	23,55 ± 1,51 a	28,03 ± 1,26 a	30,97 ± 1,95 a	35,18 ± 1,86 a	37,34 ± 1,76 a	y = 3,6184 + 1,763x	0,99
LCM S11 +BR86	9,15 ± 1,01 b	15,04 ± 0,85 b	20,65 ± 1,97 c	25,85 ± 1,11 b	29,65 ± 1,37 b	34,94 ± 1,55 a	37,42 ± 1,31 a	y = 2,0343 + 1,8007x	0,99
LCM S11 +BR85	9,88 ± 2,80 a	14,80 ± 1,12 b	21,31 ± 1,61 b	25,20 ± 1,66 c	28,84 ± 1,72 c	34,03 ± 1,84 b	36,40 ± 1,36 b	y = 3,0255 + 1,6963x	0,99

Médias seguidas de mesma letra em cada tempo de avaliação (coluna) não diferem entre si pelo teste de Tukey (p>0,05)

4.2 Seleção do lote de sementes

A cultivar de soja escolhida foi a Brasmax Olimpo IPRO por ter apresentado a melhor taxa de germinação (88%) dos testes realizados em papel Germitest. Os outros lotes testados apresentaram taxas inferiores a 55%, não sendo recomendadas para as etapas posteriores.

4.3 Estabelecimento endofítico de *Metarhizium* spp. em plantas de soja

A eficiência do processo de desinfestação superficial foi inicialmente confirmada pela ausência completa de crescimento de *Metarhizium* spp. nos tecidos provenientes do grupo controle, demonstrando que o protocolo eliminou com sucesso os microrganismos epífitos e que não houve contaminação cruzada (Figura 13).

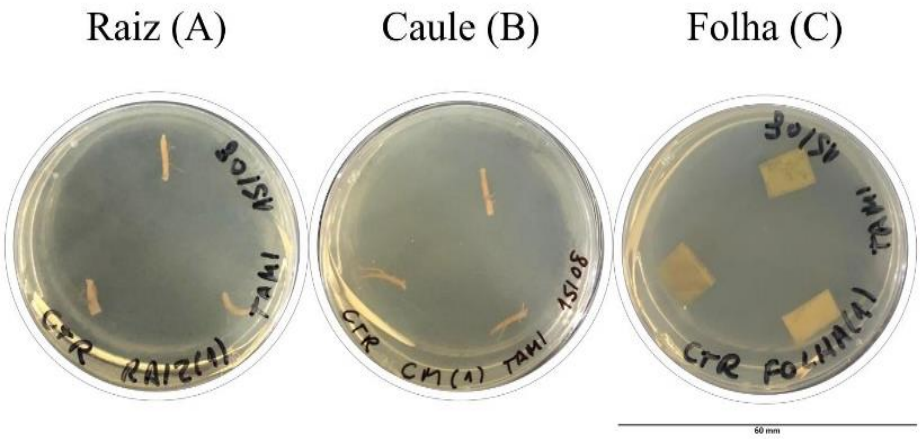


Figura 13 – Fragmentos de raiz (A), caule (B) e folha (C) de plantas de *Glycine max* do grupo controle, não tratado com suspensão fúngica. Os fragmentos foram cultivados em meio de cultura seletivo CTC por 21 dias. Fonte: Elaboração própria (2026).

A capacidade de colonização endofítica dos isolados fúngicos foi confirmada por meio

do reisolamento a partir de fragmentos de raiz, caule e folha de soja. Ambos os isolados, *M. anisopliae* LCM S04 (Figura 14) e *M. brunneum* LCM S11 (Figura 15), foram recuperados com sucesso em meio seletivo CTC a partir dos tecidos vegetais avaliados nas duas concentrações testadas. As colônias fúngicas emergentes dos fragmentos apresentaram características morfológicas típicas às das culturas originais.

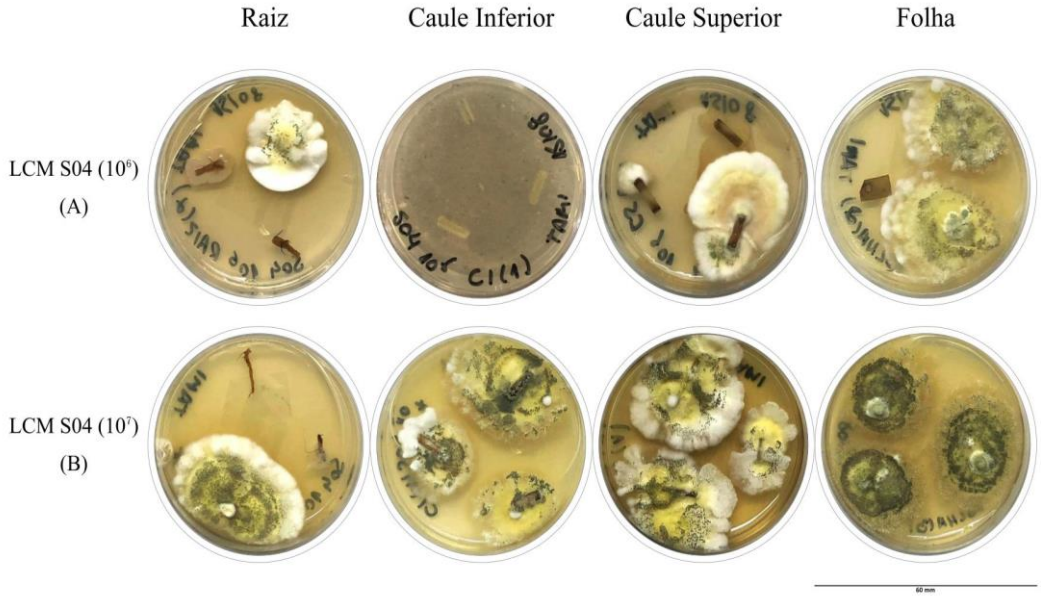


Figura 14 – Crescimento de colônias do isolado LCM S04 (*Metarhizium anisopliae)* obtidas a partir de fragmentos de raiz, caule e folha de plantas de *Glycine max* inoculadas com suspensão fúngica nas concentrações 10^6 (A) e 10^7 (B). Os fragmentos foram cultivados em meio de cultura seletivo CTC por 21 dias. Fonte: Elaboração própria (2026).

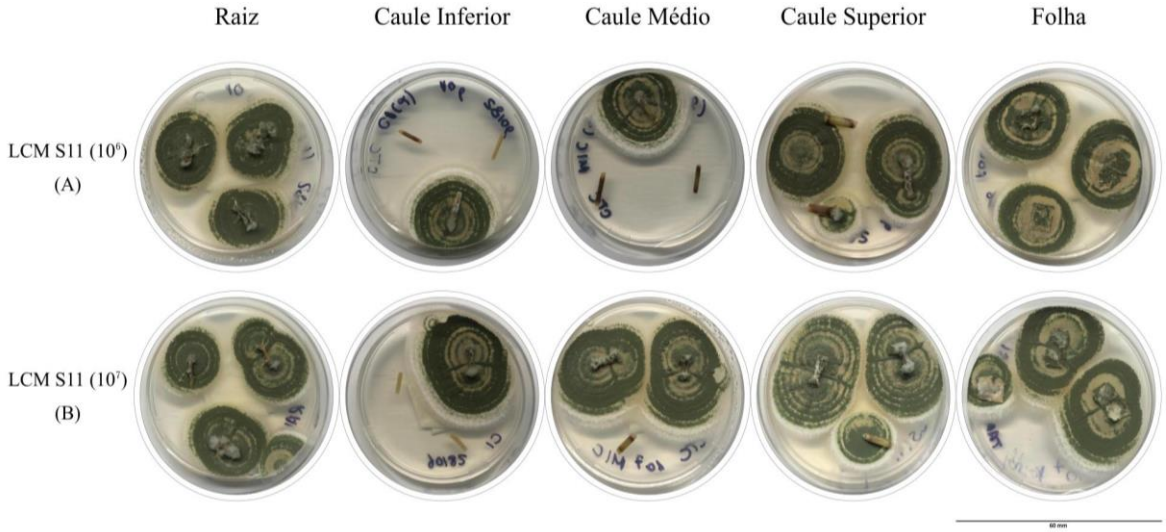


Figura 15. Crescimento de colônias do isolado LCM S11 (*Metarhizium brunneum)* obtidas a partir de fragmentos de raiz, caule e folha de plantas de *Glycine max* inoculadas com suspensão fúngica nas concentrações 10^6 (A) e 10^7 (B). Os fragmentos foram cultivados em meio de cultura seletivo CTC por 21 dias. Fonte: Elaboração própria (2026).

4.4 Experimento em Casa de Vegetação

4.4.1 Crescimento e desenvolvimento da soja

A altura das plantas, o número de folhas, a emissão de ramos e a matéria seca da parte aérea foram utilizados como indicadores do vigor geral das plantas e do desenvolvimento vegetativo (Figura 16).



Figura 16 - Registro fotográfico das plantas coletadas aos 47 dias após inoculação. Fonte: Autora (2026).

Em todas essas variáveis, os tratamentos contendo *Bradyrhizobium*, isoladamente ou em combinação com *Metarhizium*, geralmente mostraram um desempenho superior em comparação com os controles não inoculados e apenas com fungos (Figura 17).

A altura das plantas foi significativamente maior quando coinoculadas em comparação com os tratamentos controle (CTR) e controle com adição de nitrogênio (NIT) (Figura 17B). O maior incremento foi encontrado no tratamento BR 85 + LCM S04 (46,96 ± 0,69 cm), diferindo significativamente dos demais tratamentos, com exceção de BR 85 (43,75 ± 1,03 cm), BR 86 + LCM S04 (43,50 ± 1,01 cm) e BR 85 + LCM S11 (43,86 ± 1,06 cm). As estirpes de *Bradyrhizobium* BR 85 e BR 86 (41,78 ± 0,87 cm), quando aplicadas isoladamente, também aumentaram a altura das plantas, demonstrando melhor desempenho do que o CTR (25,85 ± 1,17 cm) e o NIT (37,43 ± 1,44 cm). No geral, a estirpe BR 85 foi superior à BR 86, tanto isoladamente quanto em coinoculação com os fungos. A altura das plantas nos tratamentos isolados com os fungos LCM S04 (27,03 ± 0,84 cm) e LCM S11 (26,35 ± 0,61 cm) não diferiu do CTR. Além disso, os tratamentos com fungos isolados não apresentaram diferenças entre si ($p \leq 0,05$).

A coinoculação BR 85 + LCM S04 exibiu o maior número de folhas (6,93 ± 0,37) (Figura 17C), diferindo do tratamento com BR 85 isolado (5,86 ± 0,14) e da coinoculação BR

86 + LCM S11 (6,00 ± 0,19). A presença de *Bradyrhizobium* spp., isoladamente ou em coinoculação, duplicou o número de folhas em comparação ao CTR (3,29 ± 0,10) e aos tratamentos com LCM S04 (3,21 ± 0,10) e LCM S11 (3,57 ± 0,17). Ambos os isolados LCM S04 e LCM S11 não diferiram quando comparados ao CTR. Além disso, os tratamentos bacterianos isolados não diferiram dos tratamentos coinoculados.

A emissão de ramos foi significativamente influenciada pela presença de fontes de nitrogênio (Figura 17E). Os tratamentos envolvendo coinoculação, aplicação única de *Bradyrhizobium* ou NIT superaram o CTR (0,00) e os grupos com *Metarhizium* isolado (ambos 0,00). O consórcio BR 85 + LCM S04 (2,86 ± 0,54) resultou no número de ramos numericamente superior, embora tenha permanecido estatisticamente equivalente aos demais tratamentos baseados em rizóbio.

Para a matéria seca da parte aérea das plantas, o tratamento NIT (1,76 ± 0,04 g) apresentou o maior acúmulo de massa seca, sendo estatisticamente equivalente à coinoculação de BR 85 + LCM S04 (1,74 ± 0,12 g) (Figura 17D). O CTR (0,64 ± 0,04 g) e os tratamentos com fungos isolados apresentaram médias abaixo de 0,65 g, o que representa um incremento superior a 150% nos tratamentos destacados. A estirpe BR 85 (1,55 ± 0,06 g) não diferiu da BR 86 (1,28 ± 0,04 g). Ambos os isolados LCM S04 (0,63 ± 0,03 g) e LCM S11 (0,61 ± 0,03 g) isolados não diferiram do CTR.

O número de nódulos foi significativamente influenciado pelos tratamentos de inoculação (Figura 17F). Como esperado, a nodulação esteve ausente no CTR, NIT e nos isolados de *Metarhizium* (LCM S04 e LCM S11). Entre os grupos inoculados, a coinoculação BR 85 + LCM S04 (50,71 ± 3,46) atingiu a maior média, sendo estatisticamente superior a todos os outros tratamentos. Os consórcios envolvendo a estirpe BR 85 geralmente superaram aqueles com a BR 86, os quais formaram um grupo estatístico distinto com menores contagens de nódulos. Esses resultados indicam que a coinoculação com isolados de *Metarhizium* não inibiu a formação de nódulos, enquanto combinações específicas, como BR 85 + LCM S04, aumentaram significativamente esse parâmetro.

A matéria seca dos nódulos seguiu tendência semelhante à contagem de nódulos, com clara distinção entre as duas estirpes bacterianas ($p \leq 0,05$) (Figura 17G). Os tratamentos CTR, NIT e *Metarhizium* isolado não produziram massa de nódulos. Entre os tratamentos inoculados, aqueles contendo BR 85 apresentaram os melhores resultados, com a inoculação simples de BR 85 e o consórcio BR 85 + LCM S04 atingindo os maiores valores (ambos 0,10 g). Os tratamentos envolvendo BR 86 exibiram acúmulo de massa significativamente menor, variando de 0,07 a 0,09 g. Esses dados sugerem que, embora todas as estirpes de rizóbio tenham sido

compatíveis com os fungos, a BR 85 foi mais eficiente em promover a biomassa nodular total.

Na matéria seca radicular, o tratamento BR 85 + LCM S04 (0,37 ± 0,02 g) obteve o maior acúmulo, seguido por BR 85 isolado (0,34 ± 0,02 g), coinoculação BR 86 + LCM S04 (0,34 ± 0,01 g) e NIT (0,33 ± 0,01 g) (Figura 17H). Os tratamentos CTR, LCM S04 e LCM S11 apresentaram os menores valores, com médias em torno de 0,22 g a 0,24 g.

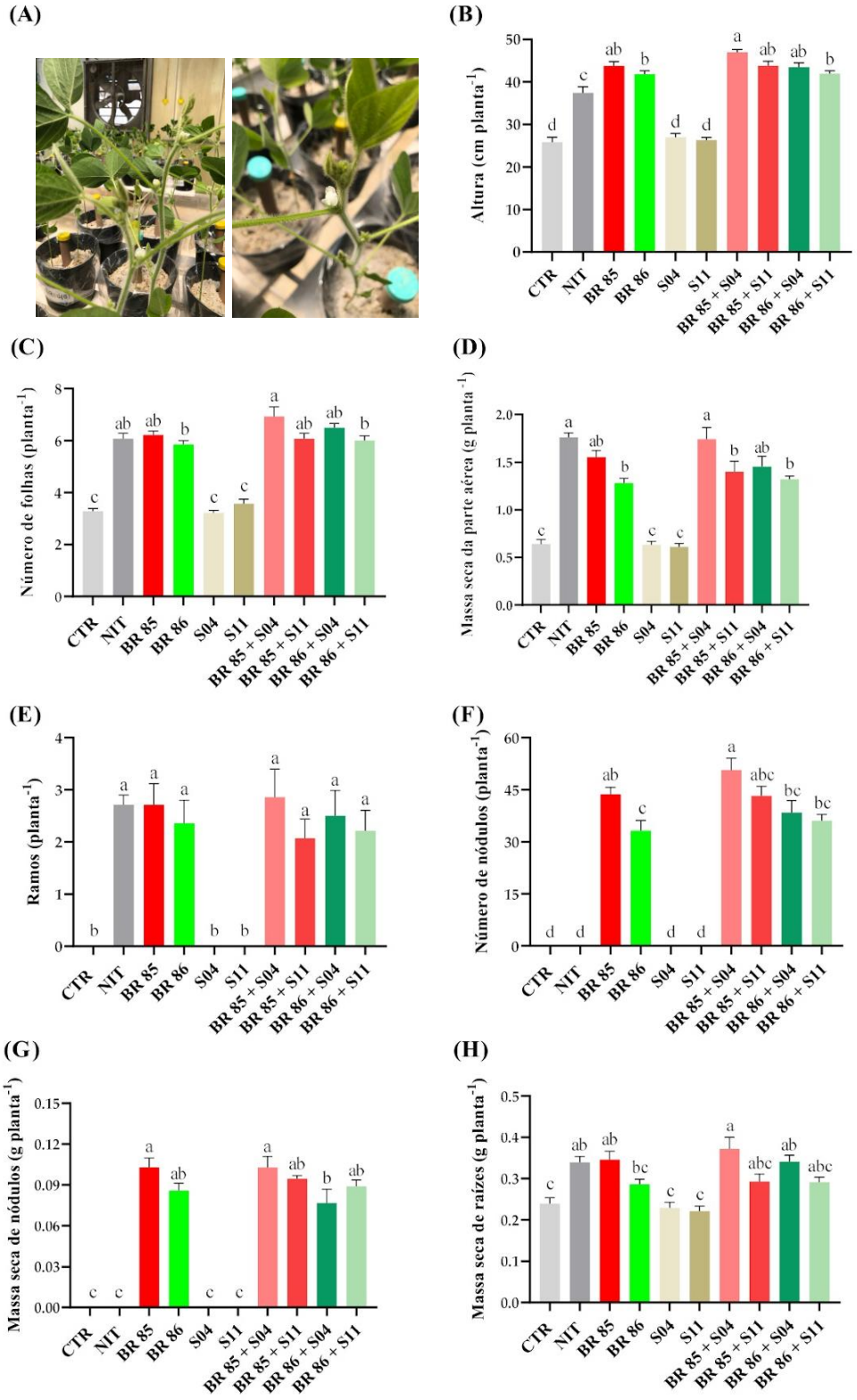


Figura 17. Média e erro padrão das variáveis agronômicas e de nodulação de plantas de soja (*Glycine max*) submetidas aos seguintes tratamentos: controle (CTR), controle nitrogenado (NIT); BR 85 (*Bradyrhizobium diazoefficiens*), BR 86 (*Bradyrhizobium japonicum*), S04 (*Metarhizium anisopliae*), S11 (*Metarhizium brunneum*) e coinoculações (BR 85 + S04, BR 86 + S04, BR 85 + S11 e BR 86 + S11). (A) Imagem representativa de uma planta de soja no momento da colheita, mostrando detalhes do início do florescimento aos 47 dias após a inoculação (DPI); (B) Altura (cm planta^{-1}); (C) Número de folhas (planta^{-1}); (D) Massa seca da parte aérea (g planta^{-1}); (E) Número de ramificações (planta^{-1}); (F)

Número de nódulos (planta^{-1}); (G) Massa seca dos nódulos (g planta^{-1}); e (H) Massa seca de raízes (g planta^{-1}). Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($p < 0,05$), n=7.

4.4.2 Processamento das amostras de raízes

O comprimento radicular das plantas foi maior nos tratamentos contendo *Bradyrhizobium*, com destaque para a coinoculação BR 86 + LCM S04 (27097,4 mm), que apresentou os maiores valores e diferiu estatisticamente da estirpe BR 86 (20485,5 mm) inoculada isoladamente (Figura 18A). As demais coinoculações não diferiram entre si, mas as combinações BR 85 + LCM S04 (21954,1 mm), BR 86 + LCM S11 (21062,7 mm) e BR 86 + LCM S04 (27097,4 mm) apresentaram valores significativamente superiores em comparação ao CTR (15453,3 mm) e aos tratamentos que receberam apenas inoculação fúngica. Por outro lado, o tratamento NIT (16968,1 mm) não apresentou diferença estatística em relação ao controle e aos tratamentos inoculados exclusivamente com os isolados fúngicos LCM S04 (15745,7 mm) e LCM S11 (16040,1 mm).

Em relação à área superficial radicular, observou-se um padrão semelhante ao verificado para o comprimento radicular. O tratamento BR 86 + LCM S04 (30473,5 mm²) apresentou os maiores valores, diferindo estatisticamente do CTR (19605,4 mm²) e dos tratamentos que receberam apenas inoculação fúngica. Além disso, esse tratamento também apresentou diferença significativa em comparação à BR 86 inoculada isoladamente (23868,7 mm²) (Figura 18B).

O maior diâmetro radicular foi observado no tratamento NIT (4,67 mm raiz^{-1} planta^{-1}), o qual apresentou diferença estatística significativa em relação aos demais (Figura 18C). Também foi observado que o tratamento com o isolado fúngico LCM S04 (3,98 mm raiz^{-1} planta^{-1}) apresentou diferença significativa quando comparado à coinoculação BR 86 + LCM S04 (3,57 mm raiz^{-1} planta^{-1}). No geral, os tratamentos coinoculados, bem como as estirpes de *Bradyrhizobium* e os isolados fúngicos inoculados individualmente, apresentaram menor diâmetro radicular quando comparados ao tratamento NIT.

Quanto ao volume radicular, os tratamentos NIT (2927,4 mm³) e BR 86 + LCM S04 (2735,3 mm³) apresentaram as maiores médias, indicando que tanto a disponibilidade de nitrogênio quanto a coinoculação podem favorecer o aumento da biomassa radicular (Figura 18D). No entanto, as coinoculações não diferiram estatisticamente das inoculações com as estirpes bacterianas isoladas, embora tenham apresentado valores superiores ao controle e aos tratamentos com fungos aplicados individualmente. Destaca-se também que a coinoculação BR

86 + LCM S04 apresentou diferença significativa em relação ao tratamento com LCM S04 isolado (1946,8 mm^3), mas não diferiu estatisticamente da BR 86 (2220,6 mm^3) inoculada isoladamente, apesar de possuir uma média numericamente superior.

Em relação ao NTR, a coinoculação BR 86 + LCM S04 (3737,7) atingiu a maior média, diferindo significativamente de todos os outros tratamentos, incluindo a inoculação simples de BR 86 (2698,5) (Figura 18E). A estirpe BR 85 (3202,4), quando aplicada individualmente, superou a BR 86 (2698,5) e o tratamento NIT (1905,7), com ambos os tratamentos com rizóbio mostrando divergências significativas em relação ao NIT. Em contrapartida, o CTR (1650,8) e os monocultivos fúngicos LCM S04 (1699,2) e LCM S11 (1773,6) exibiram os menores valores de NTR.

No que diz respeito às bifurcações, observou-se um maior número nos tratamentos contendo *Bradyrhizobium*, especialmente BR 86 + LCM S04 (15113,5), que apresentou diferença significativa em comparação ao CTR (7136,7), NIT (8531,5) e aos tratamentos com fungos inoculados isoladamente (Figura 18F). Estes últimos não diferiram estatisticamente entre si. Entre as coinoculações, aquelas que envolveram o LCM S04 apresentaram médias superiores às coinoculações com LCM S11, independentemente da estirpe bacteriana associada.

Os cruzamentos também foram maiores na coinoculação BR 86 + LCM S04 (2504,6). Esse resultado diferiu estatisticamente das coinoculações com o isolado fúngico LCM S11 e do tratamento NIT (898,4) (Figura 18G). Os tratamentos contendo apenas os isolados fúngicos aplicados não diferiram entre si nem do NIT. Entre as coinoculações, apenas BR 85 + LCM S11 (1203,0) apresentou desempenho inferior ao observado para a inoculação isolada da estirpe bacteriana correspondente.

Quanto ao número de raízes finas, o tratamento BR 86 + LCM S04 (2867,4) apresentou os maiores valores médios, diferindo estatisticamente de todos os demais tratamentos, incluindo as inoculações isoladas das estirpes BR 85 (2200,7) e BR 86 (2013,2) (Figura 18H). As estirpes bacterianas, quando inoculadas isoladamente, não diferiram entre si, mas apresentaram valores superiores aos observados no CTR (1107,9), NIT (732,6) e nos tratamentos inoculados apenas com as suspensões fúngicas. Além disso, o tratamento com BR 85 apresentou média superior à observada em sua coinoculação com o isolado LCM S11 (1329,1).

O número de raízes médias apresentou valores mais elevados nos tratamentos contendo *Bradyrhizobium*, com destaque para as coinoculações BR 85 + LCM S11 (994,0) e BR 85 + LCM S04 (930,3) (Figura 18I). O tratamento NIT (782,4) não diferiu estatisticamente das estirpes inoculadas isoladamente nem das coinoculações com os isolados fúngicos. Em

relação ao número de raízes grossas, o tratamento NIT (390,6) apresentou valor médio significativamente superior aos demais tratamentos (Figura 18J).

Os dados indicam que a presença de *Bradyrhizobium* spp. foi o principal fator responsável pelo incremento nos parâmetros radiculares avaliados. No entanto, a coinoculação com *M. anisopliae* (LCM S04), especialmente no tratamento BR 86 + LCM S04, potencializou diversos aspectos da arquitetura radicular, incluindo o comprimento, a área superficial, o número de bifurcações e de raízes finas.

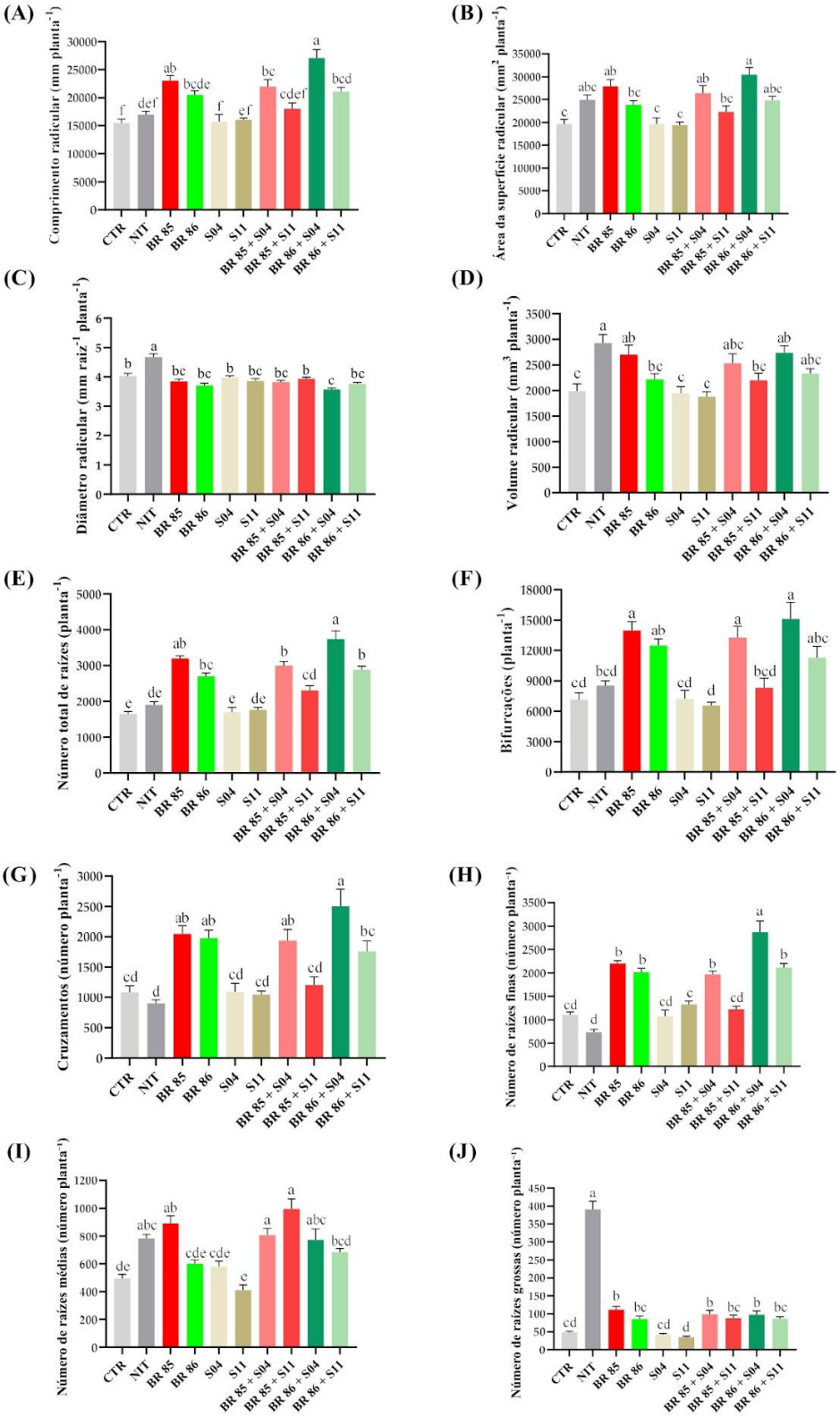


Figure 18. Média e erro padrão dos parâmetros radiculares em plantas de soja (*Glycine max*) submetidas aos seguintes tratamentos: controle (CTR), controle nitrogenado (NIT); BR 85 (*Bradyrhizobium diazoefficiens*), BR 86 (*Bradyrhizobium japonicum*), S04 (*Metarhizium anisopliae*), S11 (*Metarhizium brunneum*) e coinoculações (BR 85 + S04, BR 86 + S04, BR 85 + S11 e BR 86 + S11) aos 47 dias após semeadura. (A) Comprimento radicular (mm planta^{-1}); (B) área da superfície radicular (mm² planta^{-1}); (C) diâmetro radicular (mm raiz^{-1} planta^{-1}); (D) volume radicular (mm³ planta^{-1}); (E) número total de

raízes (planta^{-1}); (F) bifurcações (planta^{-1}); (G) cruzamentos (número planta^{-1}); (H) número de raízes finas (número planta^{-1}); (I) número de raízes médias (número planta^{-1}); e (J) número de raízes grossas (número planta^{-1}). Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($p < 0.05$), n=7.

As imagens das raízes demonstram o efeito da inoculação dos diferentes tratamentos sobre o crescimento radicular (Figura 19).

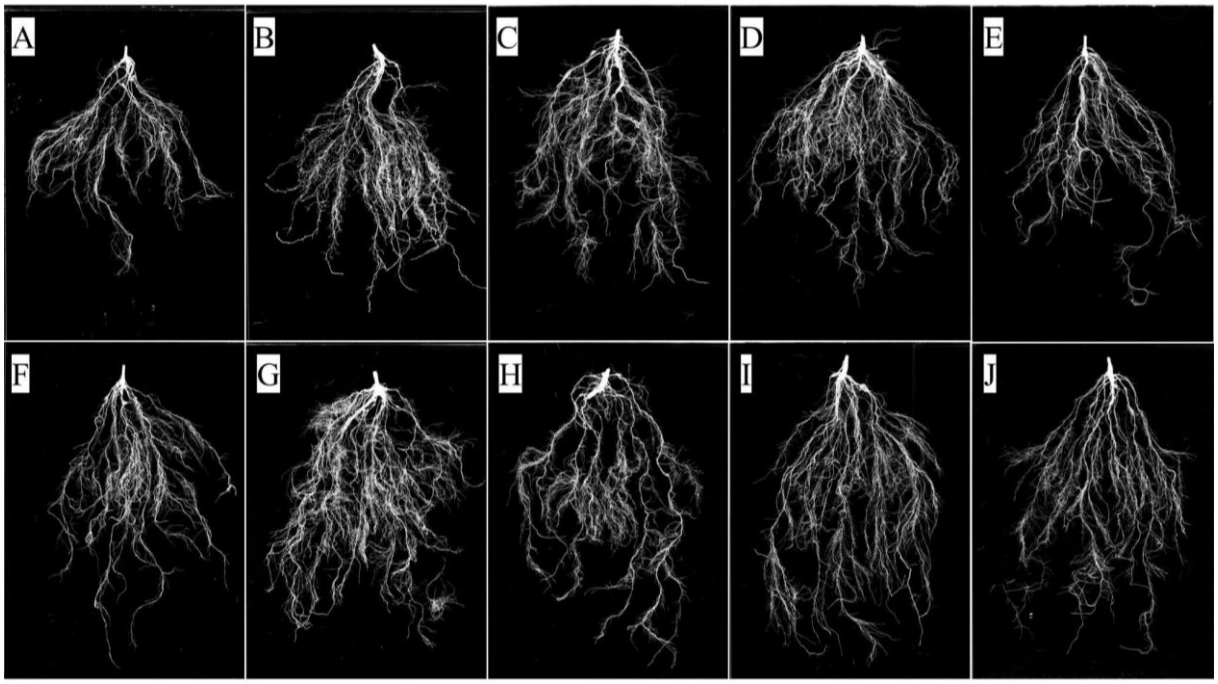


Figura 19. Imagens do sistema radicular de plantas de soja (47 dias após semeadura) obtidas por meio de scanner WinRhizo, sob diferentes tratamentos: (A) controle (sem inoculação), (B) nitrogenado, (C) BR 85 (*Bradyrhizobium diazoefficiens*), (D) BR 86 (*Bradyrhizobium japonicum*), (E) LCM S04 (*Metarhizium anisopliae*), (F) LCM S11 (*Metarhizium brunneum*), (G) BR 85 + LCM S04, (h) BR 85 + LCM S11, (I) BR 86 + LCM S04 e (J) BR 86 + LCM S11.

4.4.3 Detecção qualitativa de *Metarhizium* spp. no substrato

A abordagem de detecção qualitativa foi delineada para confirmar se os isolados fúngicos permaneceram viáveis no substrato ao longo do período experimental. Os tratamentos controle (CTR e NIT) e os tratamentos contendo apenas rizóbio serviram como controles negativos, permitindo a diferenciação entre contaminações de ocorrência natural e a persistência dos fungos inoculados. Colônias típicas de *Metarhizium* não foram detectadas em nenhum tratamento controle (CTR, NIT e inoculados apenas com rizóbios), confirmando a ausência de contaminação cruzada, ao passo que colônias apresentando características morfológicas típicas, tais como a coloração conidial esverdeada e o padrão de crescimento foram consistentemente recuperadas a partir de amostras de substrato coletadas dos grupos inoculados com *Metarhizium* (Figura 20).

Observou-se a presença de colônias de coloração branca e arroxeada em todos os tratamentos, sendo estas características da microbiota endógena do substrato utilizado.

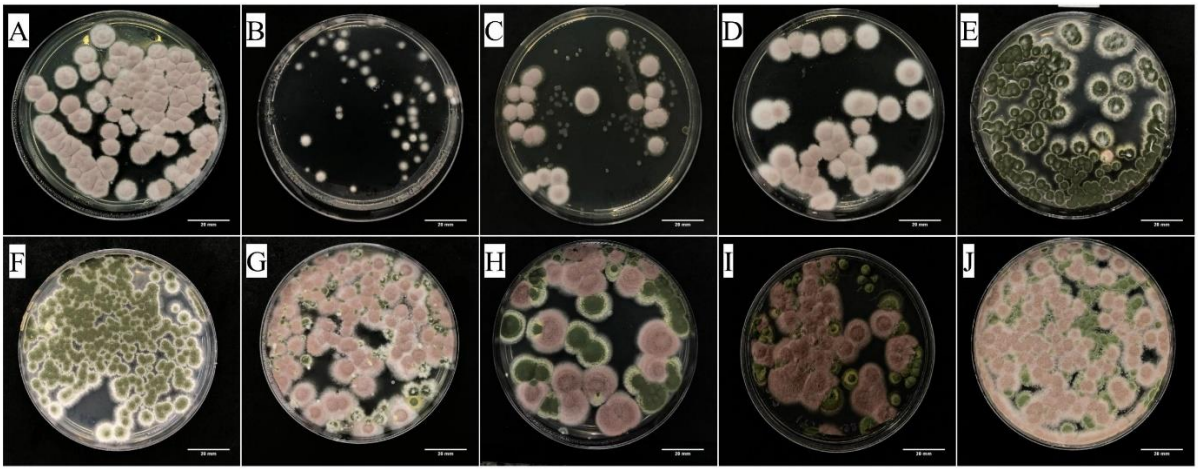


Figura 20. Recuperação qualitativa de *Metarhizium* spp. a partir de amostras de substrato coletadas dos vasos aos 47 dias pós-inoculação (DPI). Placas representativas dos dez tratamentos: (A) controle (CTR); (B) fertilizado com nitrogênio (NIT); (C) *Bradyrhizobium diazoefficiens* (BR 85); (D) *Bradyrhizobium japonicum* (BR 86); (E) *Metarhizium anisopliae* (LCM S04); (F) BR 85 + LCM S04; (G) BR 86 + LCM S04; (H) *Metarhizium brunneum* (LCM S11); (I) BR 85 + LCM S11; e (J) BR 86 + LCM S11. Fonte: Elaboração própria (2026).

5 DISCUSSÃO

A utilização de microrganismos multifuncionais é uma estratégia inovadora para a intensificação sustentável de sistemas agrícolas. Nesse contexto, as funções ecológicas de *Metarhizium* spp. têm sido redefinidas além do controle biológico de insetos, destacando sua competência como promotores de crescimento vegetal e endófitos (Vega *et al*., 2012; Behie; Bidochka, 2014; Hu e Bidochka 2025). Paralelamente, o uso de *Bradyrhizobium* spp. permanece consolidado devido à sua eficiência na fixação biológica de nitrogênio e na promoção do desenvolvimento de leguminosas (Hungria e Mendes, 2015).

Considerando que a integração bem-sucedida desses microrganismos requer a ausência de antagonismo, este estudo avaliou a compatibilidade entre *Bradyrhizobium* e *Metarhizium* tanto *in vitro* quanto *in planta*. A coinoculação é uma abordagem promissora para integrar funções complementares no sistema solo-planta, proporcionando um possível sinergismo entre os microrganismos. Mataranyika *et al*. (2022) apontam que os rizóbios geralmente coexistem com diversos microrganismos do solo e nodulam raízes eficientemente. No entanto, a transição dos ensaios *in vitro* para a validação *in planta* é fundamental para confirmar essas interações funcionais.

Neste estudo, o isolado LCM S04 (*M. anisopliae*) demonstrou compatibilidade *in vitro* com ambas as estirpes de *Bradyrhizobium*, com destaque para a interação com a BR 86 (*B. japonicum*), que promoveu maior aumento no crescimento radial fúngico em cultivo duplo comparado ao fungo isolado durante toda a avaliação (Figura 10). Este estímulo ao desenvolvimento fúngico, observado predominantemente nos intervalos intermediários de avaliação, indica a ausência de antagonismo e sugere uma possível cooperação metabólica, fator determinante para a estabilidade de formulações consorciadas (Frey-Klett *et al*., 2011; Bashan *et al.*, 2014). Em contraste, o isolado LCM S11 (*M. brunneum*) exibiu maior taxa de crescimento radial em monocultivo (Figura 12). Em ambas as estirpes fúngicas, notou-se a ausência de zonas de inibição ou sinais de exclusão competitiva, sugerindo que a redução do crescimento radial na presença das bactérias não decorre de antagonismo direto, mas possivelmente de uma dinâmica distinta na partilha de recursos ou na sinalização bioquímica entre os isolados.

Iberia *et al*. (2026) reforçam que as triagens laboratoriais fornecem *insights* confiáveis e importantes, mas são apenas etapas iniciais, ao passo que experimentos em casa de vegetação são indispensáveis para estabelecer a estabilidade simbiótica. Esses autores observaram variados níveis de inibição *in vitro* de isolados de *Metarhizium* obtidos de insetos-praga do Uruguai sobre duas linhagens comerciais de *B. elkanii* (U1301 e U1302). Embora a maioria desses isolados tenha apresentado efeitos inibitórios em laboratório, especialmente aqueles pertencentes à espécie *M. lepidiotae*, os ensaios de tratamento de sementes não demonstraram prejuízos à nodulação ou à biomassa da parte aérea.

Quanto às vias de inoculação, embora métodos como a imersão de sementes, a rega do solo (*drench*) e a pulverização foliar estejam documentadas para fungos entomopatogênicos como *Beauveria* spp., *Trichoderma* spp. e *Metarhizium* spp. (Stahlhut *et al*, 2024), optou-se pelo uso de culturas puras a fim de evitar interferências de formulações. Essa abordagem também aproveita o nicho ecológico das espécies de *Metarhizium* como associados rizosféricos eficazes (Islam *et al*., 2024). Naturalmente, espécies como *Metarhizium robertsii* liberam conídios que aderem ao solo e aos tecidos radiculares, germinando sob condições favoráveis para colonizar a zona radicular e aumentar a densidade de pelos radiculares por meio de associações endofíticas benéficas (Mesquita *et al*., 2020). Portanto, a aplicação direta na semente garante uma sincronização espacial imediata dentro da espermosfera, estabelecendo um escudo protetor precoce e otimizando as interações radiculares.

No presente estudo, ambos os resultados *in vitro* e *in planta* demonstraram compatibilidade, validados pela ausência de halos de inibição em meio de cultura e nodulação

presente em *G. max* após coinoculação. Contudo, apesar do isolado LCM S04 ter tido aumento de crescimento em meio de cultura quando em conjunto com a estirpe BR 86, as plantas coinoculadas com os mesmos microrganismos não implicaram nos maiores ganhos para *G. max,* sendo estes atribuídos a presença da bactéria. Dessa forma, entende-se que, apesar do crescimento do isolado LCM S04 não ter sido afetado (o que também é confirmado pelo reisolamento fúngico do substrato), é possível que o tempo de interação fungo-planta e /ou a concentração de fungo utilizados não tenham sido suficientes para a promoção de benefícios para a planta.

A compreensão dos impactos da introdução de fungos entomopatogênicos no microbioma rizosférico é fundamental para a consolidação de bioprodutos à base de *Metarhizium* spp. no manejo agrícola. Barelli *et al.* (2020) observaram, via sequenciamento e qPCR, que a aplicação de *M. robertsii* modulou positivamente a abundância de táxons promotores de crescimento vegetal, com destaque para *Bradyrhizobium* spp., corroborando os achados de Behie *et al*. (2017), que indicam que *Metarhizium* pode interagir com bactérias rizosféricas, contribuindo para a estruturação da comunidade microbiana e favorecendo microrganismos benéficos. Diferente das observações indiretas da literatura, este estudo transpôs essa interação para um consórcio biotecnológico direcionado, visando o sinergismo funcional.

A colheita das plantas foi estrategicamente realizada aos 47 DPI (estádio R1) para permitir tempo suficiente para o estabelecimento fúngico, capturando simultaneamente o pico da nodulação. Mesmo sob condições de campo, a formação inicial de nódulos ocorre logo após a emergência, e a nodulação se intensifica continuamente até o florescimento ou a formação de vagens (Barelli *et al*., 2020). Nossos resultados demonstraram que a coinoculação em *G. max* preservou a integridade da simbiose rizóbio-leguminosa, conforme evidenciado pela estabilidade da nodulação (Figura 17F-G).

Em termos de desenvolvimento vegetativo, o consórcio BR 85 + LCM S04 promoveu ganhos em variáveis como altura e massa seca da parte aérea (Figura 17B-D), enquanto a interação BR 86 + LCM S04 apresentou desempenho superior em parâmetros radiculares, incrementando a complexidade da arquitetura radicular, como o número total de raízes (Figura 18E) e bifurcações (Figura 18F). Essa reestruturação morfológica corrobora os achados de Ferreira e Musumeci (2021), indicando que fungos endofíticos podem otimizar a interface solo-planta ao ampliar a superfície absortiva de água e nutrientes.

Notadamente, a eficácia desses tratamentos *in planta* converge com os ensaios *in vitro*, nos quais o isolado LCM S04 exibiu maior compatibilidade e crescimento radial em cultivo

duplo com o rizóbio quando comparado ao LCM S11. Essa correlação entre as etapas experimentais sugere que as interações positivas observadas em condições controladas são transponíveis para o sistema solo-planta, traduzindo-se em maior vigor vegetativo e eficiência de absorção.

Quanto à capacidade de colonização endofítica dos isolados LCM S04 e LCM S11, os resultados sugerem que a eficiência do estabelecimento fúngico pode ser modulada pela interação entre o método de inoculação e as propriedades físico-químicas do ambiente radicular. No presente estudo, no ensaio piloto, a combinação de inoculação da suspensão fúngica via colo da plântula e pincelamento foliar em condicionador de solo resultou em boa frequência de reisolamento dos fragmentos vegetais (Figuras 14-15). Estudos evidenciam que a colonização é favorecida por abordagens que ampliam o contato do inóculo com múltiplas superfícies vegetais, facilitando a entrada via estômatos, ferimentos ou tecidos meristemáticos através de mecanismos de adesão e produção de enzimas hidrolíticas, além da compatibilidade com o hospedeiro (Sasan; Bidochka, 2012; Barelli *et al*., 2016; Canassa *et al*., 2020).

A natureza do substrato pode desempenhar um papel determinante na manutenção do inóculo. Utilizou-se um substrato pasteurizado e inerte (brita e vermiculita) em vasos de drenagem livre para evitar a interferência da microbiota nativa, acomodando ao mesmo tempo diversos tamanhos de sementes de leguminosas (Hao *et al*. 2021).

No presente estudo, amostras de substrato foram coletadas ao final do experimento (47 DPI, estádio R1) e, embora as amostras tenham sido armazenadas sob refrigeração por mais de um mês, colônias viáveis de *Metarhizium* foram recuperadas em todos os grupos tratados, enquanto os controles negativos (CTR, NIT e inoculados apenas com rizóbios) confirmaram a ausência de contaminação cruzada (Figura 20). O estabelecimento e a manutenção desses isolados na rizosfera são pré-requisitos essenciais para compreender as interações planta-fungo e as respostas de crescimento vegetal. Essa persistência sugere uma competência ambiental do gênero *Metarhizium*, em consonância com estudos que já demonstraram a viabilidade do isolado *M. anisopliae* LCM S04 por até cinco meses em vasos sob condições de semicampo (Mesquita *et al*., 2020) e por até um ano em solos cultivados com morangueiro (Castro *et al*., 2016). Portanto, nossos resultados demonstram que ambos os isolados permaneceram viáveis ao longo de estádios críticos da soja, validando sua estabilidade temporal no sistema rizosférico.

A FBN é o pilar de uma produção de soja sustentável e de baixo custo. A integração desse sistema simbiótico com FE de potencial multifuncional representa uma estratégia poderosa para a agricultura moderna. Como o sucesso de tais consórcios microbianos depende inteiramente da compatibilidade, ao unir ensaios *in vitro* com a validação *in planta*, este estudo

amplia a compreensão sobre o uso integrado desses microrganismos, otimizando o possível desenvolvimento de bioprodutos robustos para o manejo sustentável de culturas agrícolas.

6 CONCLUSÕES

Este estudo demonstrou a compatibilidade *in vitro* e a viabilidade da coinoculação entre os isolados fúngicos *Metarhizium anisopliae* LCM S04 ou *M. brunneum* LCM S11 e as estirpes de *Bradyrhizobium* (BR 85 e BR 86) na cultura da soja. Nos ensaios laboratoriais, o isolado LCM S04 destacou-se pelo maior crescimento radial quando cocultivado com ambas as bactérias.

Em casa de vegetação, os consórcios fúngico-bacterianos preservaram a simbiose rizóbio-leguminosa, sem prejuízos à nodulação. Os tratamentos contendo *Bradyrhizobium*, isoladamente ou combinados com *Metarhizium*, geralmente mostraram um desempenho superior em comparação com os controles não inoculados e apenas com fungos, com ênfase para os consórcios estabelecidos com o isolado LCM S04.

Adicionalmente, o estudo confirma o comportamento endofítico dos isolados de *Metarhizium* em soja, bem como sua persistência rizosférica ao final do experimento (47 DPI). Esses resultados validam o potencial biotecnológico dessas interações tripartites (planta-fungo-bactéria) para a agricultura tropical e sustentam o direcionamento de investigações futuras sobre a indução de resistência sistêmica e o controle biológico de pragas mediado pelo endofitismo.

REFERÊNCIAS

AHMAD, I.; DEL MAR JIMÉNEZ-GASCO, M.; LUTHE, D. S.; BARBERCHECK, M. E. Systemic colonization by *Metarhizium robertsii* enhances cover crop growth. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 2, p. 1-19, 2020.

AHSAN, S. M.; INJAMUM-UL-HOQUE, M.; DAS, A. K.; EL-SHARNOUBY, M. E.; EL-SHEERY, M. I.; ALORFI, H. S.; ALI, E. F.; AHMED, A. F.; SHARAF, M. Plant-Entomopathogenic Fungi Interaction: Recent Progress and Future Prospects on Endophytism-Mediated Growth Promotion and Biocontrol. **Plants**, v. 13, n. 10, p. 1-28, 2024.

ALVES, S. B. (ed.). **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998.

ALVES, R. T.; FARIA, M. **Pequeno manual sobre fungos entomopatógenos**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2010. 50 p. (Documentos / Embrapa Cerrados, ISSN 1517-5111, n. 286).

ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2014.

ARAÚJO, F. F.; HUNGRIA, M. Nodulação e rendimento de soja co-infectada com *Bacillus subtilis* e *Bradyrhizobium japonicum*/*Bradyrhizobium elkanii*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, n. 9, p. 1633-1643, 1999.

ARAÚJO, A. S. F. de; CARNEIRO, R. F. V.; BEZERRA, A. A. C.; ARAÚJO, F. F. de. Coinoculação rizóbio e *Bacillus subtilis* em feijão-caupi e leucena: efeito sobre a nodulação, a fixação de N_2 e o crescimento das plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 1, p. 182-185, 2010.

ARAVINTHRAJU, K.; SHANTHI, M.; MURUGAN, M.; SRINIVASAN, R.; MAXWELL, L. A.; MANIKANDA BOOPATHI, N.; ANANDHAM, R. Endophytic entomopathogenic fungi: Their role in enhancing plant resistance, managing insect pests, and synergy with management routines. **Journal of Fungi**, v. 10, n. 12, p. 1-28, 2024.

ARSENAULT, J. L.; POULEUR, S.; MESSIER, C.; GUAY, R. WinRHIZO™, a root-measuring system with a unique overlap correction method. **HortScience**, v. 30, p. 906, 1995.

BAIS, H. P.; WEIR, T. L.; PERRY, L. G.; GILROY, S.; VIVANCO, J. M. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. **Annual Review of Plant Biology**, v. 57, p. 233-266, 2006.

BAMISILE, B. S.; AFOLABI, O. G.; SIDDIQUI, J. A.; XU, Y. Endophytic insect pathogenic fungi-host plant-herbivore mutualism: Elucidating the mechanisms involved in the tripartite interactions. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 39, n. 12, p. 1-15, 2023.

BARELLI, L.; MOONJELY, S.; BEHIE, S. W.; BIDOCHKA, M. J. Fungi with multifunctional lifestyles: endophytic insect pathogenic fungi. **Plant Molecular Biology**, v. 90, n. 6, p. 657–664, 2016.

BARELLI, L.; WALLER, A. S.; BEHIE, S. W.; BIDOCHKA, M. J. Plant microbiome analysis after *Metarhizium* amendment reveals increases in abundance of plant growth-promoting

organisms and maintenance of disease-suppressive soil. **PLoS ONE**, v. 15, n. 4, art. e0231150, 2020.

BARRA-BUCAREI, L.; IGLESIAS, A. F.; TORRES, C. P. Entomopathogenic Fungi. *In*: SOUZA, B.; MARUCCI, R. C.; VÁSQUEZ, L. L. (org.). **Natural Enemies of Insect Pests in Neotropical Agroecosystems**. 1. ed. Cham, Suíça: Springer, 2019. p. 123-136.

BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L. E.; PRABHU, S. R.; HERNANDEZ, J. P. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). **Plant and Soil**, v. 378, n. 1/2, p. 1–33, 2014.

BATZER, J. C.; MUELLER, D. S. Soybean fungal endophytes *Alternaria* and *Diaporthe* spp. are differentially impacted by fungicide application. **Plant Disease**, v. 104, n. 1, p. 52-59, 2020.

BEHIE, S. W.; BIDOCHKA, M. J. Ubiquity of insect-derived nitrogen transfer to plants by endophytic insect-pathogenic fungi: an additional branch of the soil nitrogen cycle. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 5, p. 1553-1560, 2014.

BEHIE, S. W.; JONES, S. J.; BIDOCHKA, M. J. Plant tissue localization of the endophytic insect pathogenic fungi *Metarhizium* and *Beauveria*. **Fungal Ecology**, v. 13, p. 112-119, 2015.

BEHIE, S. W.; MOREIRA, C. C.; SEMENTCHOUKOVA, I.; BARELLI, L.; ZELISKO, P. M.; BIDOCHKA, M. J. Carbon translocation from a plant to an insect-pathogenic endophytic fungus. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, art. 14245, 2017.

BERENDSEN, R. L.; PIETERSE, C. M. J.; BAKKER, P. A. H. M. The rhizosphere microbiome and plant health. **Trends in Plant Science**, v. 17, n. 8, p. 478-486, ago. 2012.

BLUM, B. J. Concepts and strategies for a successful product development: The industry's development concept. *In*: **Proceedings of the Cost Action 850 Conference**, 2007, Schloss Salzau. Germany: [s. n.], 2007.

BORDIGNON, J. R.; MANDARINO, J. M. G. **Soja**: composição química, valor nutricional e sabor. Londrina: Embrapa Soja, 1994. 32 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 399 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa SDA nº 30, de 12 de novembro de 2010. Estabelece os métodos oficiais para análise de inoculantes. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, ano 147, n. 220, p. 5–18, 18 nov. 2010.

CANASSA, F.; ESTECA, F. C. N.; MORAL, R. A.; MEYLING, N. V.; KLINGEN, I.; DELALIBERA JÚNIOR, I. Root inoculation of strawberry with the entomopathogenic fungi *Metarhizium robertsii* and *Beauveria bassiana* reduces incidence of the twospotted spider mite and selected insect pests and plant diseases in the field. **Journal of Pest Science**, v. 93, n. 1, p. 261-274, 2020.

CAROLINO, A. T.; PAULA, A. R.; SILVA, C. P.; BUTT, T. M.; SAMUELS, R. I. Monitoring

persistence of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* under simulated field conditions with the aim of controlling adult *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 1, e198, 2014.

CARROLL, G. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. **Ecology**, v. 69, n. 1, p. 2-9, 1988.

CASSÁN, F. D.; SALAMONE, I. G. ***Azospirillum*** **sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina**. Buenos Aires: Asociación Argentina de Microbiologia, p. 61-86, 2008.

CASTRO, T.; MAYERHOFER, J.; ENKERLI, J.; EILENBERG, J.; MEYLING, N. V.; MORAL, R. de A.; DELALIBERA JÚNIOR, Í. Persistence of Brazilian isolates of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. robertsii* in strawberry crop soil after soil drench application. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 233, p. 361-369, 2016.

CENTRO DE INTELIGÊNCIA EM ORGÂNICOS. **Grãos orgânicos**: cresce o mercado de soja e milho orgânicos. Rio de Janeiro: CI Orgânicos/SNA, 2021.

CHIBEBA, A. M.; KYEI-BOAHEN, S.; GUIMARÃES, M. F.; NOGUEIRA, M. A.; HUNGRIA, M. Feasibility of transference of inoculation-related technologies: A case study of evaluation of soybean rhizobial strains under the agro-climatic conditions of Brazil and Mozambique. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 261, p. 230-240, 2018.

CHOUHAN, S.; AGRAWAL, L.; PRAKASH, A. Amelioration in traditional farming system by exploring the different plant growth-promoting attributes of endophytes for sustainable agriculture. **Archives of Microbiology**, v. 204, n. 2, 151, 2022.

CONAB. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Observatório agrícola**: acompanhamento da safra brasileira de grãos: nono levantamento, junho 2019. Brasília, DF: CONAB, 2019. v. 6, n. 9, p. 119.

CONAB. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**: sexto levantamento, março 2022. Brasília, DF: CONAB, v. 9, safra 2021/22, n. 6, 2022.

CONAB. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Safra de grãos**. Brasília, DF: CONAB, 2024.

CORREA, T. A.; SANTOS, F. S.; CAMARGO, M. G.; QUINELATO, S.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; GOLO, P. S. Comparison of methods for isolating entomopathogenic fungi from soil samples. **Journal of Visualized Experiments**, n. 179, e63353, 2022.

DADAZIO, T. S. Manejo da soja orgânica. **Revista Campo & Negócios**, [s. l.], 23 nov. 2020.

DAMASIO, A. B. N.; CUNHA, C. E. S.; SANTANA, G. G.; SILVA, L. M.; LOBATO, D. T. C. Efeito de diferentes doses de inoculante à base de *Bradyrhizobium* spp. na cultura da soja. **Revista Novos Desafios**, [S. l.], v. 5, n. 2, p. 65–76, 2025.

DAVEY, M. E.; CAIAZZA, N. C.; O'TOOLE, G. A. Rhamnolipid Surfactant Production Affects Biofilm Architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Journal of Bacteriology**, v.

185, n. 3, p. 1027-1036, 2003.

DEY, R.; PAL, K. K.; BHATT, D. M.; CHAUHAN, S. M. Growth promotion and yield enhacement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria. **Microbiological Research**, v. 159, n. 4, p. 371-394, 2004.

FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E. **Stages of soybean development**. Ames: Iowa State University, 1977. 11 p.

DEUNER, C.; BORGES, C. T.; ALMEIDA, A.; MENEGHELLO, G.; TUNES, L. Ácido jasmônico como promotor de resistência em plantas. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 38, n. 3, p. 275-281, 2015.

DOMINGUES, S. C. de O. *et al*. *Azospirillum brasilense* atuando como promotor de crescimento na cultura da soja. *In*: CONGRESSO ONLINE PARA AUMENTO DE PRODUTIVIDADE DO MILHO E SOJA (COMSOJA), 2., 2019. **Anais** [...]. [S. l.]: Even3, 2019. p. 1.

DOWNIE, J. A. The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 34, n. 2, p. 150-170, mar. 2010.

EMBRAPA SOJA. **Fixação biológica de nitrogênio**. Londrina: Embrapa Soja, 2019. 31 p.

FACHINELLI, R. **Influência da inoculação com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* na cultura da soja**. 2018. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, 2018.

FAETH, S. H. Are endophytic fungi defensive plant mutualists? **Oikos**, v. 98, n. 1, p. 25-36, 2002.

FALL, R.; KINSINGER, R. F.; WHEELER, K. A. A Simple Method to Isolate Biofilm-forming *Bacillus subtilis* and Related Species from Plant Roots. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 27, n. 3, p. 372-379, 2004.

FERNANDES, E. K. K.; KEYSER, C. A.; RANGEL, D. E. N.; FOSTER, R. N.; ROBERTS, D. W. CTC medium: a novel dodine-free selective medium for isolating entomopathogenic fungi, especially *Metarhizium acridum*, from soil. **Biological Control**, v. 54, n. 3, p. 197-205, 2010.

FERNANDES, M. F. R.; RIBEIRO, T. G.; ROUWS, J. R.; SOARES, L. H. B.; ZILLI, J. É. Biotechnological potential of bacteria from genera *Bacillus*, *Paraburkholderia* and *Pseudomonas* to control seed fungal pathogens. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 2, p. 705–714, 2021.

FERREIRA, E.; CAVALCANTI, P.; NOGUEIRA, D. ExpDes: an R package for ANOVA and experimental designs. **Applied Mathematics**, v. 5, n. 19, p. 2952-2958, 2014.

FERREIRA, F. V.; MUSUMECI, M. A. *Trichoderma* as biological control agent: scope and prospects to improve efficacy. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n.

5, art. 90, 2021.

FERREIRA, T.; JUMBO, L. O. W.; FERREIRA, T. A.; GONZÁLEZ, M. E. Q.; MOURÃO, D. S.; DOS SANTOS, G. R. Extratos de fungos endofíticos como potenciais promotores de crescimento em plântulas da soja (*Glycine max* (L.) Merril). **Cuadernos de Educación y Desarrollo**, v. 16, n. 4, e4027, 2024.

FISHLOW, A.; VIEIRA FILHO, J. E. R. **Agriculture and industry in Brazil**: innovation and competitiveness. New York: Columbia University Press, 2020. 244 p.

FONTES, E. M. G.; VALADARES-INGLIS, M. C. **Controle biológico de pragas da agricultura**. Brasília, DF: Embrapa, 2020.

FREY-KLETT, P.; BURLINSON, P.; DEVEAU, A.; BARRET, M.; TARKKA, M.; SARNIGUET, A. Bacterial-fungal interactions: hyphens between agricultural, clinical, environmental, and food microbiologists. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 75, n. 4, p. 583–609, 2011.

FUKAMI, J.; DE LA OSA, C.; OLLERO, F. J.; MEGÍAS, M.; HUNGRIA, M. Co-inoculation of maize with *Azospirillum brasilense* and *Rhizobium tropici* as a strategy to mitigate salinity stress. **Functional Plant Biology**, v. 45, n. 3, p. 328-339, 2018.

GAO, Q.; JIN, K.; YING, S. H.; ZHANG, Y.; XIAO, G.; SHANG, Y. Genome sequencing and comparative transcriptomics of the model entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. acridum*. **PLoS Genetics**, v. 7, n. 1, e1001264, 2011.

GOLO, P. S.; GARDNER, D. R.; GRILGHAGEN, N. M.; TAKATSUKA, J.; ZIMMER, C. R.; CASTILHO, A. M. C.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; ROBERTS, D. W. Production of destruxins from *Metarhizium* spp. fungi in artificial medium and in endophytically colonized cowpea plants. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, p. 1-11, 2014.

GRAZIANO, X.; GAZZONI, D. L.; PEDROSO, M. T. **Agricultura**: fatos e mitos – fundamentos para um debate racional sobre o agro brasileiro. São Paulo: Braúna, 2021. 317 p.
HAO, Q.; ALBAGHDADY, D. M. D.; XIAO, Y.; XIAO, X.; MO, C.; TIAN, T.; TANG, J.; CHEN, L. Endophytic *Metarhizium anisopliae* is a potential biocontrol agent against wheat *Fusarium* head blight caused by *Fusarium graminearum*. **Journal of Plant Pathology**, v. 103, n. 3, p. 875–885, 2021.

HARTLOVA, A.; KROCOVA, Z.; CERVENY, L.; STULIK, J. A proteomic view of the host-pathogen interaction: the host perspective. **Proteomics**, v. 11, n. 15, p. 3212-3220, 2011.

HIRAKURI, M. H.; LAZZAROTTO, J. J. **O agronegócio da soja nos contextos mundial e brasileiro**. Londrina: Embrapa Soja, 2014. 70 p. (Documentos, 349).

HOLZ, S.; D'ALESSANDRO, C. P.; MAXIMO, H. J.; NASCIMENTO DE SOUZA, P. H.; RARUANG, Y.; DEMÉTRIO, C. G. B.; CHEN, Z. Y.; DELALIBERA JÚNIOR, I. The potential of using *Metarhizium anisopliae* and *Metarhizium humberi* to control the Asian soybean rust caused by *Phakopsora pachyrhizi*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 33, n. 4, p. 366-382, 2023.

HOSONO, A.; HONGO, Y. Inovações tecnológicas que tornaram possível a agricultura no Cerrado. *In*: HOSONO, A.; ROCHA, C. M. C.; HONGO, Y. (org.). **Desenvolvimento para a agricultura sustentável**: o Cerrado brasileiro. New York: Palgrave Macmillan, 2016. cap. 1, p. 11-36.

HU, S.; BIDOCHKA, M. J. Root colonization by endophytic insect-pathogenic fungi. **Journal of Applied Microbiology**, v. 130, n. 3, p. 570-581, 2021.

HU, S.; LIU, C.; LIU, X. The beneficial effects of soybean proteins and peptides on chronic diseases. **Nutrients**, v. 15, n. 8, art. 1811, 2023.

HU, S.; MOJAHID, M. S.; BIDOCHKA, M. J. Root colonization of industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) by the endophytic fungi *Metarhizium* and *Pochonia* improves growth. **Industrial Crops and Products**, v. 198, p. 116716, 2023.

HU, S.; BIDOCHKA, M. J. The endophytic fungi *Metarhizium*, *Pochonia*, and *Trichoderma*, improve salt tolerance in hemp (*Cannabis sativa* L.). **PLoS One**, v. 20, n. 6, e0325559, 2025.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C.; GRAHAM, P. H. Contribution of Biological Nitrogen Fixation to the N Nutrition of Grain Crops in the Tropics: The Success of Soybean (*Glycine max* L. Merr.) in South America. *In*: SINGH, R. P.; SHANKAR, N.; JAIWAL, P. K. (ed.). **Nitrogen Nutrition and Sustainable Plant Productivity**. Houston: Studium Press, 2006. p. 43-93.

HUNGRIA, M.; MENDES, I. C. Nitrogen Fixation with Soybean: The Perfect Symbiosis?. *In*: DE BRUIJN, F. J. (ed.). **Biological Nitrogen Fixation**. 2. ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2015. v. 2, p. 1009-1024.

HUNGRIA, M.; MENDES, I. C. Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja: avanços e perspectivas. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 62, n. 3, p. 251-261, maio/jun. 2015.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. Soybean seed co-inoculation with *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense*: a new biotechnological tool to improve yield and sustainability. **American Journal of Plant Sciences**, v. 6, n. 6, p. 811-817, 2015.

HUNGRIA, M. *Azospirillum*: um velho novo aliado. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 36.; REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 31., 2016, Goiânia. **Anais** [...]. Brasília: SBCS, 2016. p. 1-4.

HUNGRIA, M. *et al*. **Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja**: avanços e desafios. Londrina: Embrapa Soja, 2022.

HUSSEIN, K. A.; HASSAN, S. H.; JOO, J. H. Potential capacity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in the biosorption of Cd^{2+} and Pb^{2+}. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 57, n. 6, p. 347-355, 2011.

HYDE, K. D.; SOYTONG, Kasem. The fungal endophyte dilemma. **Fungal Diversity**, v. 33, p. 163-173, 2008.

HYMOWITZ, T. On the domestication of the soybean. **Economic Botany**, v. 24, n. 4, p. 408-

421, 1970.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Censo Demográfico 2022**. Rio de Janeiro: IBGE, 2022

IGLESIAS IBERIA; BEYHAUT, E.; RIVAS-FRANCO, F. Native multifunctional *Metarhizium* spp. delivered via seed coatings suppress soil-borne phytopathogens and preserve rhizobial symbiosis in soybean. **Biocontrol Science and Technology**, 2026. No prelo.

IGNOFFO, C. M. *et al*. Seasonal incidence of the entomopathogenic fungus *Spicaria rileyi* associated with noctuid pests of soybeans. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 25, n. 1, p. 135-137, 1975.

INTERNATIONAL GRAINS COUNCIL (IGC) Projeta Queda na Oferta Global de Grãos e Alerta para Risco de Fertilizantes. **Forbes Agro**, 19 mar. 2026. Disponível em: https://forbes.com.br/forbes-agro/2026/03/igc-projeta-queda-na-oferta-global-de-graos-e-alerta-para-risco-de-fertilizantes/. Acesso em: 20 mar. 2026.

ISLAM, M. S.; GHIMIRE, A.; LAY, L.; KHAN, W.; LEE, J.-D.; SONG, Q.; JO, H.; KIM, Y. Identification of quantitative trait loci controlling root morphological traits in an interspecific soybean population using 2D imagery data. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 9, art. 4687, 2024.

IWANICKI, N. S.; PEREIRA, A. A.; BOTELHO, A. B. R. Z.; REZENDE, J. M.; DE ANDRADE MORAL, R.; ZUCCHI, M. I.; DELALIBERA JÚNIOR, I. Monitoring of the field application of *Metarhizium anisopliae* in Brazil revealed high molecular diversity of *Metarhizium* spp. in insects, soil and sugarcane roots. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-12, 2019.

JABER, L. R.; ENKERLI, J. Effect of seed treatment duration on growth and colonization of *Vicia faba* by endophytic *Beauveria bassiana* and *Metarhizium brunneum*. **Biological Control**, v. 103, p. 187-195, 2016.

JABER, L. R. Seed inoculation with endophytic fungal entomopathogens promotes plant growth and reduces crown and root rot (CRR) caused by *Fusarium culmorum* in wheat. **Planta**, v. 248, n. 6, p. 1525–1535, 2018.

JABER, L. R.; ALANANBEH, K. M. Fungal entomopathogens as endophytes reduce several species of *Fusarium* causing crown and root rot in sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). **Biological Control**, v. 126, p. 117–126, 2018.

JARONSKI, S. T. Soil ecology of the entomopathogenic ascomycetes: a critical examination of what we (think) we know. *In*: EKESI, S.; MANIANIA, N. K. (ed.). **Use of entomopathogenic fungi in biological pest management**. Kerala: Research Signpost, 2007. p. 91-144.

JIANG, X.; FANG, W.; TONG, J.; LIU, S.; WU, H.; SHI, J. *Metarhizium robertsii* as a promising microbial agent for rice *in situ* cadmium reduction and plant growth promotion. **Chemosphere**, v. 305, 135427, 2022.

JOHNSON, K. V. H.; KRISHNA, T. P. A.; DASH, M.; MEENA, R. S.; PANDEY, P.; RATHORE, M. S. Food and Nutritional Security: Innovative Approaches for Improving Micronutrient Use Efficiency in Soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) Under Hostile Soils. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 23, n. 1, p. 56-70, 2023.

KHAN, A. L.; HAMAYUN, M.; KHAN, S. A.; KANG, S. M.; SHINWARI, Z. K.; KAMRAN, M.; REHMAN, S.; KIM, J. G.; KANG, S. M.; LEE, I. J. Pure culture of *Metarhizium anisopliae* LHL07 reprograms soybean to higher growth and mitigates salt stress. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 1483-1494, 2012.

KIM, W. J.; KANG, B. H.; MOON, C. Y.; KANG, S.; SHIN, S.; CHOWDHURY, S.; CHOI, M.-S.; PARK, S.-K.; MOON, J.-K.; HA, B.-K. Quantitative trait loci (QTL) analysis of seed protein and oil content in wild soybean (*Glycine max*). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 4, art. 4077, 2023.

LAZZARETTI, E.; MELO, I. S. de. **Influência de *Bacillus subtilis* na promoção de crescimento de plantas e nodulação de raízes de feijoeiro**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2005. 21 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 28).

LEGER, R. J. S. Studies on adaptations of *Metarhizium anisopliae* to life in the soil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 98, n. 3, p. 271-276, jul. 2008.

LEGER, R. J. S; WANG, J. B. *Metarhizium*: Jack of all trades, master of many: Sex and host switching in a fungus. **Open Biology**, v. 10, n. 12, 200307, 2020.

LI, D.; ALEXANDER, M. Co-inoculation with antibiotic producing bacteria to increase colonization and nodulation by rhizobia. **Plant and Soil**, v. 108, n. 2, p. 211-219, 1988.

LIAO, X.; O'BRIEN, T. R.; FANG, W.; ST. LEGER, R. J. The plant beneficial effects of *Metarhizium* species correlate with their association with roots. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 16, p. 7089-7096, 2014.

LIMA, A. R. *et al*. Ocorrência de *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson na *Spodoptera cosmioides* (Walk.) 1858 (Lepidoptera: Noctuidae) em Chapadão do Sul-MS. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v. 9, n. 2, p. 57-59, 2015.

LOPES, M. I. L.; BARROS, N. M. Virulência de conídios armazenados do fungo *Nomuraea rileyi* à lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis*. **Ciência Rural**, v. 25, n. 2, p. 197-200, 1995.

MARIANO, R. L. R. Métodos de seleção *in vitro* para controle microbiológico. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 1, p. 369–409, 1993.

MASCARENHAS, H. A. A.; TANAKA, R. T.; WUTKE, E. B.; KIKUTI, H. Nitrogênio: a soja aduba a lavoura da cana. **O Agronômico**, Campinas, v. 57, n. 1, p. 19-20, 2005.

MASCARIN, G. M.; JARONSKI, S. T. The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 11, p. 1-15, 2016.

MASCARIN, G. M.; LOPES, R. B.; DELALIBERA, Í.; FERNANDES, É. K. K.; LUZ, C.;

FARIA, M. Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 165, p. 46-53, 2019.

MASCARIN, G. M.; GOLO, P. S.; DE SOUZA RIBEIRO-SILVA, C.; QUINTELA, E. D.; JARONSKI, S. T.; DELALIBERA JÚNIOR, I. Advances in submerged liquid fermentation and formulation of entomopathogenic fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 108, n. 1, p. 1-21, 2024.

MATARANYIKA, P. N.; CHIMWAMUROMBE, P. M.; VENTURI, V.; UZABAKIRIHO, J. D. Bacterial bioinoculants adapted for sustainable plant health and soil fertility enhancement in Namibia. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 6, art. 1002797, 2022.

MATTOS, E. C.; MENDONÇA, R. S. de; REINA, F. T.; SOUZA, R. de; SEIXAS, M.; SANTOS, M. A. M. dos. Estudo da identidade histológica de subprodutos de soja (*Glycine max* L.). **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 73, n. 2, p. 104-110, 2015.
MELO, G. B. *et al*. Foliar application of biostimulant mitigates water stress effects on soybean. **Agronomy**, v. 14, n. 3, 414, 2024.

MENNA, P.; a, M.; BARCELLOS, F. G.; BANGEL, E. V.; HESS, P. N.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 29, n. 4, p. 315–332, 2006.

MESQUITA, E.; MARCIANO, A. F.; CORVAL, A. R. C.; FIOROTTI, J.; CORRÊA, T. A.; QUINELATO, S.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Efficacy of a native isolate of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* against larval tick outbreaks under semifield conditions. **BioControl**, v. 65, n. 3, p. 353-362, 2020.

MESQUITA, E.; HU, S.; LIMA, T. B.; GOLO, P. S.; BIDOCHKA, M. J. Utilization of *Metarhizium* as an insect biocontrol agent and a plant bioinoculant with special reference to Brazil. **Frontiers in Fungal Biology**, v. 4, p. 1-12, 2023.

MIMMA, A. A.; AKTER, T.; HAQUE, M. A.; BHUIYAN, M. A. B.; CHOWDHURY, M. Z. H.; SULTANA, S.; ISLAM, S. M. N. Effect of *Metarhizium anisopliae* (MetA1) on growth enhancement and antioxidative defense mechanism against *Rhizoctonia* root rot in okra. **Heliyon**, v. 9, n. 8, e18978, 2023.

MOLOINYANE, S.; NCHU, F. The effects of endophytic *Beauveria bassiana* inoculation on infestation level of *Planococcus ficus*, growth and volatile constituents of potted greenhouse grapevine (*Vitis vinifera* L.). **Toxins**, v. 11, n. 2, 72, 2019.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. ed. atual. e ampl. Lavras: Editora UFLA, 2006. 729 p.

MORENO, S. G. **Influência da microbiota foliar na colonização endofítica de *Beauveria bassiana***. 2022. Tese (Doutorado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2022.

NAIR, D. N.; PADMAVATHY, S. Impact of endophytic microorganisms on plants, environment and humans. **The Scientific World Journal**, v. 2014, e250693, 2014.

NISA, H.; KAMILI, A. N.; NAWCHOO, I. A.; SHAFI, S.; SHAMEEM, N.; BANDH, S. A. Fungal endophytes as prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products: a review. **Microbial Pathogenesis**, v. 82, p. 50-59, maio 2015.

PARRA, J. R. P. Biological control in Brazil: An overview. **Scientia Agricola**, v. 71, n. 5, p. 420-429, 2014.

PARSA, S.; ORTIZ, V.; VEGA, F. E. Establishing fungal entomopathogens as endophytes: towards endophytic biological control. **Journal of Visualized Experiments**, n. 74, e50360, 2013.

PIMENTEL, I. C.; GLIENKE-BLANCO, C.; GABARDO, J.; STUART, R. M.; AZEVEDO, J. L. Identification and colonization of endophytic fungi from soybean (*Glycine max* (L.) Merril) under different environmental conditions. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n. 5, p. 705-711, 2006.

POVEDA, J.; EUGUI, D.; ABRIL-URÍAS, P.; VELASCO, P. Endophytic fungi as direct plant growth promoters for sustainable agricultural production. **Symbiosis**, v. 85, n. 1, p. 1-19, 2021.

PRADO, A. M. *et al*. **Coinoculação da soja com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* na safra 2018/2019 no Paraná**. Londrina: Embrapa Soja, 2019. 8 p. (Circular Técnica, 152).

QUESADA-MORAGA, E. Entomopathogenic fungi as endophytes: Their broader contribution to IPM and crop production. **Biocontrol Science and Technology**, v. 30, n. 8, p. 864-867, 2020.

QIN, P.; WANG, T.; LUO, Y. A review on plant-based proteins from soybean: health benefits and soy product development. **Journal of Agriculture and Food Research**, v. 7, art. 100265, 2022.

RAMAN, A.; SURYANARAYANAN, T. S. Fungus–plant interaction influences plant-feeding insects. **Fungal Ecology**, v. 29, p. 123-132, 2017.

RAMLAL, A.; MEHTA, S.; NAUTIYAL, A.; BHATTACHARYYA, S.; SHARMA, S. K. Androgenesis in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.): a critical revisit. **In Vitro Cellular & Developmental Biology** - Plant, v. 60, n. 1, p. 1-15, 2024.

RANI, R.; REETU; CHHUNEJA, P.; SINGH, I.; CHOUDHARY, A. K.; SHARMA, P.; KAUR, S. Genetic diversity and population structure analysis in cultivated soybean (Glycine max [L.] Merr.) using SSR and EST-SSR markers. **PLOS ONE**, v. 18, n. 5, p. 1-21, 2023.

RASOOL, S.; JENSEN, B.; ROITSCH, T. G.; MEYLING, N. V. Enzyme Regulation Patterns in Fungal Inoculated Wheat May Reflect Resistance and Tolerance Towards an Insect

Herbivore. **Journal of Plant Physiology**, v. 300, p. 1-10, 2024.

RUSSO, M. L.; PELIZZA, S. A.; CABELLO, M. N.; STENGLEIN, S. A.; SCORSETTI, A. C. Endophytic colonisation of tobacco, corn, wheat and soybeans by the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota, Hypocreales). **Biocontrol Science and Technology**, v. 25, n. 4, p. 475-480, 2015.

RUSSO, M. L.; SCORSETTI, A. C.; VIANNA, M. F.; CABELLO, M.; FERRERI, N.; PELIZZA, S. Endophytic effects of *Beauveria bassiana* on corn (*Zea mays*) and its herbivore, *Rachiplusia nu* (Lepidoptera: Noctuidae). **Insects**, v. 10, n. 4, e110, 2019.

SAMISH, M.; GINSBERG, H.; GLASER, I. Biological control of ticks. **Parasitology**, v. 129, n. S1, p. S389-S403, 2004.

SARVEN, M. S.; HAO, Q.; DENG, J.; YANG, F.; WANG, G.; XIAO, Y.; XIAO, X. Biological control of tomato gray mold caused by *Botrytis cinerea* with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Pathogens**, v. 9, n. 3, p. 1-13, 2020.

SASAN, R. K.; BIDOCHKA, M. J. The insect-pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* (Clavicipitaceae) is also an endophyte that stimulates plant root development. **American Journal of Botany**, v. 99, n. 1, p. 101–107, 2012.

SCHEIDT, G. N.; WAGNER, I. P.; PEDROZA, I.; FONTANA, J.; MELEIRO, L.; SOARES, L.; REIS, V. Optimization of culture medium and growth conditions of the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* BR11417 for its use as an agricultural inoculant using response surface methodology (RSM). **Plant and Soil**, v. 451, n. 1/2, p. 75-87, 2020.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**, v. 109, pt. 6, p. 661-686, 2005.

SEDIYAMA, T.; SILVA, F. da; BORÉM, A. (ed.). **Soja**: do plantio à colheita. Viçosa, MG: Editora UFV, 2015. 333 p.

SEIXAS, C. D. S.; NEUMAIER, N.; BALBINOT JUNIOR, A. A.; KRZYZANOWSKI, F. C.; LEITE, R. M. V. B. C. (ed.). **Tecnologias de Produção de Soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2020. 347 p. (Sistemas de Produção, 17).

SILVA, M. S.; NAVES, M. M. V.; OLIVEIRA, R. B.; LEITE, O. S. M. Composição química e valor protéico do resíduo de soja em relação ao grão de soja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 3, p. 571-576, 2006.

SINGH, B. K.; MILLARD, P.; WHITELEY, A. S.; MURRELL, J. C. Unravelling rhizosphere-microbial interactions: opportunities and limitations. **Trends in Microbiology**, v. 12, n. 8, p. 386-393, 2004.

SIQUEIRA, A. F.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; SOUZA, R. C.; RODRIGUES, E. P.; ALMEIDA, L. G.; BARCELLOS, F. G.; BATISTA, J. S.; NAKATANI, A. S.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; VASCONCELOS, A. T. R.; HUNGRIA, M. Comparative genomics of

Bradyrhizobium japonicum CPAC 15 and *Bradyrhizobium diazoefficiens* CPAC 7: elite model strains for understanding symbiotic performance with soybean. **BMC Genomics**, v. 15, art. 420, 2014.

SIQUEIRA, A. C. O.; MASCARIN, G. M.; GONÇALVES, C. R. N. C. B.; MARCON, J.; QUECINE, M. C.; FIGUEIRA, A.; DELALIBERA JR., Í. Multi-trait biochemical features of *Metarhizium* species and their activities that stimulate the growth of tomato plants. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 4, 137, 2020.

SOSA-GÓMEZ, D. R.; DELPIN, K. E.; MOSCARDI, F.; NOZAKI, M. H. The impact of fungicides on *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson epizootics and on populations of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), on soybean. **Neotropical Entomology**, v. 32, n. 2, p. 287-291, 2003.

STAM, H.; STOUTHAMER, A. H.; VERSEVELD, H. W. van. Hydrogen metabolism and energy costs of nitrogen fixation. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 46, n. 1, p. 73-92, 1987.

STROM, N.; HU, W.; HAARITH, D.; CHEN, S.; BUSHLEY, K. Interactions between soil properties, fungal communities, the soybean cyst nematode, and crop yield under continuous corn and soybean monoculture. **Applied Soil Ecology**, v. 147, e103388, 2020.

STAHLHUT, K. N.; NEUPERT, D. G.; LAING, J. E.; WITT, L. J.; BAUER, J. T. Measuring leaf and root functional traits uncovers multidimensionality of plant responses to arbuscular mycorrhizal fungi. **American Journal of Botany**, v. 111, n. 7, art. e16369, 2024.

STONE, L. B. L.; BIDOCHKA, M. J. The multifunctional lifestyles of *Metarhizium*: evolution and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 23, p. 9935-9945, 2020.

STUART, A. K. C.; STUART, R. M.; PIMENTEL, I. C. Effect of agrochemicals on endophytic fungi community associated with crops of organic and conventional soybean (*Glycine max* L. Merril). **Agriculture and Natural Resources**, v. 52, n. 4, p. 388-392, 2018.

SUJII, E. R.; TIGANO, M. S.; CARVALHO, V. A. Cinética da esporulação e viabilidade de conídios de *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson sobre cadáveres da lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), em condições de campo. **Neotropical Entomology**, v. 31, n. 4, p. 573-578, 2002.

TAVARES, O. C. H. **Efeito dos ácidos húmicos sobre as H^+-ATPase, transportadores de $N\text{-}NO_3^-$ e $N\text{-}NH_4^+$, e sobre o crescimento em arroz**. 2014. Tese (Doutorado em Agronomia - Ciência do Solo) – Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2014.

TAVARES, O. C. H.; SANTOS, L. A.; FILHO, D. F.; FERREIRA, L. M.; GARCÍA, A. C.; CASTRO, T. A. V. T.; ZONTA, E.; PEREIRA, M. G.; FERNANDES, M. S. Response Surface Modeling of Humic Acid Stimulation of the Rice (*Oryza sativa* L.) Root System. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 67, n. 8, p. 1046–1059, 2021.

TEJO, D. P.; FERNANDES, C. H. S.; BURATTO, J. S. Soja: fenologia, morfologia e fatores que interferem na produtividade. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia da FAEF**, v.

35, n. 1, p. 1-9, 2019.

THOMAS, M. B.; READ, A. F. Can fungal biopesticides control malaria? **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 5, n. 5, p. 377-383, 2007.

THORVILSON, H. G.; PEDIGO, L. P. Epidemiology of *Nomuraea rileyi* in *Plathypena scabra* populations from Iowa soybeans. **Environmental Entomology**, v. 13, n. 6, p. 1491-1497, 1984.

TIAGO, P. V.; OLIVEIRA, N. T. de; LIMA, E. Â. de L. A. Biological insect control using *Metarhizium anisopliae*: morphological, molecular, and ecological aspects. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 4, p. 645-651, abr. 2014.

TURABI, A. B.; HABIBI, S.; KAKAR, K.; ARYAN, S.; HAIDARI, M. D.; ALIPOUR, S. Optimizing soybean crop performance through the integrated application of organic and chemical fertilizers: a study on alkaline soil in Afghanistan. **Crops**, v. 4, n. 1, p. 82-94, 2024.
VIEIRA FILHO, J. E. R. **A cadeia produtiva de soja e o desenvolvimento econômico e regional no Brasil**. Rio de Janeiro: Ipea, 2024. 27 p.

TURNER, J. T.; BACKMAN, P. A. Factors relating to peanut yield increases after seed treatment with *Bacillus subtilis*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 75, n. 4, p. 347-352, 1991.

TURNER, T. R.; JAMES, E. K.; POOLE, P. The plant microbiome. **Genome Biology**, v. 14, n. 6, e209, p. 1-10, jun. 2013.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). Foreign Agricultural Service. **Oilseeds**: World Markets and Trade. Washington, DC: USDA, 2025.

VEGA, F. E.; MEYLING, N. V.; LUANGSA-ARD, J. J.; BLACKWELL, M. Fungal entomopathogens. *In*: VEGA, F. E.; KAYA, H. K. (ed.). **Insect Pathology**. 2. ed. San Diego: Academic Press, 2012. p. 171-220.

VINCENT, J. M. **A manual for the practical study of root-nodule bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1970. 164 p. (IBP Handbook, 15).

WHITE, J. F.; KINGSLEY, K. L.; ZHANG, Q.; VERMA, R.; OBI, N.; DVINSKIKH, S. *et al*. Review: endophytic microbes and their potential applications in crop management. **Pest Management Science**, v. 75, n. 10, p. 2558-2565, 2019.

WILSON, D. Endophyte: the evolution of a term, and clarification of its use and definition. **Oikos**, v. 73, n. 2, p. 274-276, 1995.

YAN, L.; ZHU, J.; ZHAO, X. Beneficial effects of endophytic fungi colonization on plants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 8, p. 3327-3340, 2019.

YAPA, A. T.; THAMBUGALA, K. M.; SAMARAKOON, M. C.; DE SILVA, N. *Metarhizium* species as bioinsecticides: potential, progress, applications & future perspectives. **New Zealand Journal of Botany**, v. 63, n. 2-3, p. 439-461, 2025.

YATES, R. J.; HOWIESON, J. G.; HUNGRIA, M.; BALA, A.; O'HARA, G. W.; TERPOLILLI, J. Authentication of rhizobia and assessment of the legume symbiosis in

controlled plant growth systems. In: HOWIESON, J. G.; DILWORTH, M. J. (org.). ***Working with rhizobia***. Canberra: Australian Centre for International Agricultural Research, 2016. p. 73–108.

ZHAO, T.; HE, A.; KHAN, M. N.; YIN, Q.; SONG, S.; NIE, L. Coupling of reduced inorganic fertilizer with plant-based organic fertilizer as a promising fertilizer management strategy for colored rice in tropical regions. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 23, n. 1, p. 93-107, 2024.

ZILLI, J. E.; ALVES, B. J. R.; ROUWS, L. F. M.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; SOARES, L. H. B.; CASSÁN, F.; CASTELLANOS, M. O.; O'HARA, G. The importance of denitrification performed by nitrogen-fixing bacteria used as inoculants in South America. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 451, n. 1/2, p. 5-24, 2020.

ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 17, n. 9, p. 879-920, 2007.

ZUFFO, A. M.; REZENDE, P. M.; BRUZI, A. T.; OLIVEIRA, N. T.; SOARES, I. O.; NETO, G. F. G.; CARDILLO, B. E. S.; SILVA, L. O. Coinoculação de *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* na cultura da soja. **Revista de Ciências Agrárias**, Lisboa, v. 38, n. 1, p. 87-93, mar. 2015.

8 ANEXOS

ANEXO A – FORMULÁRIO DE PREPARO DE MEIO DE CULTURA – YMA+VC

Reagente / Solução	**Quantidade para 1 L**
Manitol	10 g
Solução de K_2HPO_4 10%	1 mL
Solução de KH_2PO_4 10%	4 mL
Solução de $MgSO_4.7H_2O$ 10%	2 mL
Solução de NaCl 10%	1 mL
Solução vermelho congo 0,25%	10 mL
Extrato de levedura	0,4 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL
Ágar bacteriológico	15 g
pH	6,8 – 7,0

ANEXO B – FORMULÁRIO DE PREPARO DE MEIO DE CULTURA – BP

Reagente / Solução	**Quantidade para 1 L**
Glicerol	5 mL
K_2HPO_4	0,5 g
$MgSO_4.7H_2O$	0,5 g
Extrato de levedura	2 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL
pH	6,8 - 7,0

ANEXO C – SOLUÇÃO NUTRITIVA PARA CRESCIMENTO DE PLANTAS - CRS

A vantagem desta solução é que fornece cálcio adequado com baixo teor de cloreto e ferro quelatado. Preparar cinco soluções-estoque, sendo a quinta para os oligoelementos e a sexta para o cálcio.

Reagentes	**Quantidade** (g/L)
1 $MgSO_4.7H_2O$	12.3
2 KH_2PO_4	6.8
3 K_2SO_4	17.5
4 Fe-EDTA	2.5
5 **Solução de Elementos Traço**	(**Guardar a 4ºC**)
H_3BO_3	0.464
$Na_2\ MoO_4\ .2H_2O$	0.018
$ZnSO_4\ .7H_2O$	0.539
$MnSO_4\ .4H_2O$ / **$MnSO_4.H_2O$**	0.042 / **0,032**
$CoSO_4\ .7H_2O$ / **$CoCl_2\ .6H_2O$**	0.141 / **0,119**
$CuSO_4\ .5H_2O$	0.125
6 $CaSO_4$ solução agitada / **$CaSO_4 2\ H_2O$**	2.04 / **2,57**

Procedimento

1- Combinar partes iguais das soluções-estoque (1-4) para obter um concentrado de nutrientes de 200 mL em garrafa de vidro de 2 L com tampa de rosca.

2- Adicionar 0,5 mL de solução de elementos traço (5) e completar o volume até 1600 mL com água deionizada, depois autoclavar.

3- Depois de arrefecer, adicionar 400 mL de solução de $CaSO_4$ autoclavada e bem agitada (6), para perfazer um volume final de 2 L (isto limita a precipitação do Ca e fornece Ca adequado sem o cloreto de sal).