

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

USO DE *Bacillus* sp. E ACIBENZOLAR-S-METIL COMO INDUTORES DE RESISTÊNCIA AO CRESTAMENTO BACTERIANO EM SOJA (*Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*)

CHEILA CRISTINA SBALCHEIRO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da UPF, para obtenção do título de Doutor em Agronomia – Área de Concentração em Fitopatologia.

Passo Fundo, março de 2010

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

USO DE *Bacillus* sp. E ACIBENZOLAR-S-METIL COMO INDUTORES DE RESISTÊNCIA AO CRESTAMENTO BACTERIANO EM SOJA (*Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*)

CHEILA CRISTINA SBALCHEIRO

Orientadora: Dra. Norimar D'Ávila Denardin

Coorientadora: Dra. Francismar Corrêa Marcelino

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da UPF, para obtenção do título de Doutor em Agronomia – Área de Concentração em Fitopatologia.

Passo Fundo, março de 2010



UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM FITOPATOLOGIA



A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a tese

“Uso de *Bacillus* sp. e acibenzolar-s-metil como indutores de resistência ao cretamento bacteriano em soja (*Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*)”

Elaborada por

CHEILA CRISTINA SBALCHEIRO

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
“Doutor em Agronomia – Área de Fitopatologia”

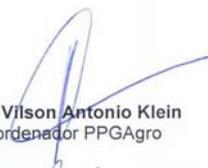
Aprovada em: 30/03/2010
Pela Comissão Examinadora

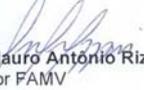

Dra. Norimar D'Ávila Denardin
Presidente da Comissão Examinadora
Orientadora

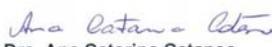

Dra. Francismar Correa Marcelino
Embrapa Soja
Co-orientadora


Dra. Jurema Schons
Universidade de Passo Fundo


Dra. Sandra Patussi Brammer
Embrapa Trigo


Dr. Vilson Antonio Klein
Coordenador PPGAgro


Dr. Mauro Antonio Rizzardi
Diretor FAMV


Dra. Ana Catarina Cataneo
UNESP

S276u Sbalcheiro, Cheila Cristina

Uso de *Bacillus* sp. e Acibenzolar-S-Metil como indutores de resistência ao cretamento bacteriano em soja: (*Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*) / Cheila Cristina Sbalcheiro. – 2010.
195 f. : il. ; 25 cm.

Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade de Passo Fundo, 2010.

Orientação: Dr^a. Norimar D'Ávila Denardin.

Co-orientadora: Dr^a. Francismar Corrêa Marcelino.

1. Soja - Cultivo. 2. Soja - Qualidade. 3. Soja – Doenças e pragas. 4. Soja – Melhoramento genético. I. Denardin, Norimar D'Ávila, orientadora. II. Marcelino, Francismar Corrêa, co-orientadora. IV. Título.

CDU: 633.34

BIOGRAFIA DA AUTORA

Cheila Cristina Sbalcheiro, nascida em 12 de março de 1982, natural de Sananduva, RS, Brasil, Bióloga formada em julho de 2003 pelo Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Passo Fundo, RS.

Em janeiro de 2006 concluiu o curso de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo, na área de Concentração em Fitopatologia.

Em março de 2007 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo, na área de Concentração em Fitopatologia, a nível de doutorado.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo, pela oportunidade e pelo aprimoramento profissional;

À professora orientadora, Dra. Norimar D'Ávila Denardin, pela amizade, carinho, dedicação e apoio durante os trabalhos e pelo exemplo de integridade e profissionalismo;

À Dra. Francismar Corrêa Marcelino, pela orientação, gratificante amizade, ensinamentos e profissionalismo;

A FAMV, Embrapa Soja e ao IFET - Campus Sertão, pelo suporte de laboratórios e demais instalações utilizadas para o êxito do trabalho;

À minha mãe Leonice, irmãos Susana e Paulo, que não pouparam esforços para a minha formação, especialmente por todo amor, carinho, dedicação e incentivo constante, pelo exemplo de luta e por acreditarem em mais este passo de minha vida. Por serem, enfim, o meu alicerce sustentador da edificação de minha vida;

A Jacson Rodrigo Telles, pelo ombro amigo nos momentos difíceis e pelas horas dedicadas na realização dos experimentos;

Às amigas Marília de Silva, Liliane Rebechi, Greisse Brambatti, Raquel Cardoso, Paula Broch e Paula Ghiggi, e ao amigo Guilherme Mallmann pela amizade, descontração, apoio e ensinamentos;

Ao professor Dr. Pedro A.V. Escosteguy pela concessão da casa de vegetação para execução dos trabalhos;

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Agronomia que contribuíram para a minha formação;

A Deus, pela oportunidade de estar aqui, pela saúde, família, conforto, esperança e alegria e pela proteção constante durante este caminho.

Muito Obrigada!

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xvi
RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	3
1 INTRODUÇÃO.....	5
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	7
2.1 A cultura da soja.....	7
2.1.1 Crestamento bacteriano da soja.....	9
2.2 Interação planta-patógeno.....	12
2.3 Indução de resistência.....	14
2.3.1 Resistência induzida por agentes bióticos.....	18
2.3.2 Resistência induzida por agentes abióticos.....	21
CAPÍTULO I - Controle <i>in vitro</i> de <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i> por <i>Bacillus</i> sp. e acibenzolar-S-metil.....	25
Resumo.....	25
Abstract.....	26
1 INTRODUÇÃO.....	27
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
2.1 Preparo do agente biótico.....	29
2.2 Preparo do agente abiótico.....	30
2.3 Preparo da bactéria fitopatogênica.....	30
2.4 Método da dupla camada de meio de cultura.....	31
2.5 Método da incorporação de agentes biótico e abiótico ao meio de cultura.....	33
2.6 Método do disco de papel filtro impregnado com agentes biótico e abiótico.....	34
2.7 Produção de compostos voláteis <i>in vitro</i>	36
2.8 Delineamento experimental.....	37
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
3.1 Método da dupla camada de meio de cultura.....	37
3.2 Método da incorporação de agentes biótico e abiótico ao meio de cultura.....	40
3.3 Método do disco de papel filtro impregnado com agentes biótico e abiótico.....	41
3.4 Produção de compostos voláteis <i>in vitro</i>	44
4 CONCLUSÕES.....	46

CAPITULO II – Crescimento de <i>Bacillus</i> sp. sob diferentes temperaturas, pH, concentrações de cloreto de sódio e fontes de carbono.....	47
Resumo.....	47
Abstract.....	48
1 INTRODUÇÃO.....	49
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	50
2.1 Crescimento de <i>Bacillus</i> sp. em diferentes temperaturas.....	50
2.2 Crescimento de <i>Bacillus</i> sp. em diferentes pH.....	51
2.3 Crescimento de <i>Bacillus</i> sp. em diferentes concentrações de NaCl.....	52
2.4 Crescimento de <i>Bacillus</i> sp. em diferentes fontes de carbono.....	53
2.5 Representação e análise dos resultados.....	54
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
3.1 Crescimento de <i>Bacillus</i> sp. em diferentes temperaturas.....	55
3.2 Crescimento de <i>Bacillus</i> sp. em diferentes pH.....	58
3.3 Crescimento de <i>Bacillus</i> sp. em diferentes concentrações de NaCl.....	61
3.4 Crescimento de <i>Bacillus</i> sp. em diferentes fontes de carbono.....	63
4 CONCLUSÕES.....	67
CAPITULO III – Sensibilidade de <i>Bacillus</i> sp. aos principais fungicidas utilizados na cultura da soja.....	68
Resumo.....	68
Abstract.....	69
1 INTRODUÇÃO.....	70
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	72
2.1 Antibiograma com fungicidas impregnados em disco de papel filtro.....	72
2.2 Sensibilidade a fungicidas agrícolas incorporados ao meio de cultura.....	74
2.3 Representação e análise dos resultados.....	76
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	76
3.1 Antibiograma com fungicidas impregnados em disco de papel filtro.....	76

3.2 Sensibilidade a fungicidas agrícolas incorporados ao meio de cultura.....	79
4 CONCLUSÕES.....	84
CAPITULO IV – Reação de cultivares de soja a <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i> e a <i>Bacillus</i> sp. e teste de fitotoxicidade de acibenzolar-S-metil.....	85
Resumo.....	85
Abstract.....	86
1 INTRODUÇÃO.....	87
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	88
2.1 Reação de cultivares de soja a <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i>	89
2.2 Reação de cultivares de soja a <i>Bacillus</i> sp.....	90
2.3 Teste de fitotoxicidade de acibenzolar-S-metil em plantas de soja.....	91
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	92
3.1 Reação de cultivares de soja a <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i>	92
3.2 Reação de cultivares de soja a <i>Bacillus</i> sp.....	94
3.3 Teste de fitotoxicidade de acibenzolar-S-metil em plantas de soja.....	97
4 CONCLUSÕES.....	98
CAPITULO V – Controle do crestamento bacteriano da soja causado por <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i> com <i>Bacillus</i> sp. e acibenzolar-S-metil.....	99
Resumo.....	99
Abstract.....	100
1 INTRODUÇÃO.....	101
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	102
2.1 Extração e detecção de <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i> em sementes de soja.....	103
2.2 Cultivo em casa de vegetação.....	103
2.3 Aplicação do indutor biótico <i>Bacillus</i> sp.....	104
2.4 Aplicação do agente abiótico acibenzolar-S-metil – ASM.....	106
2.5 Inoculação da fitobactéria <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i>	106
2.6 Avaliação do crestamento bacteriano da soja.....	107
2.7 Representação e análise dos resultados.....	107
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	108

3.1 Extração e detecção de <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i> em sementes de soja.....	108
3.2 Avaliação do cretamento bacteriano da soja.....	108
4 CONCLUSÕES.....	121
CAPITULO VI – Alterações bioquímicas na interação soja- <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i> induzidas por <i>Bacillus</i> sp. e acibenzolar-S-metil.....	
Resumo.....	122
Abstract.....	123
1 INTRODUÇÃO.....	124
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	125
2.1 Coleta do tecido foliar.....	127
2.2 Aplicação do agente biótico.....	128
2.3 Aplicação do agente abiótico.....	129
2.4 Inoculação da fitobactéria <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i>	129
2.5 Preparo do extrato vegetal.....	130
2.6 Determinação da atividade de peroxidases.....	130
2.7 Determinação da atividade de β -1,3-glucanases.....	131
2.8 Determinação da atividade de fenilalanina amônia-liase.....	132
2.9 Determinação da atividade de polifenoloxidasas.....	133
2.10 Representação e análise dos resultados.....	133
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	134
3.1 Atividade de peroxidases – POX.....	134
3.2 Atividade de β -1,3-glucanases.....	140
3.3 Atividade de fenilalanina amônia-liase – PAL.....	145
3.4 Atividade de polifenoloxidase – PPO.....	150
4 CONCLUSÕES.....	155
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	157
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	159

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Tratamentos aplicados no método da dupla camada de meio de cultura para controle <i>in vitro</i> de <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i> (Psg).....	32
2	Tratamentos aplicados no método de incorporação dos agentes bióticos (<i>Bacillus</i> sp.) e abióticos (acibenzolar-S-metil) ao meio de cultura para controle <i>in vitro</i> de <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i> (Psg).....	34
3	Tratamentos aplicados no método do disco de papel de filtro impregnado com os agentes biótico (<i>Bacillus</i> sp.) e abiótico (acibenzolar-S-metil) ao meio de cultura para controle <i>in vitro</i> de <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i> (Psg).....	35
4	Tratamentos aplicados para verificação da produção de compostos voláteis <i>in vitro</i> pelos agentes biótico (<i>Bacillus</i> sp.) e abiótico (acibenzolar-S-metil) no controle de <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i> (Psg).....	37
5	Crescimento bacteriano de <i>Bacillus</i> sp. quantificado por unidades formadoras de colônias (UFC) em diferentes temperaturas até 72 h após a inoculação em meio de cultura.....	57
6	Quantificação do crescimento de <i>Bacillus</i> sp. através absorbância e unidades formadoras de colônia (UFC) em diferentes pH nos períodos de 24 e 48 h após a inoculação.....	59
7	Quantificação do crescimento de <i>Bacillus</i> sp. por absorbância e unidades formadoras de colônia (UFC) em diferentes concentrações de NaCl (%) no período de 24 e 48 h da inoculação.....	62
8	Crescimento de <i>Bacillus</i> sp. em diferentes fontes de carbono e em meio de cultura sólido e líquido....	64
9	Ingrediente ativo de fungicidas impregnados em discos de papel filtro em três concentrações diferentes.....	73

10	Diâmetro do halo de inibição (mm) de ingredientes ativos recomendados para a cultura da soja, em três concentrações diferentes e dois períodos de impregnação, confrontado com <i>Bacillus</i> sp.....	77
11	Crescimento bacteriano de <i>Bacillus</i> sp. em meio de cultura contendo ingredientes ativos recomendados para a cultura da soja, em três concentrações diferentes e incubados por 24, 48 e 72 h.....	80
12	Reação de cultivares de soja a <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i>	93
13	Reação de cultivares de soja a inoculação com isolado de <i>Bacillus</i> sp. e uma formulação a base de polímeros e <i>Bacillus</i> sp.....	95
14	Tratamentos aplicados em plantas de soja para verificação do controle de <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i> (Psg) pelos agentes bióticos (<i>Bacillus</i> sp.) e abióticos (acibenzolar-S-metil) em casa de vegetação.....	104
15	Incidência do crestamento bacteriano em plantas de soja tratadas com agente biótico <i>Bacillus</i> sp. e abiótico acibenzolar-S-metil acompanhada desde o surgimento dos primeiros sintomas da doença após a inoculação com <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i> – Psg.....	110
16	Severidade do crestamento bacteriano e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), em plantas de soja da cultivar BRS 246RR tratadas com agente biótico <i>Bacillus</i> sp. e abiótico acibenzolar-S-metil, dias após a inoculação com <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i> – Psg.....	113
17	Tratamentos aplicados em plantas de soja para verificação do controle de <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i> (Psg) pelos agentes bióticos (<i>Bacillus</i> sp.) e abióticos (acibenzolar-S-metil) em casa de vegetação.....	126
18	Períodos das coletas do material vegetal para as determinações enzimática após a aplicação dos agentes <i>Bacillus</i> sp. e acibenzolar-S-metil nas cultivares BRS 243RR e BRS 246RR.....	127

19	Atividade de peroxidases (POX) em plantas de soja da cultivar BRS 243RR tratadas com os agentes biótico <i>Bacillus</i> sp. e abiótico acibenzolar-S-metil - ASM e inoculadas com <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i> - Psg, coletadas em diferentes dias após o tratamento.....	135
20	Atividade de peroxidases (POX) em plantas de soja da cultivar BRS 246RR tratadas com os agentes biótico <i>Bacillus</i> sp. e abiótico acibenzolar-S-metil - ASM e inoculadas com <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i> - Psg, coletadas em diferentes dias após o tratamento.....	137
21	Atividade de β -1,3-glucanases em plantas de soja da cultivar BRS 243RR tratadas com os agentes biótico <i>Bacillus</i> sp. e abiótico acibenzolar-S-metil - ASM e inoculadas com <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i> - Psg, coletadas em diferentes dias após o tratamento.....	141
22	Atividade de β -1,3-glucanases em plantas de soja da cultivar BRS 246RR tratadas com os agentes bióticos <i>Bacillus</i> sp. e abiótico acibenzolar-S-metil - ASM e inoculadas com <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i> - Psg, coletadas em diferentes dias após o tratamento.....	143
23	Atividade de fenilalanina amônia-liase (PAL) em plantas de soja da cultivar BRS 243RR tratadas com os agentes bióticos <i>Bacillus</i> sp. e abiótico acibenzolar-S-metil - ASM e inoculadas com <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i> - Psg, coletadas em diferentes dias após o tratamento.....	146
24	Atividade de fenilalanina amônia-liase (PAL) em plantas de soja da cultivar BRS 246RR tratadas com os agentes biótico <i>Bacillus</i> sp. e abiótico acibenzolar-S-metil - ASM e inoculadas com <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i> - Psg, coletadas em diferentes dias após o tratamento.....	148

25	Atividade de polifenoloxidase (PPO) em plantas de soja da cultivar BRS 243RR tratadas com os agentes biótico <i>Bacillus</i> sp. e abiótico acibenzolar-S-metil - ASM e inoculadas com <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i> - Psg, coletadas em diferentes dias após o tratamento.....	151
26	Atividade de polifenoloxidase (PPO) em plantas de soja da cultivar BRS 246RR tratadas com os agentes biótico <i>Bacillus</i> sp. e abiótico acibenzolar-S-metil - ASM e inoculadas com <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i> - Psg, coletadas em diferentes dias após o tratamento.....	153

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Método do disco de papel de filtro impregnado com agentes, A- Estreptomicina 5 mg/mL; B- Agente biótico <i>Bacillus</i> sp.; C- Agente abiótico Acibenzolar-S-Metil (ASM).....	42
2	Folíolos de cultivares de soja submetidos à suspensão bacteriana de <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i> A= BRS 244RR, B= BRS 255RR, C=BRS 243RR, D= BRS 246RR, E= BRS 246RR inoculada com <i>Bacillus</i> sp. (isolado UPF 008), F= BRS 246RR seção com acibenzolar-S-metil.....	95

**USO DE *Bacillus* sp. E ACIBENZOLAR-S-METIL COMO
INDUTORES DE RESISTÊNCIA AO CRESTAMENTO
BACTERIANO EM SOJA (*Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*)**

**CHEILA CRISTINA SBALCHEIRO¹; NORIMAR D'ÁVILA
DENARDIN² & FRANCISMAR CORRÊA MARCELINO³**

RESUMO – O crestamento bacteriano da soja, incitado por *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* (Psg), é responsável por expressivos danos na cultura e por reduções no rendimento e na qualidade dos grãos. A doença é agravada, principalmente, pelo fato de poucas cultivares apresentarem resistência ao patógeno e não haver medidas de controle eficientes. A indução de resistência em plantas contra fitopatógenos é um método alternativo de controle de doenças e envolve a ativação de resistência latente na planta. Este tipo de indução pode ser promovida por agentes bióticos e abióticos. A bactéria *Bacillus* sp. têm sido amplamente utilizada como agente biótico de indução de resistência em diversos patossistemas com resultados superiores em relação aos métodos tradicionais de controle de doenças. O agente abiótico acibenzolar-S-metil (ASM), também proporciona a indução de resistência em diversas culturas contra um amplo espectro de patógenos. Assim, os agentes biótico e abiótico

¹ Bióloga, Mestre em Agronomia, Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Agronomia da FAMV/UPF, Área de Concentração em Fitopatologia.

² Orientadora, Bióloga, Dra. Professora da FAMV/UPF – norimar@upf.br

³ Co-orientadora, Bióloga, Dra. Pesquisadora da Embrapa Soja – francm@cnpso.embrapa.br

foram testados quanto ao poder de controle do patógeno *in vitro* e a sensibilidade de *Bacillus* sp. a produtos químicos utilizados na cultura da soja para controle de doenças. Cultivares de soja foram testadas quanto à reação ao patógeno e ao agente biótico e fitotoxicidade de ASM. Os agentes biótico e abiótico foram testados em casa de vegetação no controle do cretamento bacteriano por indução de resistência e alterações enzimáticas provocadas com a sua aplicação e a inoculação da fitobactéria. Os resultados com o presente trabalho permitiram inferir que os agentes *Bacillus* sp. e ASM não promoveram controle significativo de *Psg in vitro* e não demonstraram fitotoxicidade em plantas de soja. No entanto, a doença foi significativamente controlada pelos agentes biótico e abiótico em casa de vegetação com a aplicação foliar antes da inoculação com o patógeno. A aplicação de *Bacillus* sp. e ASM, bem como a inoculação com *Psg*, promoveram alterações na atividade das enzimas peroxidase, β -1,3-glucanase, fenilalanina amônia-liase e polifenoloxidase em cultivares de soja resistente e suscetível ao cretamento bacteriano.

Palavras-chave: controle da doença, indução de resistência, atividade enzimática

**USE OF *Bacillus* sp. AND ACIBENZOLAR-S-METHYL AS
INDUCER OF RESISTANCE TO SOYBEAN IN BACTERIAL
BLIGHT (*Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*)**

ABSTRACT – The bacterial blight of soybean, induced by *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* (Psg), is responsible for significant crop damage and reductions in yield and grain quality. The disease is aggravated mainly because few cultivars and their resistance to the pathogen no efficient control measures. Induction of resistance in plants against pathogens is an alternative method of disease control and involves the activation of latent resistance in plant. This type of induction can be promoted by biotic and abiotic agents. The bacterium *Bacillus* sp. has been widely used as a biotic agent for induction resistance in several pathosystems with superior results compared to traditional methods of disease control. The abiotic agent acibenzolar-S-methyl (ASM), also provides the induction of resistance in several crops against a broad spectrum of pathogens. Thus, the biotic and abiotic agents were tested for power to control the pathogen *in vitro* and the sensitivity of *Bacillus* sp. the chemicals used in soybean crop for disease control. Soybean cultivars were tested for resistance to the pathogen and the agent biotic and phytotoxicity of ASM. The biotic and abiotic agents were tested in a greenhouse in the control of bacterial blight resistance induction and enzymatic changes caused in its application and inoculation of phyto bacteria. The results of this study allowed to infer that agents *Bacillus* sp. and ASM did not promote significant control of Psg *in vitro* and showed no

phytotoxicity in soybean. However, the disease was significantly controlled by biotic and abiotic agents in the greenhouse with the foliar application before inoculation with the pathogen. The application of *Bacillus* sp. and ASM, as well as inoculation with Psg promoted changes in the activity of peroxidase, β -1,3-glucanase, phenylalanine ammonia-lyase and polyphenoloxidase in soybean cultivars resistant and susceptible to bacterial blight.

Key words: disease control, induced resistance, enzymatic activity

1 INTRODUÇÃO

A cultura da soja é uma das mais importantes no Brasil, em função de seu alto valor sócio-econômico, determinado pelas inúmeras aplicações de seus produtos e subprodutos e consequente expressão no mercado interno e externo. No entanto, a cultura desta oleaginosa é frequentemente ameaçada com a ocorrência de um vasto número de doenças, causando depreciação do produto, redução no rendimento e perdas econômicas para os sojicultores (ALMEIDA et al., 2005).

As perdas anuais de produção devido à ocorrência de cerca de 50 doenças na cultura da soja variam de 20 a 100%, dependendo das condições climáticas, o ano, a região, as cultivares predominantes, da agressividade do patógeno e das medidas de controle adotadas (SILVA et al., 2002; ALMEIDA et al., 2005).

O crestamento bacteriano é a doença de etiologia bacteriana de maior importância da cultura da soja, devido ao patógeno ser transmitido via semente e permanecer nos restos culturais. As perdas causadas por esta doença podem chegar a 40% em lavouras com condições favoráveis à ocorrência do patógeno (HARTMAN, 1999).

O controle químico para essa bacteriose, com a aplicação de antibióticos e fungicidas, tem sido pesquisado, entretanto, devido ao rápido aumento do inóculo e fácil disseminação do patógeno, em muitos casos, não tem sido eficiente. Além disso, as cultivares nacionais apresentam baixa ou nenhuma resistência a *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* (REUNIÃO..., 2009).

A utilização de micro-organismos, como o *Bacillus* sp. com capacidade de induzir resistência em plantas, têm sido amplamente estudado como uma estratégia de controle de doenças, juntamente com indutores químicos como o acibenzolar-S-metil, em inúmeras culturas e para um vasto espectro de patógenos (GUZZO et al., 2001; YUEN et al., 2001).

O controle de doenças de plantas seja de etiologia bacteriana, fúngica ou virótica, pode ser obtido por estímulo específico de mecanismos de resistência da planta à enfermidade, induzido por ação biológica ou não. A indução de resistência, indiscutivelmente, constitui estratégia para controle de doenças em plantas e será componente indispensável em medidas curativas e preventivas, na forma de alternância com os produtos químicos (RESENDE et al., 2002; BOKSHI et al., 2003).

Devido ao impacto causado pelo crestamento bacteriano na cultura da soja, o presente trabalho objetivou testar o agente biótico *Bacillus* sp. e o agente abiótico acibenzolar-S-metil como indutores de resistência, na forma de controle preventivo da doença, em ensaios *in vitro* e *in vivo*, bem como observar as alterações na atividade enzimática, em plantas de soja resistentes e suscetíveis a *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*, promovido pelo tratamento com os agentes e inoculação do patógeno.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A cultura da soja

A soja cultivada pertence à divisão *Magnoliophyta*, classe *Magnoliopsida*, subclasse *Rosidae*, ordem *Fabales*, família *Fabaceae*, subfamília *Faboideae*, gênero *Glycine* L., subgênero *Glycine* subg. soja (Moench) e espécie *Glycine max* (L.) Merrill.

A cultura da soja é uma das mais importantes no Brasil, em função de seu alto valor sócio-econômico, determinado pelas inúmeras aplicações de seus produtos e subprodutos e expressão no mercado interno e externo. A proteína da soja é amplamente utilizada na alimentação animal e o óleo na alimentação humana, além da crescente participação na alimentação humana e na obtenção de outros produtos como adubo, revestimentos, papel, tintas e combustível (REUNIÃO..., 2006).

Os investimentos em pesquisa e assistência técnica fizeram a produtividade média da soja brasileira atingir 2.823 kg/ha na safra 2006/2007 (CONAB, 2007) e, atualmente, o Brasil figura como o segundo produtor mundial dessa oleaginosa, sendo responsável, juntamente com os EUA (1º produtor mundial) e Argentina (3º produtor mundial), por cerca de 80% da produção mundial desse grão. Na safra 2005/2006 brasileira foram plantados 22,2 milhões de hectares de soja, resultando numa produção de 53,41 milhões de toneladas e com uma produtividade de 2.403 kg/ha (CONAB, 2006). Entretanto, na safra 2006/2007, a cultura ocupou uma área de 20,687 milhões de hectares totalizando uma produção de 58,4 milhões de

toneladas com uma produtividade média de 2.823 kg/ha (CONAB, 2007).

A safra de 2007/2008 atingiu uma produção de 60 milhões de toneladas com uma área plantada de 21,3 milhões de hectares e uma produtividade média de 2.816 kg/ha. O Brasil se mantinha com uma produtividade média em torno de 2.800 kg/ha por alguns anos. No entanto, na safra 2008/2009 esta produtividade baixou para 2.629 kg/ha, com uma área plantada de 21,7 milhões de hectares e uma produção de 57,1 milhões de toneladas (CONAB, 2009).

Na safra 2009/2010, com aproximadamente 23,36 milhões de hectares de área destinados ao plantio da soja no Brasil, 7,4% superior a safra 2008/2009, a produção nacional atingiu quase 68,71 milhões de toneladas com uma produtividade média de 2.941 kg/ha, 11,9% superior a safra passada (CONAB, 2010).

Dentre os estados brasileiros, o Estado do Rio Grande do Sul situa-se em 3º lugar em participação na produção nacional de soja. No entanto, o Estado está entre os de menor produtividade, com menos de 2.070 kg/ha na safra 2008/2009 e de 2.490 kg/ha na safra 2009/2010 (CONAB, 2010).

Para a obtenção de maiores rendimentos por área é indispensável, além de técnicas adequadas de cultivo, a utilização de cultivares adaptados e de preferência que apresentem resistência aos principais patógenos que acometem a cultura. Desta maneira, a soja tem sido objeto de intensa atividade de pesquisa, com vistas à obtenção de informações que possibilitem aumento de qualidade e produtividade.

Entre os principais fatores limitantes à obtenção de elevados rendimentos, está a ocorrência de doenças, sendo que, cerca de 50 doenças na cultura da soja já foram identificadas no Brasil, abrangendo aquelas provocadas por fungos, bactérias, vírus e nematóides. A importância de cada uma delas varia com o ano, a região, as cultivares predominantes, a data de semeadura e as práticas agronômicas adotadas (SILVA et al., 2002). As perdas anuais de produção devido a essas doenças são estimadas em cerca de 15 a 20%, mas algumas doenças podem ocasionar perdas de quase 100% (ALMEIDA et al., 2005).

Em meio às doenças que incidem sobre a cultura da soja, três são de origem bacteriana: a pústula bacteriana, causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*, o fogo selvagem, causado por *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* e o crestamento bacteriano incitado por *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*. As duas primeiras doenças não representam grandes problemas para a cultura, pois a maioria das cultivares em uso comercial apresenta resistência a estas espécies de patógenos. No entanto, o crestamento bacteriano é uma doença em potencial em praticamente todas as regiões de cultivo da soja (FERREIRA, 1994).

2.1.1 Crestamento bacteriano da soja

O crestamento bacteriano é uma das doenças mais comuns nas regiões produtoras de soja, com distribuição mundial e de maior ocorrência em locais de clima temperado, onde as temperaturas são mais amenas e a doença aparece com maior severidade. De acordo

com Sinclair & Backman (1989), as perdas causadas por essa doença podem variar de 5-18%. Dunleavy et al. (1960) determinaram que as perdas podem chegar a 22% em locais com condições favoráveis ao desenvolvimento da doença.

Williams & Nyvall (1980) detectaram perdas de 17,9% na cultura. Nos EUA, os danos com a ocorrência desta bacteriose na cultura da soja chegam a 40% (HARTMAN, 1999). Entretanto, não há estudos conclusivos sobre perdas e danos por essa fitobacteriose na cultura da soja para o Brasil.

A bactéria *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* (Coerper) Young, Dye & Wilkie, é o agente etiológico do crestamento bacteriano da soja. É uma doença comum em folhas, mas pode ser encontrada em outros órgãos da planta, como hastes, pecíolos e vagens (HENNING et al., 2005). As infecções primárias desta bacteriose têm origem em sementes infectadas, em resíduos culturais de safras anteriores ou no próprio solo, enquanto as transmissões secundárias são favorecidas por períodos úmidos e temperaturas amenas.

Os sintomas nas folhas surgem como pequenas manchas, de aparência translúcida e circundadas por um halo de coloração verde-amarelada. Mais tarde essas manchas necrosam e adquirem contornos aproximadamente angulares, chegando a coalescer e formar extensas áreas de tecido morto entre as nervuras secundárias. Na face inferior da folha, as manchas são de coloração quase negra apresentando uma película brilhante nas horas úmidas da manhã formadas pelo exsudato da bactéria (ALMEIDA et al., 2005).

Nos estádios jovens da planta, infecções severas conferem aparência enrugada às folhas, como se houvessem sido infectadas por vírus. Ataques severos causam rasgamento dos espaços internervais da folha e causam a sua queda. Geralmente, a bacteriose é mais severa nos estádios que antecedem a floração, podendo causar até 20% de desfolha (ALMEIDA et al., 2005).

O patógeno é transmitido via semente e permanece nos restos culturais. As sementes contaminadas ao germinarem servem de fonte de inóculo primário no campo. A bactéria *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* (Psg), em região de clima temperado, sobrevive fora da estação de cultivo, tendo viabilidade de aproximadamente 16 meses em semente de soja (AGARWAL & SINCLAIR, 1987).

No Brasil, essa bactéria está presente em todas as áreas cultivadas com soja, sendo que oito raças fisiológicas já foram descritas no país: R2, R3, R4, R6, R7, R10, R11 e R12. Dentre estas, a mais comum é a raça R3 (EMBRAPA SOJA, 2007). Os cultivares recomendados para o cultivo não apresentam resistência, com raras exceções, às raças deste patógeno. No entanto, têm sido observadas variações regionais, atingindo baixos e altos graus de infecção. Possivelmente, devido às variações climáticas e a existência de diferenças específicas entre as raças da bactéria (YORINORI, 2002; ALMEIDA et al., 2005).

Pouco progresso tem sido obtido com relação ao controle de fitobacterioses, sendo as medidas recomendáveis sempre preventivas. No manejo integrado de patógenos associados às sementes, o tratamento químico constitui uma das principais medidas. Os

métodos de controle mais indicados para esta doença são o uso de variedades resistentes, um bom preparo do solo e o uso de sementes provenientes de lavouras desprovidas do patógeno (ALMEIDA et al., 2005).

Na busca de alternativas para manejo de fitobactérias, visando sistemas agrícolas produtivos subsidiados por “boas práticas agrícolas”, além do melhoramento genético clássico, investigações que se valem do manejo de agentes indutores de mecanismos de resistência constituem estratégias promissoras, pois estes possuem ampla ação sobre o espectro de fitopatógenos.

2.2 Interação planta-patógeno

A interação planta-patógeno envolve mecanismos bioquímicos onde os genes de alerta são ativados, resultando na síntese de novos compostos e no aumento da atividade enzimática, importante para a defesa da planta. Além disso, ocorre a formação de barreiras estruturais e da produção de compostos tóxicos, que resultam no atraso da infecção.

As plantas são continuamente expostas a um grande número de patógenos, como resultado apresenta um complexo mecanismo de defesa para reconhecer e se proteger, através da montagem de barreiras que restringem a invasão do patógeno. A resistência natural de plantas a micro-organismos patogênicos baseia-se numa grande variedade de barreiras químicas e físicas que promovem os mecanismos de defesa pré-existentes, denominados de constitutivos. Além destes, as plantas possuem mecanismos de defesa

eficientes que permanecem inativos ou latentes, que são acionados ou ativados após a célula vegetal entrar em contato com agentes de indução, tanto patógenos como outros micro-organismos ou produtos abióticos. Nesse caso, a resistência é dita dinâmica, pós-infeccional ou induzida (COLSON & DEVERAL, 1996; AGRIOS, 1997; STICHER et al., 1997; FODOR et al., 1998).

Em uma relação incompatível planta-patógeno, a combinação de barreiras químicas e estruturais impede o sucesso do patógeno. A planta reconhece o patógeno, emite um sinal mensageiro, que desencadeia uma série de outros sinais, como o reconhecimento em nível de membrana das proteínas *R* da planta com as proteínas *avr* do patógeno. Isto desencadeia uma cascata de transdução de sinais que irá culminar na reação de hipersensibilidade, resistência sistêmica adquirida e ativação de genes ligados a defesa ou aumentar a atividade de enzimas importantes para reações de defesa. Havendo a ativação desses genes, ocorre a produção sincronizada, localizada e/ou sistêmica de produtos que vão deter ou atrasar a colonização pelo patógeno. Na relação compatível planta-patógeno, alguma etapa desse mecanismo falha, ocorrendo a doença (MORAES, 1998).

O reconhecimento da planta ao micro-organismo ocorre devido à interação de uma molécula elicitora do patógeno ou da própria planta, que é liberada por ação do patógeno, e de um receptor protéico presente na membrana celular da planta (HAHN, 1996; MÉTRAUX, 2001). Alguns dos elicitores são capazes de ativar mecanismos de defesa de plantas (WULFF & PASCHOLATI, 1999; COVENTRY & DUBERY, 2001).

O estudo dos diversos mecanismos de defesa local e sistêmico, constitutivos e induzíveis, desenvolvidos ao longo do processo de co-evolução entre patógeno e hospedeiro, revelou a possibilidade de ativação de respostas de defesa sistêmica preventiva em plantas contra patógenos (QUERINO et al., 2005).

Plantas tratadas com moléculas elicitoras podem levar não apenas a uma resposta de resistência, mas a uma expressão sincronizada de diversos mecanismos de defesa, culminando com a indução de resistência, tendo em vista que este fenômeno é caracterizado pela transformação de uma relação compatível entre planta e patógeno, em que ocorre a doença, numa relação incompatível (MORAES, 1998).

2.3 Indução de resistência

O fenômeno de indução de resistência sistêmica adquirida ou resistência sistêmica adquirida (SAR) é conceituado como sendo a ativação de um estado de resistência contra doenças, induzido sistemicamente em plantas pela infecção localizada por fitopatógenos ou em resposta ao tratamento com diferentes agentes bióticos ou abióticos (STICHER et al., 1997; HAMMERSCHMIDT et al., 2001; KUĆ, 2001).

Este fenômeno foi extensivamente caracterizado nas mais diferentes culturas, entre elas feijão, tomate, café, soja e fumo, em vários patossistemas, conferindo uma proteção sistêmica de longa duração e amplo espectro, sendo efetiva contra doenças causadas por

diferentes agentes bióticos, tais como vírus, bactérias, fungos e nematóides (OKA & COHEN, 2001).

A primeira etapa que compõe a resposta da planta a um indutor é o reconhecimento do indutor pela planta, após o contato deste, seja na parte aérea ou nas raízes. Este reconhecimento gera alterações que culminam com a geração de um sinal primário que pode ser translocado para outros locais diferentes do local de atuação. Este sinal leva a produção de substâncias como às proteínas relacionadas à patogênese, que podem atuar diretamente sobre o patógeno ou promover a ativação de mecanismos de defesa dormentes (HAMMERSCHMIDT, 1999).

A indução de resistência resulta na restrição do crescimento de fitopatógenos e conseqüentemente, na supressão ou diminuição dos sintomas de doenças, devido à ativação dos mecanismos de resistência das plantas, associada à expressão coordenada de um conjunto de genes de defesa (MÉTRAUX, 2001).

Essas respostas de defesa, que incluem formação de papilas, lignificação de parede celular, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), reação de hipersensibilidade (HR), expressão de proteínas relacionadas à patogênese (PRPs), como quitinases e glucanas, além do acúmulo de metabólitos antimicrobianos, tais como fitoalexinas, são conhecidos como sinais de resposta à indução de resistência (SCHENK et al., 2000; NANDAKUMAR et al., 2001).

Um arranjo de eventos bioquímicos é observado em células vegetais em poucos minutos após a indução, ocorrendo à ativação da expressão de genes que codificam enzimas da via dos fenilpropanóides, proteínas PR, peroxidases e lipoxigenases. A

ativação destes genes é importante para o mecanismo de defesa no local onde a infecção ocorre (MORAES, 1998).

A SAR promove uma série de alterações bioquímicas e estruturais, destacando-se o acúmulo do ácido salicílico e espécies reativas de oxigênio, reforço de parede celular por lignificação (ANTEROLA & LEWIS, 2002), aumento na atividade de enzimas relacionadas a vias secundárias do metabolismo e síntese de fitoalexinas (HE et al., 2002). Além disso, a SAR está primariamente associada à expressão de genes que codificam proteínas relacionadas à patogênese (OKUSHIMA et al., 2000). Envolve ainda múltiplos eventos bioquímicos e fisiológicos compondo um mecanismo de resistência induzida contra a infecção.

Uma grande variedade de enzimas está relacionada com a resistência induzida, tais como peroxidases, polifenoloxidasas, fenilalanina amônia-liases, lipoxigenases, β -1,3-glucanases e quitinases (HAMMERSCHMIDT, 1999, MARIANO & KLOEPFER, 2000). Quitinases e β -1,3-glucanas são PRPs que degradam a parede celular de patógenos liberando moléculas que agem como elicitores, nas etapas iniciais do processo de indução de resistência, de fitoalexinas e de compostos fenólicos (VAN LOON et al., 1994). Estas enzimas atuam na catalisação de moléculas envolvidas na formação de lignina e outros fenóis que contribuem para o desencadeamento de barreiras de defesa, reforçando as estruturas das células das plantas (SILVA et al., 2004).

As peroxidases (POX, EC 1.11.1.7) são hemoproteínas de oxidorreductase, específicas para acceptor de hidrogênio (ALFENAS, 1998), têm afinidade por substratos envolvidos na lignificação celular

e seus produtos têm atividade antimicrobiana direta na presença de peróxido de hidrogênio (CAMPOS et al., 2004).

A enzima fenilalanina amônia-liase (PAL, EC 4.3.1.5) gera precursores para a biossíntese de lignina e outros compostos fenólicos que se acumulam em resposta à infecção (ZHAO et al., 2005). As polifenoloxidasas (PPO, EC 1.10.3.1) estão envolvidas na rota biossintética dos fenilpropanóides e produzem quinonas por meio da oxidação de fenóis (LI & STEFFENS, 2002). Os produtos da ação de lipoxigenases contribuem para as reações de defesa inibindo o crescimento do patógeno, induzindo fitoalexinas e participando na transdução de sinais (NAMAI et al., 1990).

A resistência também pode ser ativada em plantas suscetíveis, após a infecção localizada por fitopatógenos ou em resposta ao tratamento com agentes bióticos ou abióticos (STICHER et al., 1997; HAMMERSCHMIDT et al., 2001).

Segundo Hammerschmidt & Kuc (1995) a SAR pode ser induzida por micro-organismos, preparações microbianas ou compostos químicos. Conforme Ryals et al. (1996), um indutor de resistência precisa satisfazer três características para ser assim classificado: a) deve induzir resistência contra o mesmo espectro de patógenos que a resistência ativada biologicamente; b) o composto ou seus metabólicos não deve apresentar atividade antimicrobiana direta; c) deve ocorrer indução dos mesmos mecanismos bioquímicos observados após a indução de resistência por patógenos. O amplo espectro de ação da indução de resistência torna esta alternativa mais vantajosa quando comparada as outras formas de controle (WEI et al., 1991).

A indução de resistência constitui estratégia para o controle de doenças em plantas e, no futuro, será um componente indispensável de medidas, tanto curativas como preventivas.

2.3.1 Resistência induzida por agentes bióticos

As interações entre micro-organismos patogênicos e antagonísticos podem ser divididas em seis mecanismos: antibiose, competição, hipovirulência, parasitismo, predação e indução de defesa do hospedeiro, sendo que o antagonista pode exercer mais de um mecanismo, aumentando o potencial de controle (BETTIOL & GHINI, 1995). Desta forma, a resistência induzida por agentes bióticos apresenta-se como uma estratégia de controle de doenças em plantas.

Diferentes compostos inorgânicos e/ou orgânicos não relacionados estruturalmente e diversas substâncias de origem biótica induzem resistência em plantas ao ataque por insetos herbívoros e doenças causadas por fungos, bactérias, vírus e nematóides (KESSMANN et al., 1994; STICHER et al., 1997; BOSTOCK et al., 2001; HAMMERSCHMIDT et al., 2001; KUĆ, 2001; OOESTENDORP et al., 2001; HEIL & BOSTOCK, 2002).

Essas substâncias foram denominadas de indutores devido a sua capacidade de induzir resistência contra doenças em plantas tratadas sem, entretanto, apresentar um efeito antimicrobiano direto sobre o patógeno.

Diversos compostos de origem microbiana, com capacidade de estimular uma ou mais respostas de defesa, já foram

isolados e caracterizados (SILVA et al., 2001; LABANCA, 2002; SBALCHEIRO, 2006, MABROUK et al., 2007). O tratamento de plantas com moléculas ou micro-organismos indutores pode levar não apenas a uma resposta de resistência, mas a uma expressão sincronizada de diversos mecanismos de defesa, culminando com o que é chamado de indução de resistência (LABANCA, 2002).

Diversos estudos evidenciam a ativação de mecanismos de resistência e proteção de plantas contra inúmeros fitopatógenos utilizando *Saccharomyces cerevisiae* e compostos originados dessa levedura (SILVA & PASCHOLATI, 1992; STANGARLIN & PASCHOLATI, 1994; LYON et al., 1995; PICCININ, 1995; PASCHOLATI, 1998; LABANCA, 2002; CARDOSO FILHO, 2003).

Bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* apresentam grande potencial como agentes de controle biológico, pois mantêm sua viabilidade quando estocadas por longos períodos (PETRAS & CASIDA, 1985).

Diversos trabalhos relatam a utilização de *Bacillus* sp. como agente controlador de patógenos. Amorim & Melo (1999) utilizaram uma mistura de *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas putida* e *P. fluorescens* contra *Phytophthora citrophthora* e *Phytophthora parasitica* em plântulas de citros. Já Lagunas et al. (2001) inocularam sementes de tomate com misturas de *Bacillus* (B2, B3 e B10) e observaram a inibição *in vitro* de *Phytophthora capsici*.

A indução de resistência local e sistêmica na cv. Novo Mundo de cafeeiro, contra ferrugem (*Hemileia vastatrix*), foi obtida através de tratamento prévio das plantas com uma formulação comercial de *Bacillus thuringiensis*, tendo sido correlacionada com a

síntese das proteínas-PR, β -1,3-glucanases e quitinases (GUZZO & MARTINS, 1996).

Batista Junior et al. (2002) trabalhando com isolados de *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus* spp., observaram efeito inibitório sobre o crescimento micelial dos fungos fitopatogênicos *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*, *F. solani* f. sp. *glycines*, *F. oxysporum* e *Colletotrichum* sp., concluindo que estas bactérias produzem enzimas que atuam sobre a parede celular fúngica. O potencial antagônico de *B. subtilis* a fungos patogênicos de diversas culturas foi investigado por muitos pesquisadores, obtendo-se uma variabilidade grande entre as estirpes de *Bacillus* em relação à ação fitopatogênica (BETTIOL & KIMATI, 1990; KREBS et al., 1993; LUZ, 1994).

Halverson & Handelsman (1991) relacionaram a produção de fitormônios, pectinas ou sinais moleculares em *Bacillus cereus* e a sua contribuição positiva na nodulação com rizóbio, desde que os metabólitos de *Bacillus* não sejam tóxicos ao rizóbio, este pode ser co-inoculado e ainda diminuir o ataque de patógenos em raízes e aumentar a nodulação (ARAÚJO & HUNGRIA, 1999).

A indução de resistência em cevada, em condições de campo, através da aplicação de filtrado de *B. subtilis* foi observada contra *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*, apresentando uma redução de 40% na área foliar infectada nas plantas induzidas, além de obter maior produtividade e qualidade de grãos (KEHLENBECK & SCHÖNBECK, 1995).

Expressivo aumento na atividade de peroxidases em tomateiro induzido por *B. cereus* isolado de solo rizosférico foi verificado por Silva et al. (2004). Estes autores também relacionaram

o aumento enzimático com a resistência do tomateiro aos patógenos *Alternaria solani*, *Corynespora cassiicola*, *Oidium lycopersici*, *Stemphylum sola* e *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*.

Respostas de defesa induzidas por micro-organismos e/ou por produtos sintéticos de indução de resistência, com potencial de uso como biocontroladores e/ou bioativadores, poderão subsidiar o desenvolvimento de produtos biológicos e a criação de novos cultivares, assegurando competitividade, não apenas em termos quantitativos como, fundamentalmente, em termos qualitativos.

2.3.2 Resistência induzida por agentes abióticos

Inúmeros compostos químicos foram identificados como ativadores de resistência, como por exemplo, o ácido salicílico (AS), ácido dicloroisonicotínico (INA), silício, fosfato, 2-tiouracila, ácido poliacrílico, ácidos nucleicos e fosetil de alumínio.

A indução de resistência através de agentes abióticos despertou a atenção da comunidade acadêmica e da área comercial. Diversos produtos são comercializados atualmente como indutores dos mecanismos de resistência nas plantas. Dentre os produtos registrados como indutores de resistência de plantas destaca-se o Bion® (acibenzolar-S-metil-ASM).

O ASM é um éster S-metil do ácido benzo-(1,2,3)-tiadiazole-7 carbotióico, um composto do grupo benzotiadiazole e análogo do ácido salicílico, e caracteriza-se pelo seu comportamento de ativar a resistência, possibilitando a proteção de plantas contra um amplo espectro de patógenos (GÖRLACH et al., 1996).

Em diferentes patossistemas foram observadas respostas positivas de indução de resistência pela ação do ácido salicílico (PALVA et al., 1994) e dos seus análogos funcionais, como INA e o acibenzolar-S-metil (ASM) como indutores da SAR (MÉTRAUX et al., 1991; GÖRLACH et al., 1996; MAUCHI-MANI & MÉTRAUX, 1998).

O composto sintético acibenzolar-S-metil confere proteção em plantas de fumo (70 a 97% para uma concentração de 1200 μ M) contra o Tobacco mosaic virus-TMV, os fungos *Cercospora nicotianae*, *P. tabacina*, *Phytophthora parasitica* e as bactérias *Erwinia carotovora* e *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (FRIEDRICH et al., 1996) e em plantas de trigo (87% para uma concentração de 300 μ M) contra o fungo *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* (GÖRLACH et al., 1996).

A aplicação de ASM em *Arabidopsis thaliana* 72 h antes da inoculação com patógenos promoveu uma redução nos sintomas das doenças causadas pelo fungo *P. parasitica*, pela bactéria *P. syringae* pv. *tomato* e pelo vírus TCV (*Turnip crinkle virus*) (LAWTON et al., 1996). Plântulas de tomate pré-tratadas com ASM mostraram uma redução na severidade do cancro bacteriano causado por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, sendo a proteção correlacionada com uma redução de 68% no crescimento da bactéria durante a patogênese (BAYSAL et al., 2003).

No entanto, em plantas de tomate a resistência foi ativada pelo ASM contra *Phytophthora infestans*, mas nenhum efeito protetor significativo foi observado em plantas de batata contra o mesmo patógeno (TALLY et al., 1999). Baseado em estudos com outras

culturas, os autores concluíram que o espectro de resistência ativado por ASM é específico e determinado para cada espécie vegetal.

A ativação de SAR foi observada em diversas culturas, como pepino (NARUSAKA et al., 1999), cafeeiro (GUZZO et al., 2001; MARCHI et al., 2002), cacauzeiro (RESENDE et al., 2002), roseira (SUO & LEUNG, 2002), batata (BOKSHI et al., 2003), feijoeiro (IRITI & FAORO, 2003). Na maioria dos casos, o ASM não apresenta atividade antimicrobiana direta sobre os patógenos, sendo um produto de baixa toxicidade e sistêmico, que é rapidamente absorvido e translocado através das plantas (RUESS et al., 1996; OOSTENDORP et al., 2001).

Em experimentos realizados *in vitro* com ASM e seus metabólitos, na concentração de 1,4 mM, demonstraram não afetar significativamente o desenvolvimento de dezoito fungos (FRIEDRICH et al., 1996). O produto não inibiu o desenvolvimento do fungo *H. vastatrix*, nas fases de pré-penetração (germinação e formação de apressórios), em cafeeiro (GUZZO et al., 2001) e não foi constatado efeito biocida *in vitro* do ASM sobre a germinação de uredíniosporos *H. vastatrix* (MARCHI et al., 2002). No entanto, foi verificado um efeito fungistático *in vitro* do ASM em *Colletotrichum graminicola* (PASCHOLATI et al., 1998).

Alguns estudos verificaram que o tratamento de plantas com ASM pode induzir resistência contra fitopatógenos. O tratamento de folhas de tomateiro com ASM (1,2 mM) induziu a resistência contra *P. syringae* pv. *tomato*, manifestada pela redução das lesões nas folhas protegidas sistemicamente. Acredita-se que o ASM ative mecanismos de defesa por promover barreiras bioquímicas e

estruturais em plantas geneticamente suscetíveis (MÉTRAUX et al., 1991; GÖRLACH et al., 1996; OLIVEIRA et al., 1997; MAUCHIMANI & MÉTRAUX, 1998; LATUNDE-DADA & LUCAS, 2001; LOUWS et al., 2001).

Os avanços da biologia molecular têm proporcionado melhor entendimento das interações planta-patógeno, ficando evidente que esse tipo de relação envolve fatores genéticos de ataque e de defesa presentes no patógeno e no hospedeiro, respectivamente, sob a influência do ambiente (RYALS et al., 1996; MÉTRAUX, 2001).

A utilização da indução de resistência como uma nova estratégia de controle de doenças de plantas significa um grande avanço da pesquisa e um componente importante nos programas de manejo de doenças. O uso de ativadores de resistência vegetal isoladamente ou associados a outras práticas agrícolas, deve ir de encontro às necessidades de uma agricultura sustentável, ou seja, com produtividade, qualidade e menor impacto ao meio ambiente e ao agricultor.

Apesar da indução de resistência ter um grande potencial de uso agrícola, esta não deve ser encarada como uma solução definitiva para todos os problemas fitossanitários, pois diversas etapas envolvidas na ativação dos mecanismos de indução de resistência ainda são desconhecidas e muitos estudos fazem-se necessários para elucidar as lacunas existentes na interação indutor-planta-patógeno.

CAPITULO I

CONTROLE *IN VITRO* DE *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* POR *Bacillus* SP. E ACIBENZOLAR-S-METIL

CHEILA CRISTINA SBALCHEIRO¹, NORIMAR D'ÁVILA
DENARDIN² & FRANCISMAR CORRÊA MARCELINO³

RESUMO - O controle *in vitro* de bactérias fitopatogênicas é utilizado para esclarecer os mecanismos de ação de um micro-organismo antagonista sobre o patógeno. A possibilidade de biocontrole *in vitro* permite determinar a melhor estratégia de controle de doenças *in vivo*. No presente trabalho verificaram-se diferentes métodos de antibiose do agente biótico *Bacillus* sp. sobre a bactéria *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*, visando constatar se a produção de compostos antimicrobianos é o principal mecanismos de ação, e também se o agente abiótico acibenzolar-S-metil (ASM) exerce algum efeito sobre este patógeno *in vitro*. Foram avaliados os agentes biótico e abiótico confrontados com a bactéria fitopatogênica através dos métodos da dupla camada de meio de cultura, incorporação dos agentes ao meio, disco impregnado com agentes e produção de compostos voláteis. Os resultados obtidos permitiram inferir que o agente biótico *Bacillus* sp. exerceu controle *in vitro* de *P.*

¹ Bióloga, Mestre em Agronomia, Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Agronomia da FAMV/UPF, Área de Concentração em Fitopatologia.

² Orientadora, Bióloga, Dra. Professora da FAMV/UPF – norimar@upf.br

³ Co-orientadora, Bióloga, Dra. Pesquisadora da Embrapa Soja– francm@cnpso.embrapa.br

savastanoi pv. *glycinea*, com a produção de compostos voláteis que inibem o crescimento bacteriano por até 72 h, caracterizando efeito bacteriostático. O agente abiótico ASM não apresentou efeito direto sobre o patógeno *in vitro*, confirmando a premissa de indutor de resistência.

Palavras-chave: antibiose, compostos voláteis, bacteriostático.

***IN VITRO* CONTROL *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* BY
Bacillus sp. AND ACIBENZOLAR-S-METHYL**

ABSTRACT - The *in vitro* control of plant pathogenic bacteria is used to elucidate the mechanisms of action of a micro-organism antagonist on the pathogen. The possibility of biological control *in vitro* to determine the best strategy for disease control *in vivo*. In the present study there were different methods of antibiosis biotic agent *Bacillus* sp. on the bacterium *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*, in order to ascertain whether the production of antimicrobial compounds is the main mechanism of action, and whether the agent abiotic acibenzolar-S-methyl (ASM) has an effect on this pathogen *in vitro*. We assessed the biotic and abiotic agents confronted with the bacterial infection by the methods of double layer medium, incorporation of agents to the medium, disk impregnated with agents and production of volatile compounds. The results allowed to infer that the biotic agent *Bacillus* sp. exerted control *in vitro* of *P. savastanoi* pv. *glycinea*, with the production of volatile compounds that inhibit bacterial growth by up to 72 hours, featuring a

bacteriostatic effect. The agent abiotic ASM showed no direct effect on the pathogen *in vitro*, confirming the premise of a resistance inducer.

Key words: antibiosis, volatile compounds, bacteriostatic.

1 INTRODUÇÃO

O controle biológico exercido por um ou mais micro-organismos, age reduzindo a intensidade de inóculo ou na capacidade de um patógeno incitar a doença. Os mecanismos envolvidos nesse controle são: parasitismo direto, predação, competição por nutrientes e nichos ecológicos, antibiose e produção de substâncias antibióticas e bacteriocinas, metabólitos ácidos ou tóxicos, competição trófica de elementos essenciais ao desenvolvimento do patógeno e pelo estímulo do hospedeiro por micro-organismos não necessariamente antagônicos, ativando mecanismos de resistência antagonistas (ROMEIRO, 1995).

Segundo Bettioli & Ghini (1995), a antibiose é a interação entre organismos, na qual um ou mais metabólitos produzidos por um organismo tem efeito danoso sobre o outro. Devido a isto, a antibiose representa um dos mais explorados mecanismos de controle biológico exercido por bactérias e frequentemente citada como fator responsável pela eficácia no controle de diversas doenças (JOCK et al., 2002; STOCKWELL et al., 2002).

Metabólitos de micro-organismos produzidos no meio em que crescem são conhecidos há muitos anos (YARBROUGH et al.,

1993). Segundo Keel et al. (1990) a função desses produtos pode ser ecológica-antagônica, inibindo o crescimento ou desenvolvimento de competidores a exemplo dos antibióticos produzidos por bactérias. Desta forma, a indústria tem explorado comercialmente substâncias metabólicas produzidas por fungos e bactérias (NARDO & CAPALBO, 1998). Com diversas finalidades, essas substâncias produzidas *in vivo* e/ou *in vitro*, têm sido estudadas para verificar a supressão de patógenos de plantas e para o esclarecimento do mecanismo envolvido no controle.

A escolha de diferentes metodologias para esclarecer o mecanismo envolvido no biocontrole de diferentes patógenos é de extrema importância, visando obter o máximo de informações e evitar a perda de potenciais agentes biocontroladores. Uma vez que, o modo de ação mais eficaz deve ser aquele capaz de afetar fases importantes para o estabelecimento do patógeno, o que varia em cada caso de acordo com as interações em cada patossistema (HANDLSMAN & STABB, 1996). No entanto, os modos de ação envolvidos são complexos e difíceis de serem elucidados (GERHARDSON, 2002).

Os programas de controle biológico e indução de resistência por agentes bióticos são baseados no processo de seleção de micro-organismos antagonistas e podem ser realizados *in vitro* ou *in vivo*, por meio de bioensaios realizados na presença do fitopatógeno, do antagonista e da planta hospedeira, inteira ou órgãos destacados (MARIANO, 1993). Devido a isto, deve-se testar de diferentes maneiras o antagonismo entre dois micro-organismos, para se estabelecer o mecanismo envolvido e a melhor estratégia de controle do patógeno.

O acibenzolar-S-metil (éster S-metil do ácido benzo-(1,2,3)-tiadiazole-7 carbotiólico) caracteriza-se por ser um indutor de resistência, ativando respostas de defesa em plantas, e assim não apresenta ação antimicrobiana direta sobre patógenos, ou seja, não interfere em fases importantes do desenvolvimento do patógeno (GÖRLACH et al., 1996; RUESS et al., 1996; OOSTENDORP et al., 2001).

O presente trabalho objetivou estabelecer o mecanismo exercido pelo agente biótico *Bacillus* sp. no controle *in vitro* de *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*, avaliar a possibilidade do envolvimento de compostos antimicrobianos produzidos por *Bacillus* sp. no controle *in vitro* e a ação de acibenzolar-S-metil sobre a fitobactéria.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Bacteriologia Vegetal da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo - FAMV/UPF.

Nos ensaios de controle de *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* (Psg) *in vitro* foram avaliados um agente biótico e um agente abiótico.

2.1 Preparo do agente biótico

O isolado *Bacillus* sp. (UPF 008), pertencente à coleção de micro-organismos antagonistas do Laboratório de Bacteriologia da

FAMV/UPF, foi utilizado como agente biótico neste trabalho devido à capacidade de exercer controle biológico sobre outras bactérias e apresentar indícios de indução de resistência.

Colônias puras do isolado, crescidas em meio de cultura 523 (KADO & HESKETT, 1970) por 48 h, foram utilizadas para preparar uma suspensão em solução fisiológica (0,85%) ajustada em espectrofotômetro (OD=540 nm) para uma absorbância de 0,500, equivalente a uma concentração aproximada de 6×10^5 UFC mL⁻¹ de *Bacillus* sp. Alíquotas dessa suspensão foram utilizadas nas diferentes metodologias de antibiose *in vitro*.

2.2 Preparo do agente abiótico

O produto químico acibenzolar-S-metil (ASM) na forma do produto comercial Bion® (Syngenta) foi utilizado como agente abiótico neste trabalho e selecionado pelo seu amplo espectro de ação na indução de resistência para diferentes doenças de diversas culturas.

A solução do agente abiótico foi preparada com 0,2 mg/mL de ASM em água destilada esterilizada. Esta solução foi utilizada nas diferentes metodologias empregadas para controle *in vitro* da bactéria Psg.

2.3 Preparo da bactéria fitopatogênica

A bactéria *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* (Psg) isolado 1219 pertencente a coleção do Instituto Biológico de Campinas e mantida na coleção da Bacterioteca da FAMV/UPF, foi

utilizada como patógeno desafiante. Colônias puras de Psg crescidas em meio de cultura 523, por 24 h, foram utilizadas para preparar uma suspensão em solução fisiológica (0,85%) ajustada em espectrofotômetro (OD=540 nm) para uma absorbância de 0,500, equivalente a uma concentração aproximada de $2,8 \times 10^5$ UFC mL⁻¹ de Psg. Alíquotas desta suspensão bacteriana foram utilizadas nos diferentes métodos de controle *in vitro*.

O antibiótico estreptomicina foi utilizado como parâmetro de controle no crescimento bacteriano de Psg. A solução foi preparada na concentração 0,5 mg/mL de estreptomicina em água destilada esterilizada. A solução de estreptomicina foi esterilizada por filtração em membrana de nitrocelulose (diâmetro do poro de 0,22 µm).

2.4 Método da dupla camada de meio de cultura

O teste de controle *in vitro* de Psg pelos agentes biótico e abiótico foi realizado adotando-se o método da dupla camada, sendo semeado o antagonista (agente biótico e agente abiótico conforme cada tratamento) na camada basal e o patógeno na sobre-camada (modificado de HALFELD-VIEIRA, 2002). O antibiótico estreptomicina foi utilizado na camada basal como controle do patógeno na sobre-camada.

A camada basal consistiu do meio de cultura 523 vertido em placas de Petri e mantidos em estufa a 24 °C por 24 h. Após esse período foram semeados 200 µl do antagonista e do antibiótico, conforme cada tratamento (Tabela 1), e espalhados sobre o meio de cultura com auxílio de alça de Drigalski, permanecendo em câmara de

fluxo laminar até a completa absorção pelo meio. Posteriormente, sobre a camada basal acrescentou-se a sobre-camada com meio de cultura 523 fundente a 40 °C, cobrindo completamente a primeira camada. Após a solidificação desta, adicionou-se 200 µl da suspensão bacteriana do patógeno, espalhando-se com alça de Drigalski. Para cada tratamento foram realizadas quatro repetições. Após completa absorção no meio de cultura, as placas foram mantidas em estufa bacteriológica a 28 ± 2 °C.

Tabela 1 - Tratamentos aplicados no método da dupla camada de meio de cultura para controle *in vitro* de *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* (Psg)

Tratamentos	Camada basal	Sobre-camada
T₁	Solução Fisiológica	Solução Fisiológica
T₂	Solução Fisiológica	Suspensão de Psg
T₃	Estreptomicina	Solução Fisiológica
T₄	Estreptomicina	Suspensão de Psg
T₅	<i>Bacillus</i> sp.	Solução Fisiológica
T₆	<i>Bacillus</i> sp.	Suspensão de Psg
T₇	Acibenzolar-S-metil	Solução Fisiológica
T₈	Acibenzolar-S-metil	Suspensão de Psg

A avaliação da capacidade de inibição foi observada pelo crescimento do agente biótico, crescimento ou inibição do desenvolvimento do patógeno comparado as testemunhas e pela capacidade de crescimento quando confrontado com o agente químico

acibenzolar-S-metil e o agente biótico *Bacillus* sp. As avaliações foram realizadas nos períodos de 24, 48 e 72 h após a incubação.

2.5 Método da incorporação de agentes biótico e abiótico ao meio de cultura

O meio de cultura 523 foi preparado conforme descrito por Kado e Heskett (1970), distribuindo-se 200 mL do meio em erlenmeyers. Após a autoclavagem, os meios de cultura foram mantidos em banho-maria até atingir a temperatura de 40 °C. Em cada meio de cultura adicionou-se 2 mL da solução antagonista (agente biótico e abiótico) conforme cada tratamento (Tabela 2), agitou-se levemente para a completa mistura dos mesmos e verteu-se em placas de Petri estéreis. Utilizou-se solução fisiológica 0,85% como tratamento controle.

As placas permaneceram em câmara de fluxo laminar por 12 h para solidificação do meio em ambiente estéril. Após este período foram depositados sobre o meio de cultura alíquotas de 200 µl da suspensão de Psg, espalhadas com auxílio da alça de Drigalski, realizando-se quatro repetições por tratamento. As placas foram mantidas em estufa bacteriológica a 28 ± 2 °C até o início das avaliações.

As avaliações do crescimento de Psg, sobre os meios de cultura com diferentes agentes incorporados, procederam-se 24, 48 e 72 h após a semeadura, observando se estes eram capazes de controlar o crescimento bacteriano quando confrontados com os agentes biótico e abiótico.

Tabela 2 - Tratamentos aplicados no método de incorporação dos agentes bióticos (*Bacillus* sp.) e abióticos (acibenzolar-S-metil) ao meio de cultura para controle *in vitro* de *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* (Psg)

Tratamentos	Incorporado ao meio de cultura	Adição sobre o meio de cultura
T₁	Solução Fisiológica	Solução Fisiológica
T₂	Solução Fisiológica	Suspensão de Psg
T₃	Estreptomicina	Solução Fisiológica
T₄	Estreptomicina	Suspensão de Psg
T₅	<i>Bacillus</i> sp.	Solução Fisiológica
T₆	<i>Bacillus</i> sp.	Suspensão de Psg
T₇	Acibenzolar-S-metil	Solução Fisiológica
T₈	Acibenzolar-S-metil	Suspensão de Psg

2.6 Método do disco de papel filtro impregnado com agentes biótico e abiótico

Discos de papel de filtro com diâmetro de 3 mm autoclavados foram impregnados com as diferentes soluções de agentes biótico e abiótico. Cada disco recebeu alíquotas de 10 μ l da solução conforme cada tratamento (Tabela 3). Após a completa absorção, repetiu-se o procedimento, mantendo-se em câmara de fluxo laminar até a absorção e secagem do disco de papel.

Nas placas contendo meio de cultura 523 foram depositados 200 μ l da suspensão de Psg, espalhados com auxílio da alça de Drigalski e mantidas na câmara de fluxo laminar até a

completa absorção pelo meio de cultura. Após este período, distribuíram-se três discos de papel de filtro impregnados com a solução antagonista em posições equidistantes em cada placa, com três repetições por tratamento, e mantidas em estufa bacteriológica a 28 ± 2 °C.

Tabela 3 - Tratamentos aplicados no método do disco de papel de filtro impregnado com os agentes biótico (*Bacillus* sp.) e abiótico (acibenzolar-S-metil) ao meio de cultura para controle *in vitro* de *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* (Psg)

Tratamentos	Adição sobre o meio de cultura	Disco de papel de filtro impregnado
T₁	Solução Fisiológica	Solução Fisiológica
T₂	Suspensão de Psg	Solução Fisiológica
T₃	Solução Fisiológica	Estreptomicina
T₄	Suspensão de Psg	Estreptomicina
T₅	Solução Fisiológica	<i>Bacillus</i> sp.
T₆	Suspensão de Psg	<i>Bacillus</i> sp.
T₇	Solução Fisiológica	Acibenzolar-S-metil
T₈	Suspensão de Psg	Acibenzolar-S-metil

As avaliações foram realizadas 24, 48 e 72 h após a distribuição dos discos impregnados. Para cada tratamento foi observado o crescimento do patógeno e do agente biótico, bem como a presença de halo de inibição e o seu tamanho medido em mm com o auxílio de paquímetro digital.

2.7 Produção de compostos voláteis *in vitro*

O teste para produção de compostos voláteis de *Bacillus* sp. e ASM, que possam exercer controle da bactéria *Psg in vitro*, foi realizado com o confronto entre as mesmas. Para isto, placas de Petri contendo meio de cultura 523 receberam alíquotas de 200 μ L da suspensão bacteriana de *Psg* espalhadas com auxílio de alça de Drigalski. O mesmo procedimento foi adotado para o agente biótico *Bacillus* sp., agente abiótico ASM e o antibiótico estreptomicina. As placas foram mantidas em câmara de fluxo laminar até a completa absorção desses pelo meio de cultura.

As tampas das placas foram removidas, utilizando-se apenas o fundo da placa de Petri contendo o meio de cultura. Os fundos das placas foram unidos frente a frente conforme cada combinação dos tratamentos (Tabela 4) e vedados com parafilme de modo a evitar a saída e entrada de compostos voláteis. Como controle foi utilizado culturas puras do patógeno e do agente biótico *Bacillus* sp., combinadas com placas contendo somente meio de cultura e solução fisiológica.

Para cada tratamento realizaram-se três repetições e as placas mantidas em estufa bacteriológica a 28 ± 2 °C até o período das avaliações. As avaliações foram realizadas 24, 48 e 72 h após o confronto das placas. Para cada tratamento foi observado o crescimento do patógeno e do agente biótico, bem como se houve diferenças em relação à testemunha e ao agente abiótico.

Tabela 4 - Tratamentos aplicados para verificação da produção de compostos voláteis *in vitro* pelos agentes biótico (*Bacillus* sp.) e abiótico (acibenzolar-S-metil) no controle de *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* (Psg)

Tratamentos	Meio de cultura 1	Meio de cultura 2
T ₁	Solução Fisiológica	<i>Bacillus</i> sp.
T ₂	Solução Fisiológica	Suspensão de Psg
T ₃	Estreptomicina	<i>Bacillus</i> sp.
T ₄	Estreptomicina	Suspensão de Psg
T ₅	<i>Bacillus</i> sp.	Suspensão de Psg
T ₆	Acibenzolar-S-metil	Suspensão de Psg
T ₇	Acibenzolar-S-metil	<i>Bacillus</i> sp.

2.8 Delineamento experimental

Os ensaios foram realizados em delineamento inteiramente casualizado, tomando-se como unidade experimental uma placa de Petri.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Método da dupla camada de meio de cultura

No método da dupla camada de meio de cultura foram observadas diferenças de crescimento bacteriano. Nos tratamentos T₅ e T₆ em que o agente biótico foi semeado na camada basal e posteriormente coberto com outra camada de meio de cultura,

observou-se o crescimento do mesmo sobre a última camada, ou seja, este passou a crescer também na sobre-camada. Desta forma, o *Bacillus* sp. não ficou restrito a camada basal, fato este que pode ter interferido no crescimento de Psg na sobre-camada (T₆).

No tratamento T₆, onde a Psg foi semeada na sobre-camada, não foi observado o crescimento desta até 72 h após a semeadura, permanecendo o meio de cultura semelhante ao da testemunha T₅. Após 72 h observou-se pequeno crescimento bacteriano, com poucas colônias de tamanho pequeno (aproximadamente 1 mm) e em quantidade inferior ao observado no tratamento controle T₂.

Estes resultados demonstram que o agente biótico *Bacillus* sp. exerce um efeito bacteriostático sobre *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea in vitro*, controlando o crescimento bacteriano por até 72 h. Também pode-se inferir que o agente biótico reduz o crescimento de Psg *in vitro* por um mecanismo ainda não completamente esclarecido.

Arsenijevic et al. (1998) verificaram que as bactérias do gênero *Pseudomonas* spp., *Bacillus* sp. e *Erwinia herbicola* não apresentaram antagonismo *in vitro* contra *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* e *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*, mas que ao serem microbiolizadas em sementes de feijoeiro apresentaram controle das bacterioses. Os resultados observados no presente trabalho e os dados disponíveis na literatura demonstram que o mecanismo de ação de *Bacillus* sp. é diferenciado em cada interação, variando conforme o patógeno.

No tratamento T₈ o crescimento da Psg não diferiu da testemunha T₂, ou seja, os dois tratamentos apresentaram o mesmo crescimento, confirmando que o agente abiótico acibenzolar-S-metil não exerce efeito *in vitro* sobre este patógeno. Segundo Friedrich et al. (1996), na maioria dos casos estudados com ASM, como produto comercial Bion®, não foi observada atividade antimicrobiana direta sobre o patógeno, caracterizando o produto químico como um produto de baixa toxicidade.

Em trabalhos realizados com ASM em cafeeiro não foi constatada a inibição do desenvolvimento do fungo *Hemileia vastatrix*, nas fases de pré-penetração (germinação e formação de apressórios) (GUZZO et al., 2001) e não foi verificado efeito biocida *in vitro* do ASM sobre a germinação de uredíniosporos *H. vastatrix* (MARCHI et al., 2002). Ao contrário, Tosi & Zizzerini (2000) constataram efeito inibidor de ASM sobre a germinação de esporocarpos de *Glomus mosseae*. Resultados semelhantes foram obtidos por Cardoso Filho (2003) trabalhando com o efeito deste produto sobre *Phyllosticta citricarpa*.

O método da sobre camada de meio de cultura demonstrou ser uma metodologia eficiente para verificar o efeito de agentes bióticos antagonistas sobre bactérias patogênicas, permitindo esclarecer o tipo de mecanismo exercido pelo antagonista frente ao patógeno. Assim, o isolado *Bacillus* sp. (UPF 008) exerceu efeito bacteriostático sobre *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*, quando estão sobre o mesmo meio de crescimento.

3.2 Método da incorporação de agentes biótico e abiótico ao meio de cultura

O método da incorporação de agentes biótico e abiótico ao meio de cultura promoveu diferenças entre os tratamentos. Nos tratamentos T₅ e T₆, em que o agente biótico foi incorporado ao meio de cultura, observou-se somente o crescimento do *Bacillus* sp. no meio de cultura até 72 h. Após este período, observou-se o crescimento de Psg no tratamento T₆, no entanto, com diferenças do seu controle T₂.

As diferenças observadas nos tratamentos T₂, T₅ e T₆ permite inferir que o agente biótico inibiu o crescimento da bactéria Psg quando submetidos ao crescimento sobre o mesmo meio de cultura (T₆). Desta forma, o *Bacillus* sp. pode estar produzindo algum tipo de substância antimicrobiana por difusão em ágar, que não permite o crescimento do patógeno até um certo período de tempo, agindo como bacteriostático e não como bactericida.

A ausência de crescimento da bactéria Psg no meio de cultura em que foi incorporado o antibiótico estreptomicina (T₄), confirma a sensibilidade da bactéria a este composto, vez que, o antibiótico só exerce efeito ao entrar em contato com a bactéria e inibir fases importantes do crescimento bacteriano.

No tratamento T₈ em que o meio de cultura apresentava o agente abiótico ASM incorporado, observou-se que o crescimento da Psg foi mais lento, em grumos, diferindo do crescimento da testemunha T₂. Estes resultados corroboram com os observados por Silva et al. (2007), que testaram o efeito de ASM sobre *Ralstonia*

solanacearum in vitro, demonstrando que o produto químico não promove inibição significativa do crescimento da bactéria. No entanto, foi verificado um efeito fungistático *in vitro* do ASM em *Colletotrichum graminicola* (PASCHOLATI et al., 1998).

O presente resultado mostrou indícios de que o agente abiótico apresentou ação bacteriostática, até certo período de tempo, e não bactericida sobre a bactéria *Psg*. No entanto, o ASM precisa estar como componente do meio de cultura e interagir com os demais elementos do meio. Desta forma, pode-se questionar se ao ser colocado no meio de cultura fundente a 40 °C a molécula de acibenzolar-S-metil pode sofrer alguma alteração na sua conformação e conseqüentemente, não tendo ação como bacteriostático sobre *Psg* permitindo seu crescimento ou não interferindo no mesmo.

Resende et al. (2000), em estudos realizados com o produto Bion® (ASM) e o seu efeito sobre a germinação de basidiósporos e crescimento micelial de *Crinipellis perniciososa in vitro*, classificaram o produto a base de ASM como pouco fungitóxico e sugerem que este seja mesmo um indutor de resistência.

3.3 Método do disco de papel filtro impregnado com agentes biótico e abiótico

Na metodologia empregando discos de papel filtro impregnados com os agentes biótico e abiótico não foram observadas diferenças representativas nos tratamentos quanto a presença de halo de inibição, exceto no tratamento com antibiótico.

No tratamento T₄, em que o disco de papel foi impregnado com o antibiótico estreptomicina, observou-se halo de inibição do crescimento do patógeno com diâmetro de 15 mm às 24 h, 21 mm às 48 h e 28 mm às 72 h após a exposição ao antibiótico.

No tratamento em que os discos foram impregnados com o agente biótico (T₆) observou-se crescimento do *Bacillus* sp. sobre a bactéria Psg (Figura 1), sendo que a expansão aumentou com o passar das horas (5 mm às 24 h, 11 mm às 48 h e 16 mm às 72 h), não caracterizando halo de inibição e sim crescimento sobre a fitobactéria, não permitindo a expansão da mesma no meio de cultura. Estes resultados permitem inferir que o agente biótico exerce algum tipo de controle sobre o patógeno, ainda não completamente esclarecido.

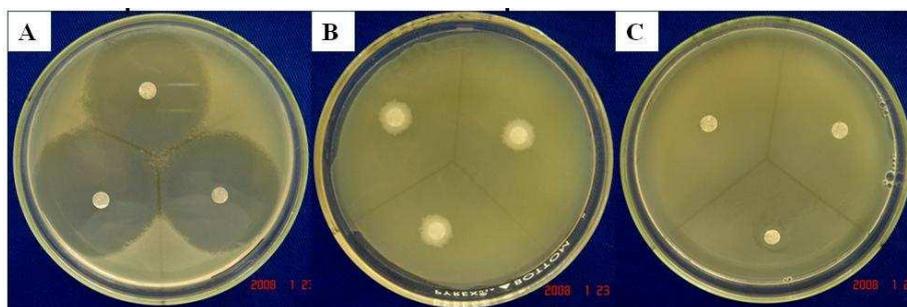


Figura 1 - Método do disco de papel de filtro impregnado com agentes, A- Estreptomicina 5 mg/mL; B- Agente biótico *Bacillus* sp.; C- Agente abiótico Acibenzolar-S-Metil (ASM).

Halfeld-Vieira (2002) realizou experimentos com antagonistas bacterianos, retirados do filoplano de tomateiro, observando que o isolado UFV-SLA 6 exercia inibição no

desenvolvimento de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* e *Xanthomonas vesicatoria*, produzindo um halo de inibição de 2 e 4 mm, respectivamente. Este mesmo autor observou que o isolado UFV-STB 30 apresentou inibição de *X. vesicatoria* produzindo um halo de 3 mm e de 1 mm para *P. syringae* pv. *tomato*, além da inibição do fungo *Alternaria solani*.

Comparando os resultados obtidos no presente trabalho com os dados obtidos da literatura, infere-se que os mecanismos de ação de um agente biótico *in vitro* sobre um patógeno diferenciam conforme cada interação e com a metodologia aplicada. Assim, não se pode descartar um agente biótico somente realizando ensaios *in vitro*, pois este pode ser um potencial agente indutor de resistência *in vivo*.

Os discos de papel filtro impregnados com o agente abiótico (T₈) não apresentaram diferenças em relação ao controle T₂. Este resultado confirma a afirmativa que o acibenzolar-S-metil não exerce controle da bactéria *Psg in vitro*, além de fortalecer o proposto por Görlach et al. (1996), de que um composto para ser considerado como indutor de resistência em plantas, não deve exercer ação direta sobre o patógeno.

Moura et al. (2009) não observaram efeito do ASM aplicado em discos de papel filtro sobre o crescimento da bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* cultivada em meio de cultura. Os indutores de resistência de origem química geralmente não exercem atividade antimicrobiana e podem ser uma alternativa para o controle de bacterioses na cultura da soja.

3.4 Produção de compostos voláteis *in vitro*

As avaliações de compostos voláteis permitiram a observação do crescimento do agente biótico apenas no tratamento T₅ em que *Bacillus* sp. e Psg foram confrontados, não apresentando crescimento da fitobactéria no período de 24 e 48 h após a incubação, quando comparado com os tratamentos controle T₁ e T₂. Desta forma, pode-se dizer que o agente biótico apresenta um tipo de controle sobre a bactéria Psg, mesmo quando não há contato com a mesma. Este controle pode ser exercido por um produto volátil produzido por *Bacillus* sp. e que desempenha um efeito sobre a fitobactéria, não permitindo o seu crescimento até um certo período de tempo.

Nas placas do tratamento T₅ também foi observado que após 72 h de incubação do confronto, a bactéria Psg começou a crescer sobre o meio de cultura. No entanto, apresentaram diferenças em relação ao tratamento controle (T₂), mudando o aspecto das colônias as quais se apresentaram pequenas e pouco brilhantes.

Segundo Pascholati (1998), a atuação de *Saccharomyces cerevisiae in vitro*, na redução da germinação e formação de apressórios de *Guignardia citricarpa*, poderia ser atribuída à liberação de uma substância ou complexo de substâncias com atividade inibitória, envolvendo a antibiose, assim como, a produção de substâncias como herbicolinas e pantocinas excretadas por *Pantoea agglomerans* e inúmeras outras moléculas produzidas por *Pseudomonas* (KEMPF, et al., 1993; GAFFNEY et al., 1994; WRIGHT et al., 2001).

A fitotoxina taxtomina A, produzida por bactérias do gênero *Streptomyces*, apresentaram efeito sobre o crescimento de *Colletotrichum lagenarium* e *C. sublineolum in vitro* (PASCHOLATI & GARCIA, 2009). Estes autores, ainda afirmam que a toxina da bactéria exerceu controle da doença fúngica através da indução de resistência nas plantas e efeito direto da toxina sobre o fungo, contrariando a premissa de que um indutor de resistência não pode exercer efeito tóxico direto sobre o patógeno (Steiner & Schönbeck apud ROMEIRO, 2002).

Nos tratamentos que foram confrontados com o antibiótico estreptomicina (T₃ e T₄), observou-se crescimento igual aos tratamentos controles de *Bacillus* sp. (T₁) e de Psg (T₂). O mesmo resultado foi observado para os tratamentos envolvendo o agente abiótico ASM (T₆ e T₇) comparados com o controle. Desta forma, quando confrontados ASM e *Bacillus* sp. não foi observado nenhum tipo de alteração no crescimento do agente biótico, indicando que ASM não interfere no crescimento de *Bacillus* sp.

Em experimentos realizados *in vitro* com ASM e seus metabólitos, na concentração de 1,4 mol.L⁻¹, foi demonstrado não exercer ação significativamente sobre o desenvolvimento de 18 fungos (FRIEDRICH et al., 1996). Vitti (2009) frisa que o produto ASM não apresenta atividade direta contra patógenos e sim produz um sinal químico que desencadeia a resposta de resistência quando em contato com a planta.

4 CONCLUSÕES

O agente biótico *Bacillus* sp. (UPF 008) exerce efeito bacterisotático sobre a bactéria *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*, produzindo uma substância ou um complexo de substâncias voláteis que inibe o crescimento da bactéria *in vitro* por tempo determinado.

O agente abiótico acibenzolar-S-metil segue a premissa de um indutor de resistência, não exercendo efeito direto sobre o patógeno *in vitro*.

CAPITULO II

CRESCIMENTO DE *BACILLUS* SP. SOB DIFERENTES TEMPERATURAS, PH, CONCENTRAÇÕES DE CLORETO DE SÓDIO E FONTES DE CARBONO

CHEILA CRISTINA SBALCHEIRO¹, NORIMAR D'ÁVILA
DENARDIN² & FRANCISMAR CORRÊA MARCELINO³

RESUMO - O conhecimento das condições ótimas de crescimento de *Bacillus* sp. possibilita a adequação deste agente de biocontrole às estratégias de controle de doença. O objetivo deste trabalho foi determinar o efeito da temperatura (0 a 45 °C), pH (4 a 10), concentração de NaCl (1 a 10%) e diferentes fontes de carbono sobre o crescimento de *Bacillus* sp. Para a determinação da temperatura ótima, mínima e máxima de crescimento, foram utilizadas placas com suspensão bacteriana avaliadas em diferentes temperaturas por 24, 48 e 72 h de incubação. Foram utilizados métodos de quantificação em espectrofotômetro e em meio de cultura nos diferentes ensaios de pH e concentração de NaCl. Para a utilização de fontes de carbono utilizou-se 13 diferentes carboidratos em meio de cultura sólido e líquido. Os resultados demonstraram que a estirpe testada de *Bacillus* sp. apresentou crescimento ótimo a 28 °C, numa ampla faixa de pH que

¹ Bióloga, Mestre em Agronomia, Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Agronomia da FAMV/UPF, Área de Concentração em Fitopatologia.

² Orientadora, Bióloga, Dra. Professora da FAMV/UPF – norimar@upf.br

³ Co-orientadora, Bióloga, Dra. Pesquisadora da Embrapa Soja – francm@cnpso.embrapa.br

variou de 4 a 10, utilizou preferencialmente as fontes de carbono dextrose e maltose e crescimento inversamente proporcional à concentração de NaCl.

Palavras-chave: crescimento bacteriano

**GROWTH OF *BACILLUS* SP. UNDER DIFFERENT
TEMPERATURES, PH, CONCENTRATIONS OF SODIUM
CHLORIDE AND CARBON SOURCES**

ABSTRACT - The knowledge of optimum conditions for growth of *Bacillus* sp. allows the suitability of biocontrol strategies to control disease. The objective of this study was to determine the effect of temperature (0 - 45 °C), pH (4 - 10), NaCl concentration (1 - 10%) and different carbon sources on growth of *Bacillus* sp. To determine the optimum temperature, minimum and maximum growth, we used plates with bacterial suspension measured at different temperatures for 24, 48 and 72 h of incubation. Methods were used for quantification in spectrophotometer and in culture medium in different tests of pH and salt concentration. For the use of carbon sources were used 13 different carbohydrates on culture solid and liquid. The results showed that the tested strain of *Bacillus* sp. showed optimum growth at 28 ° C in a wide range of pH ranging from 4 to 10, preferably used the carbon sources dextrose and maltose and growth inversely proportional to the concentration of NaCl.

Key words: bacterial growth

1 INTRODUÇÃO

Bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* apresentam grande potencial como agentes de controle biológico, pois mantêm sua viabilidade quando estocadas por longos períodos (PETRAS & CASIDA, 1985). No entanto, poucos estudos foram conduzidos sobre os fatores que afetam o crescimento dessa bactéria, principalmente se esta for combinada com outros produtos e diferentes métodos de aplicação.

Segundo Barbosa e Torres (1999), o metabolismo celular de uma bactéria está diretamente ligado a fatores físicos e químicos do ambiente, sendo que estes interferem na assimilação dos nutrientes. Para o máximo desenvolvimento de uma bactéria, é necessário que ocorram condições ideais de temperatura, pH, concentração de sais e nutrientes, dentre outras exigências específicas de cada espécie (ROMEIRO, 2001).

O sucesso da introdução de um antagonista no meio que irá fazer o controle do patógeno é fundamental. Para isso, o micro-organismo deve, preferencialmente, multiplicar-se e colonizar a superfície da planta e posteriormente exercer o seu mecanismo de ação (BETTIOL & GHINI, 1995). O antagonista precisa estar adaptado às condições que lhe serão impostas, desta maneira o conhecimento do comportamento do crescimento do agente biocontrolador faz-se necessário para estabelecer as condições ideais de aplicação no tecido vegetal e garantir o sucesso do controle biológico.

O objetivo deste trabalho foi estudar as condições de crescimento de *Bacillus* sp. sobre diferentes temperaturas (0 a 45 °C), pH (4 a 10), concentração de NaCl (1 a 10%) e diferentes fontes de carbono, visando à obtenção de informações básicas necessárias ao estudo aplicado desta bactéria como agente biótico de biocontrole.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Bacteriologia Vegetal da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo – FAMV/UPF, Passo Fundo-RS.

2.1 Crescimento de *Bacillus* sp. em diferentes temperaturas

O crescimento de *Bacillus* sp. (isolado UPF 008) foi avaliado em meio de cultura 523 (KADO & HESKETT, 1970), incubado em estufa bacteriológica às temperaturas de 0 a 45 °C, em intervalos de 5 °C. Como parâmetro de crescimento utilizou-se a temperatura de 28 °C. Aliquotas de 100 µL de uma suspensão bacteriana de *Bacillus* sp. foram semeadas sobre meio de cultura 523 e espalhadas com auxílio de uma alça de Drigalski. Após o semeio, as placas foram levadas para estufas bacteriológicas com diferentes temperaturas e incubadas em triplicata para cada temperatura. O crescimento das unidades formadoras de colônia (UFC) foi acompanhado nos períodos de 24, 48 e 72 h após a incubação e comparados com as UFC das placas na temperatura padrão (28 °C).

O delineamento experimental para cada variável analisada foi inteiramente casualizado com três repetições, sendo cada repetição constituída por uma placa de Petri.

2.2 Crescimento de *Bacillus* sp. em diferentes pH

O efeito do pH sobre o crescimento de *Bacillus* sp. em diferentes pH foi avaliado em meio de cultura 523 líquido com pH ajustado para valores variando de 4,0 a 10, em intervalo de 0,5, utilizando soluções de HCl ou KOH, ambas soluções na concentração de 0,5 mol.L⁻¹. Alíquotas de 100 µL de uma suspensão bacteriana de *Bacillus* sp. foram depositadas em tubos de ensaio contendo 4,9 mL dos diferentes meios de cultura com pH ajustados. Os tubos de ensaio foram mantidos em estufa bacteriológica a 28 ± 2 °C.

O crescimento bacteriano foi avaliado após 24 e 48 h de incubação, utilizando-se espectrofotômetro, com leitura da absorbância a 540 nm. Após a leitura, alíquotas de 1000 µL de cada amostra foram retiradas, procedendo-se diluições seriadas (10⁻¹, 10⁻², 10⁻³ e 10⁻⁴) com semeadura de 100 µL de cada diluição em meio de cultura 523 sólido e incubação das placas em estufa bacteriológica a 28 ± 2 °C para a contagem de UFC de cada amostra após 24 h.

As leituras da absorbância foram relacionadas com a quantidade de UFC de cada amostra. O delineamento experimental para cada variável analisada foi inteiramente casualizado com três repetições, sendo cada repetição constituída por um tubo de ensaio ou uma placa de Petri.

2.3 Crescimento de *Bacillus* sp. em diferentes concentrações de NaCl

O crescimento de *Bacillus* sp. em diferentes concentrações de NaCl foi avaliado em meio de cultura 523 líquido suplementado com NaCl em concentrações de 1 a 10%, em intervalos de 1%. Como parâmetro de crescimento utilizou-se somente o meio de cultura 523 líquido sem a adição deste sal (0%). Alíquotas de 100 µL de suspensão bacteriana de *Bacillus* sp. foram adicionadas em tubos de ensaio contendo 4,9 mL de meio de cultura 523 líquido suplementado com as diferentes concentrações de NaCl. Os tubos de ensaio foram mantidos em estufa bacteriológica a 28 ± 2 °C.

O crescimento bacteriano foi avaliado após 24 e 48 h de incubação, utilizando-se espectrofotômetro, com leitura da absorbância a 540 nm. Após a leitura retirou-se alíquotas de 100 µL de cada amostra realizando-se a semeadura em meio de cultura 523 sólido e incubação em estufa bacteriológica a 28 ± 2 °C para a contagem de UFC de cada amostra.

A leitura da absorbância foi relacionada com a quantidade de UFC de cada amostra. O delineamento experimental para cada variável analisada foi inteiramente casualizado com três repetições, sendo cada repetição constituída por um tubo de ensaio ou uma placa de Petri.

2.4 Crescimento de *Bacillus* sp. em diferentes fontes de carbono

O crescimento de *Bacillus* sp. em diferentes fontes de carbono foi analisado utilizando-se caldo base para fermentação - BTB (extrato de carne - 1 g; peptona - 10 g; cloreto de sódio - 5 g; azul de bromotimol (sol. alcoólica 1,6%) - 1 mL; água destilada - 1000 mL) em tubos de ensaio. O caldo foi esterilizado em autoclave, resfriado a 60 °C e adicionado 1% de carboidratos esterilizados por filtração em membrana de nitrocelulose (diâmetro do poro de 0,22 µm). As fontes de carbono testadas foram às seguintes: amido, arabinose, celobiose, celulose, dextrose, frutose, galactose, lactose, maltose, manitol, manose, sacarose e trealose.

Aos tubos de ensaio, contendo o caldo e a fonte de carbono, foi adicionado 50 µL de uma suspensão bacteriana de *Bacillus* sp. ($OD_{540} = 0,5$) e em seguida estes foram incubado em estufa bacteriológica a 28 ± 2 °C. As avaliações foram realizadas 1, 2, 5 e 7 dias após a incubação, observando-se a mudança de coloração do caldo, utilizando-se o seguinte critério: a) amarelo: utilização do substrato com produção de ácido (azul de bromotimol torna-se amarelo em condições ácidas); b) verde: não utilização do substrato (carbono) como fonte de energia (MARIANO et al., 2005).

O crescimento de *Bacillus* sp., em diferentes fontes de carbono, também foi testado em meio de cultura sólido, utilizando-se o caldo BTB modificado, ao qual foi adicionado 15 g/L de Agar. O meio de cultura foi esterilizado em autoclave e após o resfriamento a 60 °C adicionou-se o equivalente a 1% do volume das diferentes

fontes de carbono esterilizadas por filtração e em seguida vertidos em placas de Petri.

Alíquotas de 100 μ L de uma suspensão bacteriana de *Bacillus* sp., ajustada em espectrofotômetro para uma absorbância de $OD_{540} = 0,5$, foram espalhadas com auxílio de alça de Drigalski em cada meio de cultura contendo as diferentes fontes de carbono. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 28 ± 2 °C e as avaliações do crescimento bacteriano foram realizadas 1, 2, 5 e 7 dias após a incubação. O crescimento positivo nas diferentes fontes de carbono foi determinado pela mudança de cor (verde para amarelo) do meio de cultura próximo as colônias de *Bacillus* sp.

O delineamento experimental para cada variável analisada foi inteiramente casualizado com três repetições, sendo cada repetição constituída por um tubo de ensaio ou uma placa de Petri.

2.5 Representação e análise dos resultados

Os dados foram submetidos à análise estatística, realizada através do programa SAS (Statistical Analysis Systems Institute, Cary, NC), versão 8.0, utilizando o procedimento General Linear Model e teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para a análise do crescimento bacteriano em diferentes fontes de carbono os dados foram transformados em " $(x+k)^{1/2}$ " com $k = 0,1$ e submetidos à análise estatística, realizada através do programa SASM-Agri, utilizando análise da variância e teste de Tukey a 5% de probabilidade (CANTERI et al., 2001).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Crescimento de *Bacillus* sp. em diferentes temperaturas

As avaliações em diferentes temperaturas demonstraram que o crescimento de *Bacillus* sp. variaram de 20 a 40 °C, sendo o crescimento ótimo a 28 °C. Observou-se um aumento gradual do crescimento conforme aumentou a temperatura dos 20 aos 28 °C, seguido de decréscimo a partir dos 28 °C até os 40 °C (Tabela 5).

Não foi observado crescimento de *Bacillus* sp. nas temperaturas de 0, 5, 10, 15 e 45 °C nos tempos de incubação de 24, 48 e 72 h. Segundo Tortora et al. (2002), a limitação do crescimento bacteriano pela temperatura mais baixa depende da solidificação dos lipídios da membrana, ou ainda, da sensibilidade ao resfriamento do processo de iniciação da síntese de proteínas. Por outro lado, um pouco acima da temperatura limite, muitas enzimas são desnaturadas e a célula bacteriana morre.

Nas temperaturas de 20, 28 e 35 °C observou-se que a contagem de UFC em 48 h foi maior que em 24 h e que permaneceu com o mesmo número de UFC até 72 h após a incubação, no entanto, houve aumento no tamanho das colônias.

A análise dos dados possibilita afirmar que a temperatura ótima de crescimento de *Bacillus* sp. é a 28 °C e que este deve ser mantido em estufa bacteriológica até às 48 h após a incubação para atingir o completo crescimento de todas as colônias em meio de cultura e obtenção da exata quantidade de inóculo. Esta bactéria pode crescer entre 20 a 40 °C, cuja faixa de temperatura permite que a

mesma possa crescer em locais com outras temperaturas que não seja a igual a seu ótimo, mesmo com algumas restrições, e assim desenvolver suas atividades metabólicas.

Tabela 5 - Crescimento bacteriano de *Bacillus* sp. quantificado por unidades formadoras de colônias (UFC) em diferentes temperaturas até 72 h após a inoculação em meio de cultura

Temperatura (°C)	UFC (10 ⁶)		
	24 h	48 h	72 h
0	0,00 g ¹	0,00 f	0,00 e
5	0,00 g	0,00 f	0,00 e
10	0,00 g	0,00 f	0,00 e
15	0,00 g	0,00 f	0,00 e
20	0,33 f	0,54 e	0,54 d
25	0,91 d	0,91 c	0,91 c
28*	5,00 a	5,70 a	5,70 a
30	2,00 b	2,00 b	2,00 b
35	1,70 c	2,00 b	2,00 b
40	0,84 e	0,84 d	0,84 c
45	0,00 g	0,00 f	0,00 e
C.V.(%)	7,50	1,70	1,70

*Temperatura padrão de crescimento bacteriano de *Bacillus* sp.

¹Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

O conhecimento da faixa de temperatura em que cresce o isolado de *Bacillus* sp. e a sua termoestabilidade também é importante para estudos com formulações e possíveis produtos comerciais elaborados a partir dessa estirpe ou dos produtos do seu metabolismo,

além de fazer analogia à capacidade do agente biótico de se desenvolver rapidamente em faixas de temperatura ideais para cada patógeno (HALFELD-VIEIRA, 2002).

Outro fato relevante é que na superfície foliar os micro-organismos estão sujeitos a variações amplas e rápidas de temperatura, fato este que podem interferir nos mecanismos de ação e na sobrevivência dos mesmos. Desta forma, a utilização de agentes bióticos capazes de suportar estas variações é fundamental para o sucesso do estabelecimento do antagonista e para o controle da doença.

Conforme Romeiro (1995), um dos maiores problemas para se caracterizar um micro-organismo antagonista é que ele seja perfeitamente bem adaptado ao ambiente onde se deseja que ele atue, além de apresentar algumas características como fácil multiplicação, pouco sujeito a mutações e que produza compostos inibitórios.

O agente biótico tem que estar adaptado ao ambiente que será aplicado, por exemplo, o filoplano das plantas, devido à filosfera ser um ambiente complexo, que sofre variações intermitentes de umidade, temperatura, incidência de radiação, ventilação, composição e quantidade de nutrientes disponível (WILSON et al., 1999). Estes fatores podem tornar agentes bióticos de controle ineficientes se não adaptados às condições da cultura.

Segundo Barbosa e Torres (1998), a temperatura é um dos mais importantes fatores do ambiente, devido à influência na absorção de nutrientes, no crescimento e na sobrevivência dos organismos, além de determinar a velocidade das reações metabólicas, pois atua na atividade enzimática. Embora a temperatura seja um fator importante

na viabilidade de *Bacillus* sp., deve-se ressaltar que as respostas em relação a este fator ambiental não podem ser generalizadas, devido à variabilidade genética, uma vez que esta pode interferir na estirpe bacteriana e conferir a um determinado isolado maior capacidade de adaptação a condições adversas.

Conforme Chun & Vidaver (2001) o crescimento de *Bacillus* em diferentes temperaturas varia de acordo com a espécie. Assim, para *Bacillus subtilis* ocorre crescimento a 45 °C, já para *B. cereus* 21-70% das estirpes crescem a 45 °C, havendo a possibilidade de estirpes da mesma espécie não crescerem a esta temperatura, ocorrendo uma variação intra-específica.

Este trabalho permitiu constatar que a temperatura influencia o crescimento de *Bacillus* sp. e esta deve ser levada em consideração quando este agente biótico for aplicado na cultura como agente biocontrolador e indutor de resistência.

3.2 Crescimento de *Bacillus* sp. em diferentes pH

Verificou-se que *Bacillus* sp. cresceu numa ampla faixa de pH (4-10), mas com crescimento ótimo no pH 9,0. O crescimento da colônia acompanhou o aumento do pH do meio de cultura, ou seja, apresentou crescimento gradual com o aumento do pH, com pico máximo em pH 9,5 e decrescendo bruscamente em pH 10. As absorbâncias obtidas em 24 e 48 h após a incubação apresentaram crescimento gradual em UFC na faixa de pH 4 a 9,5 (Tabela 6).

Devido ao fato desta bactéria crescer numa ampla faixa de pH, é possível inferir que a sua utilização pode ser veiculada com

outras substâncias que apresentem pH diferente do usualmente utilizado para *Bacillus*, sem no entanto, promover interferência no seu crescimento, como a utilização de goma xantana.

Tabela 6 - Quantificação do crescimento de *Bacillus* sp. através de absorbância e unidades formadoras de colônia (UFC) em diferentes pH nos períodos de 24 e 48 h após a inoculação

pH	Absorbância (nm)		UFC (10 ³)	
	24 h	48 h	24 h	48 h
4,0	0,062 m ¹	0,122 l	0,25 h	1,45 i
4,5	0,078 l	0,142 k	0,30 h	1,60 i
5,0	0,100 k	0,247 j	1,40 h	3,60 i
5,5	0,264 j	0,450 i	1,80 h	28 h
6,0	0,425 i	0,587 h	24 g	26 h
6,5	0,556 h	0,609 g	26 g	100 g
6,8*	0,636 g	0,775 f	120 f	209 f
7,0	0,680 f	0,775 f	177 e	209 f
7,5	0,764 e	0,796 e	200 d	223 e
8,0	0,815 d	0,839 d	789 c	792 d
8,5	0,879 b	0,943 c	964 b	1113 c
9,0	0,955 a	0,979 b	1187 a	1356 b
9,5	0,836 c	1,018 a	790 c	2340 a
10,0	0,052 n	0,050 m	0,005 h	0,004 i
C.V.(%)	4,50	4,43	4,83	5,31

*pH do meio de cultura de crescimento usual de *Bacillus* sp.

¹Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Segundo Chun & Vidaver (2001) pode-se diferenciar espécies de *Bacillus* pelo seu crescimento em pH 5,7. Por exemplo, *B. cereus* e *B. subtilis* crescem em pH 5,7, em quanto que *B. alvei* não cresce neste pH. No presente estudo, observou-se que o isolado

testado de *Bacillus* sp. apresentou baixo crescimento em pH de 4,0 a 5,5 nas primeiras 24 h após a inoculação. Ao analisar a absorbância das amostras, os dados demonstram aumento de quatro vezes em pH 6,0 em relação ao pH 5,0 e praticamente dobrou em relação ao pH 5,5. Quando estes dados foram comparados ao pH 9,0 (maior absorbância observada) apresentaram aumento de nove vezes em relação a absorbância em pH 5,0. Estes dados revelaram que este isolado apresentou uma ampla faixa de crescimento em pH que variam de 4 a 10, com crescimento diferenciado nos extremos e apresentando pico máximo de unidades formadoras de colônias (UFC) em pH 9,0.

Um fato curioso foi observado ao comparar os extremos de pH testados (4 e 10). Observou-se que nestes dois valores de pH a absorbância foram muito próximos, no entanto, ao quantificar as UFC em meio de cultura verificou-se número muito inferior em pH 10, do que em pH 4. Pode-se dizer que na absorbância são quantificadas todas as células bacterianas presentes na suspensão, já quando quantificado em meio de cultura somente visualizou-se as células viáveis que cresceram formando colônias.

O conhecimento da faixa de crescimento de *Bacillus* sp. em diferentes valores de pH é fundamental para estabelecer estratégias de manutenção, veiculação e aplicação do mesmo como agente biótico de controle de doenças, uma vez que o pH pode promover alterações no crescimento, desenvolvimento, reprodução e sobrevivência de bactérias.

3.3 Crescimento de *Bacillus* sp. em diferentes concentrações de NaCl

As avaliações do crescimento bacteriano de *Bacillus* sp. em meio de cultura com diferentes concentrações de NaCl, demonstrou que esta bactéria tolerou a presença deste sal até uma concentração de 10%. No entanto, com um número de UFC muito abaixo do normal. Observou-se que após 24 h de incubação houve declínio gradual do crescimento até a concentração de 3% de NaCl, e às 48 h após a incubação este gradual foi estendido até a concentração de 6% (Tabela 7).

Verificou-se que a população de *Bacillus* sp. diminui com o aumento da concentração de NaCl. Conforme aumenta a concentração deste sal no meio de cultura, o ambiente torna-se hipertônico, assim, a célula perde água através da membrana plasmática, para o meio extracelular, com conseqüente inibição do crescimento (TORTORA et al., 2002).

Segundo Chun & Vidaver (2001) o crescimento de *Bacillus* sp. em diferentes concentrações de NaCl varia conforme a espécie e, dentro da própria espécie podem ocorrer estirpes que apresentam crescimento positivo ou negativo numa mesma concentração desse sal. Os autores citam o crescimento em NaCl 7% como uma característica que separa algumas espécies, como por exemplo, *B. subtilis* e *B. licheniformis* com crescimento positivo, em quanto que *B. coagulans*, *B. alvei* e *B. brevis* não apresentam crescimento, e ainda *B. cereus* com 21-70% das estirpes com crescimento positivo nessa concentração de NaCl.

Tabela 7 - Quantificação do crescimento de *Bacillus* sp. por absorvância e unidades formadoras de colônia (UFC) em diferentes concentrações de NaCl (%) no período de 24 e 48 h da inoculação

Concentração de NaCl (%)	Absorvância (nm)		UFC (10 ³)	
	24 h	48 h	24 h	48 h
0	0,695 a ¹	0,726 a	102 a	134 a
1	0,544 b	0,666 b	23 b	100 b
2	0,316 c	0,595 c	2,40 c	27 c
3	0,206 d	0,582 d	2,20 c	26 c
4	0,098 e	0,484 e	2,00 cd	20 d
5	0,055 ef	0,480 e	1,60 d	20 d
6	0,051 ef	0,427 f	1,50 d	19 d
7	0,045 f	0,144 g	0,20 e	0,44 e
8	0,045 f	0,080 h	0,20 e	0,31 e
9	0,041 f	0,057 i	0,11 e	0,24 e
10	0,041 f	0,057 i	0,10 e	0,24 e
C.V.(%)	8,74	7,80	14,2	2,63

¹Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

O presente trabalho demonstrou que o crescimento do isolado de *Bacillus* sp. ocorreu principalmente até a concentração de 4% de NaCl 24 h após a inoculação e até a concentração de 7% de NaCl as 48 h após a inoculação. A partir de 5% e 8% de NaCl às 24 e 48 h, respectivamente, não foi observado crescimento significativo da estirpe de *Bacillus* sp., comparado com a amostra controle (0% de NaCl), concordando com Chun & Vidaver (2001).

3.4 Crescimento de *Bacillus* sp. em diferentes fontes de carbono

Em caldo BTB líquido observou-se a utilização da fonte de carbono amido, dextrose, frutose, maltose, sacarose e trealose, com a mudança de cor do caldo de verde para amarelo intenso aos 7 dias após a semeadura, indicado pelo azul de bromotimol (Tabela 8). A intensidade da coloração amarela e o turvamento do caldo foram observados nas fontes de carbono dextrose e trealose. Estes resultados mostraram que as melhores fontes de carbono para crescimento de *Bacillus* sp. foi dextrose e trealose.

Nas fontes de carbono arabinose, celulose, galactose, lactose, manitol e manose não foi observada a mudança da coloração do indicador azul de bromotimol, sugerindo que o isolado de *Bacillus* sp. testado não utilizou estas fontes de carbono como nutriente.

A fonte de carbono celobiose somente foi utilizada pela bactéria aos 5 dias após a semeadura no meio, apresentando uma pequena mudança na coloração do caldo de verde para um tom de verde mais amarelado, caracterizando a pouca utilização deste carboidrato. Neste caso, a bactéria, como estratégia de sobrevivência, pode ter exsudado alguma enzima capaz de hidrolisar a celobiose, transformando-a numa fonte de energia utilizável.

O crescimento bacteriano nas diferentes fontes de carbono demonstrou que a utilização deste se torna estável a partir das 48 h seguintes à semeadura em meio de cultura.

Tabela 8 - Crescimento de *Bacillus* sp. em diferentes fontes de carbono e em meio de cultura sólido e líquido

Fonte de carbono	Crescimento bacteriano							
	Caldo BTB				BTB sólido			
	1 [†]	2	5	7	1	2	5	7
Amido	2*a ¹	3 a	3 a	3 a	2 b	2 b	2 b	2 b
Arabinose	0 b	0 b	0 c	0 c	1 c	1 c	1 c	1 c
Celobiose	0 b	0 b	2 b	2 b	2 b	2 b	2 b	2 b
Celulose	0 b	0 b	0 c	0 c	1 c	1 c	1 c	1 c
Dextrose	2 a	3 a	3 a	3 a	3 a	3 a	3 a	3 a
Frutose	2 a	3 a	3 a	3 a	2 b	3 a	3 a	3 a
Galactose	0 b	0 b	0 c	0 c	1 c	1 c	1 c	1 c
Lactose	0 b	0 b	0 c	0 c	1 c	2 b	2 b	2 b
Maltose	2 a	3 a	3 a	3 a	3 a	3 a	3 a	3 a
Manitol	0 b	0 b	0 c	0 c	1 c	1 c	1 c	1 c
Mannose	0 b	0 b	0 c	0 c	2 b	2 b	2 b	2 b
Sacarose	2 a	3 a	3 a	3 a	2 b	3 a	3 a	3 a
Trealose	2 a	3 a	3 a	3 a	2 b	3 a	3 a	3 a

[†]Dias após a semeadura em meio de cultura;

*Reações de crescimento bacteriano onde: 3= crescimento e utilização do carbono; 2= crescimento e utilização de um pouco de carbono; 1= crescimento sem utilizar o carbono; 0= nenhum crescimento.

¹Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

No meio de cultura BTB sólido, a estirpe de *Bacillus* sp. testada cresceu em todos os meios testados com as diferentes fontes de carbono, no entanto, utilizou somente alguns tipos como fonte de energia para seus processos metabólicos. As fontes de carbono dextrose e maltose apresentaram mudança na cor do meio logo no

primeiro dia após a inoculação, tornando a coloração amarela mais intensa com o passar dos dias.

Nas fontes de carbono frutose, sacarose e trealose observou-se inicialmente uma pequena modificação na coloração do meio de cultura de verde escuro para verde claro, evoluindo a partir do segundo dia após a inoculação com a mudança total do meio de cultura para amarelo. Em quanto que, nos meios de cultura contendo amido, celobiose e manose observou-se o crescimento de *Bacillus* sp. com pouca utilização do carbono, apresentando leve mudança da cor do meio de cultura de verde escuro para verde claro permanecendo assim até o último dia avaliado (7 dias após a inoculação).

Nos meios de cultura contendo arabinose, celulose, galactose e manitol observou-se crescimento bacteriano de *Bacillus* sp., porém não foi constatado a utilização da fonte de carbono, não havendo modificação da coloração do meio de cultura. Com a fonte de carbono lactose observou-se no primeiro dia crescimento bacteriano e não utilização da fonte de carbono, evoluindo no segundo dia para pouca utilização do carbono como fonte de energia permanecendo até o último dia da avaliação.

Conforme Chun & Vidaver (2001) a utilização de diferentes fontes de carbono pode separar espécies de *Bacillus*, por exemplo, *B. subtilis* utiliza arabinose, manitol e xilose, em quanto que *B. cereus* não utiliza nenhuma destas fontes de carbono.

As diferenças de crescimento observadas entre o caldo BTB líquido e o meio BTB sólido, se deve ao fato que em meio sólido é possível a visualização das colônias e a análise do seu aspecto em relação à utilização do carbono presente no meio de cultura. Já no

caldo BTB líquido pela acidificação isso não é possível, visto que somente pode-se observar a mudança de cor provocada no meio pelo indicador azul de bromotimol quando a bactéria utiliza a fonte de carbono.

A estirpe de *Bacillus* sp. testada apresentou uma pequena variação no crescimento, observada pela velocidade e intensidade de utilização do substrato com produção de ácido, bem como no formato e tamanho das colônias no meio de cultura BTB sólido. No meio que continha trealose as colônias apresentaram o centro de coloração bem amarela e as bordas esbranquiçadas, diferente da coloração totalmente esbranquiçada obtida no meio de cultura 523 de Kado & Heskett (1970) usualmente utilizado em laboratórios. Nos meios de cultura contendo arabinose, celulose, galactose e manitol as colônias apresentaram coloração azulada, indicando ausência da utilização da fonte de carbono.

As diferenças observadas na estirpe de *Bacillus* sp. testada, comparadas aos dados relatados na literatura, indicaram que podem existir variabilidade entre estirpes de *Bacillus* sp., estando esta variação relacionada a características genéticas de cada estirpe e também a capacidade de adaptação ao ambiente em que está exposta.

A temperatura, pH, concentração de NaCl e fonte de carbono influenciam o crescimento de *Bacillus* sp. *in vitro*, indicando a importância dessas variáveis na utilização desta bactéria como agente de biocontrole e indução de resistência.

O isolado de *Bacillus* sp. testado apresenta ampla adaptação em relação à temperatura, pH, concentração de NaCl e

utilização de fontes de carbono. Esta flexibilidade facilitou seu emprego como agente biótico de indução de resistência.

4 CONCLUSÕES

A temperatura ótima de crescimento de *Bacillus* sp. (isolado UPF 008) é 28 °C, variando seu crescimento entre mínimo e máximo de 20 a 40 °C, respectivamente.

A estirpe de *Bacillus* sp. testada cresce numa ampla faixa de pH que varia de 4 a 10.

O crescimento de *Bacillus* sp. é inversamente proporcional a concentração de NaCl no meio de cultura.

As fontes de carbono dextrose e maltose são preferenciais para crescimento de *Bacillus* sp. em meio de cultura.

CAPITULO III

SENSIBILIDADE DE *BACILLUS* SP. AOS PRINCIPAIS FUNGICIDAS UTILIZADOS NA CULTURA DA SOJA

CHEILA CRISTINA SBALCHEIRO¹, NORIMAR D'ÁVILA
DENARDIN², FRANCISMAR CORRÊA MARCELINO³ &
MATEUS ZANATTA⁴

RESUMO - A cultura da soja sofre grandes prejuízos devido ao ataque de patógenos. Em virtude do aumento significativo do uso de defensivos agrícolas em soja, faz-se necessário a utilização de práticas alternativas, como o uso de indutores de resistência, visando menores riscos ao ambiente e ao agricultor. O objetivo deste trabalho foi avaliar a sensibilidade do indutor biótico *Bacillus* sp. a fungicidas utilizados na cultura da soja. Foram testados 10 fungicidas isolados e em mistura, observando a compatibilidade com o isolado *Bacillus* sp. A avaliação da sensibilidade foi realizada em laboratório por teste de antibiograma e sensibilidade em meio de cultura. O isolado de *Bacillus* sp. foi compatível com Azoxystrobin, Azoxystrobin+ciproconazole, Carbendazin, Epoxiconazole e Pyraclostrobin+epoxiconazole, nas concentrações recomendadas para a cultura da soja. O ingrediente ativo Tebuconazole sozinho ou em

¹ Bióloga, Mestre em Agronomia, Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Agronomia da FAMV/UPF, Área de Concentração em Fitopatologia.

² Orientadora, Bióloga, Dra. Professora da FAMV/UPF – norimar@upf.br

³ Co-orientadora, Bióloga, Dra. Pesquisadora da Embrapa Soja – francm@cnpso.embrapa.br

⁴ Acadêmico de Agronomia da FAMV/UPF.

combinação com Trifloxystrobin apresentou ação bacteriostática sobre *Bacillus* sp., inclusive na metade da dose recomendada.

Palavras-chave: Controle químico

SENSITIVITY OF *BACILLUS* SP. TO MAIN FUNGICIDES USED IN CULTURE OF SOYBEAN

ABSTRACT - The soybean crop suffers heavy losses due to attack by pathogens. Due to the significant increase in the use of pesticides in soybeans, it is necessary to use alternative practices, such as the use of resistance inducers, in order to lower risks to the environment and the farmer. The objective of this study was to evaluate the sensitivity of the biotic inducer *Bacillus* sp. the fungicides on soybeans. Were tested 10 fungicides alone and in combination, noting the compatibility with the strain *Bacillus* sp. The sensibility evaluation was performed in the laboratory for testing and antibiotic sensitivity in culture medium. The isolated *Bacillus* sp. was compatible with Azoxystrobin, Azoxystrobin + cyproconazole, Carbendazin, Epoxiconazole and Pyraclostrobin + epoxiconazole, the concentrations recommended for soybean. The active ingredient Tebuconazole alone or in combination with Trifloxystrobin showed bacteriostatic action on *Bacillus* sp. even at half the recommended dose.

Key words: Chemical control.

1 INTRODUÇÃO

Na cultura da soja incidem inúmeras doenças que acarretam grandes perdas anualmente, por isso é fundamental o emprego de medidas de controle que minimizem os danos e os prejuízos da sojicultura (ALMEIDA et al., 2005). As medidas de controle podem ser combinadas para garantir a obtenção de plantas saudáveis e com maior produtividade. No entanto, faz-se necessário verificar a compatibilidade entre as estratégias de controle de doenças para que não haja danos e prejuízos na lavoura.

A compatibilidade entre agentes de controle biológico e produtos químicos como os fungicidas, permite a elaboração de estratégias que aumentem a eficiência no controle de doenças de diferentes etiologias, além de permitir a inclusão do controle biológico no sistema de manejo integrado de fitopatologias (KORSTEN, et al., 1997).

As metodologias empregadas na verificação da compatibilidade da combinação de métodos de controle são diversas, destacando-se o antibiograma como a mais frequente. Este é um teste que mede a suscetibilidade/resistência de uma bactéria a um ou mais agentes antimicrobianos. Seu objetivo é tanto a análise do espectro de sensibilidade/resistência à substância química quanto à determinação da concentração mínima inibitória. Desta forma, a formação de um halo transparente sobre a superfície, ao redor do disco impregnado com a substância, indica uma região com ausência de crescimento bacteriano, revelando a ação inibitória do agente antimicrobiano sobre a bactéria (PELCZAR et al., 1996).

A aplicação alternada de agentes bióticos e produtos químicos é uma medida para otimizar a eficiência no controle da doença. Além disso, previne a seleção de populações de patógenos resistentes a fungicidas, proporcionando maior durabilidade do controle químico ao longo do tempo (PAULITZ & BÉLANGER, 2001).

Testes realizados com a combinação de Penycuron e *Pseudomonas fluorescens* no tratamento de sementes de trigo, confirmaram a eficiência da mistura no controle da podridão de raízes causada por *Rhizoctonia* spp., em relação a aplicação de cada agente separadamente. Em testes *in vitro*, o fungicida não apresentou inibição do crescimento da bactéria, assim, não houve comprometimento da colonização das raízes e, conseqüentemente, permitiu o estabelecimento da bactéria biocontroladora (DUFFY, 2000).

O uso combinado de agentes bióticos, com potencial para controle biológico e/ou indução de resistência, com fungicidas sintéticos, para obtenção de efeitos sinérgicos ou aditivos contra um ou vários patógenos alvo, é uma linha de estudo que tem despertado a atenção da comunidade científica e comercial.

Em vista disso, o presente trabalho objetivou verificar a compatibilidade e sensibilidade do agente biótico *Bacillus* sp. a produtos químicos utilizados na cultura da soja com a finalidade de compatibilizar o agente de biocontrole no sistema de manejo integrado.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Bacteriologia Vegetal da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo - FAMV/UPF, Passo Fundo-RS.

2.1 Antibiograma com fungicidas impregnados em disco de papel filtro

A sensibilidade aos diversos produtos foi verificada preparando-se uma suspensão do isolado de *Bacillus* sp. (UPF 008) cultivado em meio de cultura 523 (KADO & HESKETT, 1970) por 24 h. A suspensão foi ajustada em espectrofotômetro para uma absorbância de $OD_{540} = 0,5$. Em placas de Petri, com meio de cultura 523 sólido, previamente desidratado por 24 h à 24 °C, adicionou-se 100 µL da suspensão bacteriana contendo *Bacillus* sp., espalhando-se completamente com auxílio de alça de Drigalski. As placas foram mantidas em câmara de fluxo laminar até a completa absorção da suspensão bacteriana ao meio de cultura para que não houvesse escorrimento da mesma nas bordas das placas.

A concentração do ingrediente ativo de cada fungicida foi preparada no volume final de 100 mL utilizando água destilada estéril. Foram utilizadas três concentrações diferentes: dose recomendada, que foi utilizada como padrão, metade da dose e dose dobrada do ingrediente ativo (Tabela 9).

Tabela 9 - Ingrediente ativo de fungicidas impregnados em discos de papel filtro em três concentrações diferentes

Ingrediente ativo de fungicidas	Metade da Dose (mg/L)	Dose Recomendada (mg/L)	Dose Dobrada (mg/L)
Azoxystrobin	250	500	1000
Azoxystrobin+ciproconazole	300+120	600+240	1200+480
Carbendazin	1250	2500	5000
Epoxiconazole	250	500	1000
Flutriafol	312,5	625	1250
Myclobutanil	500	1000	2000
Pyraclostrobin+epoxiconazole	332,5+125	665+250	1330+500
Tebuconazole	500	1000	2000
Trifloxystrobin+ciproconazole	187,5+80	562+240	1124+480
Trifloxystrobin+tebuconazole	250+500	500+1000	1000+2000

Os produtos testados estão apresentados nas concentrações do ingrediente ativo conforme as recomendações dos fungicidas registrados para a cultura da soja (REIS et al., 2007).

Discos de papel filtro estéril de 3 mm de diâmetro foram mergulhados nos produtos químicos, permanecendo por dois períodos distintos: 1 e 24 h e repetidos para confirmação dos resultados. Após estes períodos, os discos impregnados com os fungicidas foram colocados sobre o meio de cultura contendo a suspensão bacteriana em pontos equidistantes da placa de Petri. Para cada placa foram aplicados três discos de papel filtro e realizadas três repetições para cada concentração do produto químico.

As placas foram mantidas em estufa bacteriológica à 28 ± 2 °C e avaliadas 24 e 48 h após a incubação quanto à presença de halos de inibição. O diâmetro dos halos de inibição foi medido utilizando paquímetro digital e os resultados foram expressos em mm

(ROMEIRO, 2001). Os tratamentos foram representados em triplicata, sendo que a média dos halos dos três discos de cada placa foi utilizada como uma repetição.

Os halos de inibição observados nas placas contendo discos de papel filtro impregnados com estreptomicina serviram de parâmetro para o antibiograma de produtos químicos recomendados para a cultura da soja.

2.2 Sensibilidade a fungicidas agrícolas incorporados ao meio de cultura

A concentração do ingrediente ativo de cada fungicida foi preparada no volume final de 100 mL utilizando água destilada estéril. Foram utilizadas três concentrações diferentes: dose recomendada, metade da dose e dose dobrada. Alíquotas de cada fungicida foram adicionadas a 50 mL do meio de cultura 523, semi-sólido fundente (40 °C), de forma que permanecesse a concentração final desejada. Os meios de cultura com o fungicida incorporado foram vertidos em placas de Petri de tamanho pequeno e após solidificação, adicionou-se 10 µL de uma suspensão do agente biótico, na concentração de 2×10^5 UFC mL⁻¹ de *Bacillus* sp., espalhando-se uniformemente com auxílio da alça de Drigalski, em três repetições para cada concentração.

O isolado do agente biótico em teste foi semeado em meio de cultura 523, não contendo fungicidas e denominado de testemunha positiva e o meio de cultura 523 contendo estreptomicina e o agente biótico foi denominado de testemunha negativa. As placas foram

mantidas em estufa bacteriológica a 28 ± 2 °C, até o momento das avaliações.

As avaliações foram realizadas 24, 48 e 72 h após a semeadura, observando-se o crescimento bacteriano do agente biótico nos meios de cultura contendo fungicidas, utilizando-se o seguinte critério: a) crescimento bacteriano abundante - compatibilidade do agente biótico *Bacillus* sp. com o produto na concentração em teste; b) crescimento de poucas colônias - tolerância; c) nenhum crescimento bacteriano - incompatibilidade ou sensibilidade ao produto químico na concentração utilizada.

Os produtos químicos e as concentrações testadas foram os mesmos do experimento anterior, em três concentrações de ingrediente ativo, conforme estabelecido no registro dos fungicidas para a cultura da soja. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado.

2.3 Representação e análise dos resultados

Os dados foram transformados em " $(x+k)^{1/2}$ " com $k = 0,1$ e submetidos à análise estatística, realizada através do programa SASM-Agri, utilizando análise da variância e teste de Tukey a 5% de probabilidade (CANTERI et al., 2001).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Antibiograma com fungicidas impregnados em disco de papel filtro

O crescimento bacteriano de *Bacillus* sp. não foi afetado quando exposto aos discos impregnados com os ingredientes ativos Azoxystrobin, Azoxystrobin+ciproconazole, Carbendazin, Epoxiconazole, Flutriafol, Pyraclostrobin+epoxiconazole, Trifloxystrobin+ciproconazole nas três concentrações testadas, tanto no período de 1 h quanto no de 24 h (Tabela 10), indicando que estas substâncias químicas, nas concentrações recomendadas, não afetam o crescimento do agente biótico.

Melo et al. (2008), avaliando o efeito de defensivos agrícolas sobre o desenvolvimento de *Dicyma pulvinata* (agente biocontrolador de *Microcyclus ulei* causador do mal-das-folhas de seringueira), observaram a inibição do crescimento de colônias com a utilização dos produtos Benomyl, Carbendazin, Propiconazol e Mancozeb. Estes resultados divergem dos obtidos no presente trabalho, indicando que é bastante variável a ação dos fungicidas sobre agentes de biocontrole, necessitando estudos específicos para cada combinação.

Tabela 10 - Diâmetro do halo de inibição (mm) de ingredientes ativos recomendados para a cultura da soja, em três concentrações diferentes e dois períodos de impregnação, confrontado com *Bacillus* sp.

Ingrediente ativo (mg/L)	Diâmetro do halo de inibição (mm) ¹	
	1 h ²	24 h ²
Azoxystrobin (250)	0,00 d ³	0,00 g
Azoxystrobin (500)*	0,00 d	0,00 g
Azoxystrobin (1000)	0,00 d	0,00 g
Azoxystrobin+ciproconazole (300+120)	0,00 d	0,00 g
Azoxystrobin+ciproconazole (600+240)*	0,00 d	0,00 g
Azoxystrobin+ciproconazole (1200+480)	0,00 d	0,00 g
Carbendazin (1250)	0,00 d	0,00 g
Carbendazin (2500)*	0,00 d	0,00 g
Carbendazin (5000)	0,00 d	0,00 g
Epoxiconazole (250)	0,00 d	0,00 g
Epoxiconazole (500)*	0,00 d	0,00 g
Epoxiconazole (1000)	0,00 d	0,00 g
Flutriafol (312,5)	0,00 d	0,00 g
Flutriafol (625)*	0,00 d	0,00 g
Flutriafol (1250)	0,00 d	0,00 g
Myclobutanil (500)	0,00 d	0,00 g
Myclobutanil (1000)*	0,00 d	0,00 g
Myclobutanil (2000)	5,05 b	6,49 d
Pyraclostrobin+epoxiconazole (332,5+125)	0,00 d	0,00 g
Pyraclostrobin+epoxiconazole (665+250)*	0,00 d	0,00 g
Pyraclostrobin+epoxiconazole (1330+500)	0,00 d	0,00 g
Tebuconazole (500)	4,00 c	5,00 f
Tebuconazole (1000)*	4,83 b	7,03 c
Tebuconazole (2000)	5,10 b	15,51 b
Trifloxystrobin+ciproconazole (187,5+120)	0,00 d	0,00 g
Trifloxystrobin+ciproconazole (562+240)*	0,00 d	0,00 g
Trifloxystrobin+ciproconazole (1124+480)	0,00 d	0,00 g
Trifloxystrobin+tebuconazole (250+500)	0,00 d	0,00 g
Trifloxystrobin+tebuconazole (500+1000)*	0,00 d	0,00 g
Trifloxystrobin+tebuconazole (1000+2000)	0,00 d	5,71 e
Estreptomicina (1)	18,00 a	28,01 a
C.V. (%)	4,45	2,93

*Concentração recomendada do ingrediente ativo.

¹Diâmetro total do halo de inibição, incluindo o tamanho do disco de papel filtro (3 mm). ²Tempo de permanência do disco de papel filtro imerso no ingrediente ativo. ³Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

O ingrediente ativo Myclobutanil somente apresentou halo de inibição quando foi testada a concentração dobrada em relação à recomendada, nos dois tempos de impregnação. Resultado semelhante foi obtido com o ingrediente ativo Trifloxystrobin+tebuconazole, observando-se a presença de halo de inibição somente na concentração dobrada em relação à recomendada com 24 h de impregnação do produto no disco de papel.

O único ingrediente ativo que apresentou halo de inibição nas três concentrações testadas foi Tebuconazole, sendo que o diâmetro dos halos aumentou conforme aumentava a concentração do produto. Também foram observadas diferenças entre os dois tempos de permanência dos discos de papel filtro no ingrediente ativo, sendo menor o halo em 1 h e maior em 24 h. Estes resultados indicam que o tempo de exposição interfere na ação do produto químico sobre *Bacillus* sp.

Segundo Luz (2000), o crescimento e a capacidade de antagonismo da bactéria *Paenibacillus macerans* em milho não foram afetados pela aplicação de fungicidas, incluindo Difenconazole. O autor concluiu que há possibilidade da combinação de tratamento biológico e químico.

Em testes realizados com Penycuron e *Pseudomonas fluorescens in vitro*, Duffy (2000) concluiu que o fungicida não apresentou inibição do crescimento da bactéria, havendo compatibilidade entre os mesmos e assim, se aplicados em combinação não perderiam a sua eficácia como fungicida e agente biocontrolador.

Romeiro & Macagnan (2004) realizaram testes de compatibilidade de defensivos agrícolas com uma rizobactéria com potencial indutor de resistência e constataram que esta foi insensível a 22 pesticidas. No entanto, constataram que Captan, Clorotalonil, Mancozeb, Tebuconazole e Tiram inibiram o crescimento da rizobactéria na metade da dose, na dose recomendada e no dobro da dose. Resultado semelhante foi observado no presente trabalho com o fungicida Tebuconazole.

A compatibilidade dos produtos químicos testados com o agente de biocontrole, *Bacillus* sp., permite que se insiram no sistema de manejo integrado e assim, possibilite a alternância de aplicações ou a combinação de biocontroladores de doenças e fungicidas (KORSTEN et al., 1997; DUFFY, 2000; KONDOH et al., 2001).

3.2 Sensibilidade a fungicidas agrícolas incorporados ao meio de cultura

A avaliação do crescimento de *Bacillus* sp. quando semeado em meio de cultura contendo os ingredientes ativos, demonstrou que esta bactéria é insensível à Azoxystrobin, Azoxystrobin+ciproconazole, Carbendazin, Epoxiconazole e Pyraclostrobin+epoxiconazole, nas três concentrações testadas (Tabela 11), crescendo abundantemente no meio de cultura como a testemunha positiva, que não continha nenhum ingrediente ativo incorporado ao meio.

Tabela 11 - Crescimento bacteriano de *Bacillus* sp. em meio de cultura contendo ingredientes ativos recomendados para a cultura da soja, em três concentrações diferentes e incubados por 24, 48 e 72 h

Ingrediente ativo (mg/L)	Desenvolvimento horas após incubação ¹		
	24 h	48 h	72 h
Azoxystrobin (250)	2 a ²	2 a	2 a
Azoxystrobin (500)*	2 a	2 a	2 a
Azoxystrobin (1000)	2 a	2 a	2 a
Azoxystrobin+ciproconazole (300+120)	2 a	2 a	2 a
Azoxystrobin+ciproconazole (600+240)*	2 a	2 a	2 a
Azoxystrobin+ciproconazole (1200+480)	2 a	2 a	2 a
Carbendazin (1250)	2 a	2 a	2 a
Carbendazin (2500)*	2 a	2 a	2 a
Carbendazin (5000)	2 a	2 a	2 a
Epoxiconazole (250)	2 a	2 a	2 a
Epoxiconazole (500)*	2 a	2 a	2 a
Epoxiconazole (1000)	2 a	2 a	2 a
Flutriafol (312,5)	2 a	2 a	2 a
Flutriafol (625)*	1 b	1 b	1 b
Flutriafol (1250)	1 b	1 b	1 b
Myclobutanil (500)	2 a	2 a	2 a
Myclobutanil (1000)*	1 b	1 b	1 b
Myclobutanil (2000)	1 b	1 b	1 b
Pyraclostrobin+epoxiconazole (332,5+125)	2 a	2 a	2 a
Pyraclostrobin+epoxiconazole (665+250)*	2 a	2 a	2 a
Pyraclostrobin+epoxiconazole (1330+500)	2 a	2 a	2 a
Tebuconazole (500)	1 b	1 b	1 b
Tebuconazole (1000)*	1 b	1 b	1 b
Tebuconazole (2000)	1 b	1 b	1 b
Trifloxystrobin+ciproconazole (187,5+120)	2 a	2 a	2 a
Trifloxystrobin+ciproconazole (562+240)*	2 a	2 a	2 a
Trifloxystrobin+ciproconazole (1124+480)	1 b	2 a	2 a
Trifloxystrobin+tebuconazole (250+500)	1 b	1 b	1 b
Trifloxystrobin+tebuconazole (500+1000)*	1 b	1 b	1 b
Trifloxystrobin+tebuconazole (1000+2000)	1 b	1 b	1 b
Testemunha negativa - Estreptomicina (1)	0 c	0 c	0 c
Testemunha positiva	2 a	2 a	2 a

*Concentração recomendada do ingrediente ativo.

¹Desenvolvimento do agente biótico no meio de cultura contendo os ingredientes ativos, onde: 2= Abundante crescimento bacteriano; 1= Pouco crescimento bacteriano; 0= nenhum crescimento bacteriano. ²Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

No meio de cultura com o antibiótico estreptomicina (testemunha negativa) não foi observado crescimento bacteriano, indicando ser este um agente antimicrobiano do tipo bactericida, justificando seu uso como parâmetro de inibição do crescimento de *Bacillus* sp. neste trabalho.

Nos meios de cultura contendo os ingredientes ativos Flutriafol e Myclobutanil observou-se crescimento abundante de *Bacillus* sp. na metade da concentração, mas pouco crescimento na concentração recomendada e na dose dobrada. Já Trifloxystrobin+ciproconazole apresentou crescimento abundante de *Bacillus* sp. em todas as concentrações testadas, exceto na concentração dobrada (1124+480 mg) nas primeiras 24 h de incubação. Neste período, observou-se crescimento lento da bactéria caracterizando um atraso no desenvolvimento, mas que foi superado nos períodos seguintes, igualando-se a testemunha positiva.

Em estudos realizados por Shishkoff & McGrath (2002) utilizando um biofungicida à base de *Ampelomyces quisqualis* empregado no controle de *Podosphaera xanthii*, demonstraram a compatibilidade com os fungicidas Myclobutanil ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) e Triadimefon ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$). Estes mesmos autores ainda observaram que a substituição de algumas aplicações do fungicida pelo agente biológico, ou seja, a alternância de tratamentos, além de reduzir a quantidade de produtos químicos expostos ao ambiente e a saúde humana, resultou em controle mais efetivo da doença.

Os meios de cultura contendo os ingredientes ativos Tebuconazole e Trifloxystrobin+tebuconazole apresentaram pouco crescimento bacteriano em todas as concentrações testadas, não

havendo progresso no crescimento das 24 até 72 h de incubação. Observou-se que em 24 h de incubação havia poucas unidades formadoras de colônias bacterianas e que estas, permaneceram sem aumento de tamanho e de número até a última avaliação em 72 h de incubação. Estes produtos químicos exercem uma ação bacteriostática sobre o isolado de *Bacillus* sp., não permitindo o seu crescimento.

Halfeld-Vieira (2002) observou que isolados bacterianos residentes do filoplano de tomateiro, utilizados como agentes de controle biológico de doenças na mesma cultura, apresentaram crescimento restrito aos ingredientes ativos Metalaxyl, Oxicloreto de cobre e Tebuconazole. Resultados semelhante foram observados no presente trabalho para a bactéria *Bacillus* sp., utilizada como agente de biocontrole, quando exposta ao produto químico Tebuconazole sozinho ou em combinação (Trifloxystrobin+tebuconazole).

Segundo Romeiro (2001) algumas substâncias podem ser usadas sozinhas ou em combinação como agentes seletivos em meio de cultura, e principalmente para a seleção de mutantes espontâneos resistentes a altas concentrações de produtos químicos. Desta forma, as colônias de *Bacillus* sp. insensíveis aos ingredientes ativos de vários fungicidas poderiam ser selecionadas e testadas nos programas de controle biológico e indução de resistência contra doenças de diferentes etiologias.

Um fato importante observado foi que a maioria dos ingredientes ativos testados, utilizados em fungicidas recomendados para a cultura da soja não inibiu o crescimento do agente biótico *Bacillus* sp. *in vitro*, não comprometendo a sua eficiência quando

aplicados num sistema de manejo integrado, seja alternado ou em combinação.

Esta estratégia, além de otimizar a eficiência dos tratamentos é um modo de prevenir a seleção de populações de patógenos resistentes a fungicidas, o que reduz a eficiência do controle químico ao longo do tempo (PAULITZ & BÉLANGER, 2001). Assim, pode-se aliar ao sistema de previsão, onde produtos químicos poderiam ser utilizados somente em casos extremos de grande favorecimento dos patógenos e os agentes de biocontrole aplicados em situações de menor risco (SHTIENBERG & ELAD, 1997).

Conforme Kimati (1995), a pressão de seleção sobre o patógeno através de fungicidas pode ser diminuída restringindo a aplicação do fungicida a períodos críticos da doença e ainda reduzindo a quantidade aplicada e a frequência de aplicação a um mínimo necessário para controle econômico. Outra alternativa seria o emprego de doses reduzidas de fungicidas, pois estes estressam e enfraquecem o patógeno e tornam seus propágulos mais suscetíveis ao ataque subsequente por um agente antagonista (SPADARO & GULLINO, 2005).

Desta forma, a aplicação intercalada de fungicidas com agente biótico de controle de doenças faz-se importante para manter a eficácia de ambos, sem causar resistência de patógenos pela exposição prolongada ao agente químico, e ainda sem agredir o meio ambiente e causar danos a saúde humana.

4 CONCLUSÕES

O isolado de *Bacillus* sp. (UPF 008) é insensível a Azoxystrobin, Azoxystrobin+ciproconazole, Carbendazin, Epoxiconazole e Pyraclostrobin+epoxiconazole nas concentrações recomendadas para a cultura da soja.

O ingrediente ativo Tebuconazole sozinho ou em combinação Trifloxystrobin+tebuconazole apresenta ação bacteriostática sobre *Bacillus* sp., inclusive na metade da dose recomendada.

CAPITULO IV

REAÇÃO DE CULTIVARES DE SOJA A *PSEUDOMONAS SAVASTANOI* PV. *GLYCINEA* E A *BACILLUS* SP. E TESTE DE FITOTOXICIDADE DE ACIBENZOLAR-S-METIL

CHEILA CRISTINA SBALCHEIRO¹, NORIMAR D'ÁVILA DENARDIN² & FRANCISMAR CORRÊA MARCELINO³

RESUMO - As cultivares nacionais de soja apresentam baixa ou nenhuma resistência a *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*, e por muitas vezes a reação a esta bacteriose permanece desconhecida, tornando o seu cultivo incerto e exposto a prejuízos. O presente trabalho objetivou avaliar a reação de cultivares de soja à *P. savastanoi* pv. *glycinea*, e ao agente biótico *Bacillus* sp. e testar a fitotoxicidade do agente abiótico acibenzolar-S-metil. As inoculações da suspensão bacteriana e soluções dos agentes biótico e abiótico através de cortes dos folíolos foram realizadas em plantas no estádio V, mantidas em casa de vegetação em condições ideais para o desenvolvimento da doença. As plantas foram observadas diariamente e avaliadas quanto ao progresso da doença e os danos no tecido foliar. As quatro cultivares testadas não apresentaram reação ao agente biótico e nem sinais de fitotoxicidade ao agente abiótico. Nas

¹ Bióloga, Mestre em Agronomia, Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Agronomia da FAMV/UPF, Área de Concentração em Fitopatologia.

² Orientadora, Bióloga, Dra. Professora da FAMV/UPF – norimar@upf.br

³ Co-orientadora, Bióloga, Dra. Pesquisadora da Embrapa Soja – francm@cnpso.embrapa.br

avaliações a fitobactéria Psg as cultivares BRS 243RR, BRS 244RR e BRS 255RR apresentaram reação de resistência enquanto a cultivar BRS 246RR reação de suscetibilidade à *P. savastanoi* pv. *glycinea*.

Palavras-chave: resistência, suscetibilidade.

**REACTION OF SOYBEAN CULTIVARS OF A
PSEUDOMONAS SAVASTANOI PV. *GLYCINEA* AND
BACILLUS SP. AND TESTING OF PHYTOTOXICITY
ACIBENZOLAR-S-METHYL**

ABSTRACT - The national soybean cultivars have low or no resistance to *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*, and often reaction to this bacterial disease remains unknown, making its culture and exposed to uncertain losses. This study aimed to evaluate the reaction of soybean to *P. savastanoi* pv. *glycinea*, and the biotic agent *Bacillus* sp. and the test phytotoxicity of abiotic agent acibenzolar-S-methyl. The inoculations of the bacterial suspension and solutions to biotic and abiotic agents cuts through the leaflets were performed on plants at stage V, kept in a greenhouse in ideal conditions for disease development. Plants were observed daily and evaluated for disease progression and damage to the leaf tissue. The four cultivars tested showed no reaction to the biotic agent and no signs of phytotoxicity to abiotic agent. In assessments phyto bacteria Psg, BRS 243RR, BRS BRS 244RR and 255RR showed resistance reaction while the BRS 246RR reaction susceptibility to *P. savastanoi* pv. *glycinea*.

Key words: resistance, susceptibility.

1 INTRODUÇÃO

A bactéria *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* (Coerper) Young, Dye & Wilkie, agente etiológico do crestamento bacteriano da soja, causa grande prejuízo às lavouras, podendo chegar a 40% de danos em condições favoráveis ao seu desenvolvimento (HARTMAN, 1999).

O controle químico para bacteriose, com a aplicação de antibióticos e fungicidas, tem sido pesquisado, entretanto, devido ao rápido aumento do inóculo e fácil disseminação do patógeno, em muitos casos, não é eficiente (ARAÚJO et al., 2003). Além disso, as cultivares nacionais apresentam baixa ou nenhuma resistência a *P. savastanoi* pv. *glycinea* (YORINORI, 2002; ALMEIDA et al., 2005) e inúmeras delas ainda permanecem sem dados sobre a reação diante da fitobactéria (REUNIÃO..., 2009).

O acibenzolar-S-metil tem se mostrado muito eficiente na indução de resistência por levar à expressão de genes relacionados à resistência sistêmica adquirida, além de apresentar baixa fitotoxidez (GÖRLACH et al., 1996; KUNZ et al., 1997).

O cultivo de cultivares de elevados potenciais produtivos e resistentes a doenças é fundamental para continuar agregando rendimento na produção brasileira de soja. Assim, o conhecimento das reações de cultivares aos patógenos incidentes na cultura é necessário para estabelecer estratégias de manejo na lavoura.

Neste contexto, objetivou-se avaliar a reação de cultivares de soja a bactéria fitopatogênica *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* e a reação das cultivares a aplicação da bactéria *Bacillus* sp.

utilizada como agente de controle biológico e indução de resistência, bem como testar a fitotoxicidade de acibenzolar-S-metil.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Bacteriologia Vegetal e casa de vegetação da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo – FAMV/UPF, Passo Fundo-RS.

As sementes foram semeadas em vasos com capacidade para 3 kg, contendo solo, substrato e vermiculita (2:2:1). O solo utilizado pertence à classe Latossolo Vermelho distrófico típico, unidade de mapeamento Passo Fundo, com 65% de argila pertencente à Classe 1, corrigido o pH e fertilidade do mesmo de acordo com o Manual de adubação e de calagem (SOCIEDADE, 2004).

Nesta análise foram utilizadas sementes das cultivares BRS 243RR, BRS 244RR, BRS 246RR e BRS 255RR escolhidas pelas características agronômicas como, tipo de ciclo e reações a doenças fúngicas, além da recomendação para o Estado do Rio Grande do Sul (REUNIÃO..., 2009).

Cada tratamento foi representado por cinco vasos com duas plantas cada, ou seja, dez repetições, sendo cada planta uma repetição biológica. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado.

2.1 Reação de cultivares de soja a *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*

As plantas no estágio V de desenvolvimento foram inoculadas artificialmente com o isolado bacteriano IB 1219 de *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* (Psg), proveniente da coleção de fitobactérias do Instituto Biológico, Estação Experimental de Campinas.

Para a padronização do inóculo, uma suspensão bacteriana em 10 mM MgCl₂ e ajustada em água destilada esterilizada para uma concentração de 1×10^8 UFC mL⁻¹, foi utilizada para inoculação das plantas de soja. A inoculação foi efetuada pelo método do corte com tesoura esterilizada, realizando-se dois cortes de aproximadamente 2 cm, por folíolo, num total de seis cortes por trifólio, obtendo-se dessa forma 12 cortes por planta. A cada corte a tesoura era mergulhada na suspensão bacteriana. Plantas de soja inoculadas com solução salina (0,85%) foram mantidas como controle.

Foram inoculadas duas plantas por vaso e mantidas em casa de vegetação a uma temperatura entre 20 e 30 °C e irrigação diária por aspersão. As plantas foram expostas a condições artificiais de ambiente para favorecer o desenvolvimento do cretamento bacteriano da soja na casa de vegetação.

O cálculo da área da lesão deu-se a partir da largura do sintoma nos cortes realizados nos trifólios das plantas de soja. Esta avaliação foi realizada diariamente a partir do surgimento dos primeiros sintomas. As medições foram realizadas com auxílio de paquímetro digital e fotografias.

A severidade da doença foi avaliada no dia em que apareceram os primeiros sintomas e após 15 dias do surgimento dos mesmos. Foram atribuídas notas para as avaliações da severidade (sintomas da doença) da lesão em milímetros da expansão a partir da seção (corte), utilizando-se uma escala onde: resistente = 0 a < 1 mm; moderadamente resistente = 1 a < 2 mm; moderadamente suscetível = 2 a < 3 mm; suscetível = 3 a < 4 mm; altamente suscetível = > 4 mm. Desta forma, as notas representam uma escala de 0 a 4, onde 0 = resistente, 1 = moderadamente resistente, 2 = moderadamente suscetível, 3 = suscetível e 4 = altamente suscetível.

Através deste procedimento foi confirmada a classificação das cultivares quanto à reação a Psg (resistente ou suscetível), visto que algumas cultivares permanecia sem esta informação.

2.2 Reação de cultivares de soja a *Bacillus* sp.

As plantas no estágio V de desenvolvimento foram expostas a um isolado (UPF 008) de *Bacillus* sp. em suspensão e a uma formulação a base de polímeros contendo goma xantana e polivinilpirrolidona, para verificação de uma possível reação danosa à área foliar de plantas de soja.

O isolado de *Bacillus* sp. crescido em meio de cultura 523 por 24 h, foi ressuspendido em 20 mL de solução fisiológica formando a suspensão de inoculação nas plantas. Procedeu-se a quantificação de UFC da suspensão através do método de diluição sucessiva e semeadura de alíquotas de 200 µl em meio de cultura 523. Após 48 h

de incubação a 28 ± 2 °C, obteve-se 2×10^8 UFC mL⁻¹ de *Bacillus* sp. na suspensão de aplicação.

O isolado de *Bacillus* sp. também foi veiculado a uma formulação à base de polímero contendo 1 g de goma xantana, 1,5 g de polivinilpirrolidona (PVP) e 100 mL de água destilada estéril (DENARDIN & FREIRE, 2000) para o teste de reação de cultivares de soja com uma formulação. Uma alíquota de 5 mL da suspensão bacteriana contendo 2×10^8 UFC mL⁻¹ de *Bacillus* sp. foi acrescentada em 20 mL da formulação.

Com auxílio de tesoura estéril mergulhada na suspensão de *Bacillus* sp. realizou-se dois cortes de aproximadamente 2 cm por folíolo, num total de seis cortes por trifólio, obtendo-se dessa forma 12 cortes por planta. O mesmo procedimento foi utilizado para a formulação de goma xantana com *Bacillus* sp.

As avaliações foram realizadas diariamente, para verificar algum sinal de incompatibilidade do isolado de *Bacillus* sp. com a área foliar de plantas de soja e a possibilidade de fitotoxicidade destes quando formulado com polímeros.

2.3 Teste de fitotoxicidade de acibenzolar-S-metil em plantas de soja

O agente abiótico foi preparado conforme recomendação do fabricante, numa concentração de 5 mg i.a. L⁻¹ de acibenzolar-S-metil - ASM (Bion® - Syngenta®). Com auxílio de tesoura estéril mergulhada a cada corte na solução do agente abiótico realizou-se dois cortes de aproximadamente 2 cm por folíolo, num total de seis

cortes por trifólio, obtendo-se dessa forma 12 cortes por planta. As avaliações foram realizadas diariamente, para verificar algum sinal de fitotoxicidade do produto na área foliar de plantas de soja.

Plantas com cortes realizados com tesoura estéril mergulhada em solução salina 0,85%, representando as plantas controle para os testes foram mantidas nas mesmas condições que as demais plantas.

O delineamento experimental para todos os ensaio foi inteiramente casualizado.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Reação de cultivares de soja a *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*

As cultivares de soja testadas quanto à reação *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* apresentaram diferenças em relação ao tamanho da lesão causada pela inoculação da bactéria nas folhas (Figura 2). A cultivar BRS 246RR apresentou a maior lesão em relação às demais, com uma média de 1,22 mm de lesão da borda do corte na folha. Contudo, a cultivar BRS 244RR apresentou a menor lesão com 0,39 mm. Estes dados permitiram classificar as cultivares em função do tamanho da lesão causada pela progressão da bactéria no tecido vegetal, indicando a suscetibilidade ou resistência da planta (Tabela 12).

As cultivares BRS 243RR, BRS 244RR e BRS 255RR apresentaram pequeno tamanho de lesão e conseqüentemente baixa

severidade, sem progresso da doença em tecidos novos, classificando-se na nota 0 da escala de avaliação e indicando apresentar resistência ao patógeno. Na avaliação da severidade da cultivar BRS 246RR, os dados demonstraram que esta se classifica como moderadamente suscetível, visto que em algumas das amostras avaliadas o tamanho da lesão ficou abaixo de 2 mm e em outras acima de 2 mm.

Tabela 12 - Reação de cultivares de soja a *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*

Cultivar	Média da severidade (mm)	Nota/Severidade ¹	Reação ²
BRS 243RR	0,61	0	R
BRS 244RR	0,39	0	R
BRS 246RR	1,22	2	MS
BRS 255RR	0,48	0	R

^{1,2} Nota da severidade e reação do cultivar, onde 0 = resistente (R); 1 = moderadamente resistente (MR); 2 = moderadamente suscetível (MS); 3 = suscetível (S); 4 = altamente suscetível (AS).

As cultivares de soja BRS 243RR e BRS 246RR, foram escolhidas para dar prosseguimento aos ensaios de controle de doenças em casa de vegetação devido às reações apresentadas neste trabalho. A escolha das cultivares também foi em razão da reação frente à outra bacteriose comum nas lavouras de soja, a pústula bacteriana incitada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*.

Assim, a cultivar BRS 243RR é resistente ao cretamento bacteriano e a pústula bacteriana e BRS 246RR é suscetível ao cretamento bacteriano e a pústula bacteriana, permitindo trabalhar

com cultivares totalmente resistentes ou suscetíveis as duas bacterioses que incidem na cultura da soja.

Esta estratégia foi adotada para verificar o controle exercido pelos agentes biótico e abiótico, bem como as possíveis alterações no metabolismo decorrentes da interação com plantas resistentes e suscetíveis.

3.2 Reação de cultivares de soja a *Bacillus* sp.

As avaliações da exposição da área foliar de plantas de soja com o agente biótico *Bacillus* sp. demonstraram que este não produziu lesões no tecido (Figura 1) ou qualquer dano que pudesse interferir na atividade fotossintética das folhas das quatro cultivares testadas (Tabela 13).

Tabela 13 - Reação de cultivares de soja a inoculação com isolado de *Bacillus* sp. e uma formulação a base de polímeros e *Bacillus* sp.

Cultivar	Reação	
	Isolado de <i>Bacillus</i> sp.	Formulação de <i>Bacillus</i> sp.
BRS 243RR	Negativa	Negativa
BRS 244RR	Negativa	Negativa
BRS 246RR	Negativa	Negativa
BRS 255RR	Negativa	Negativa

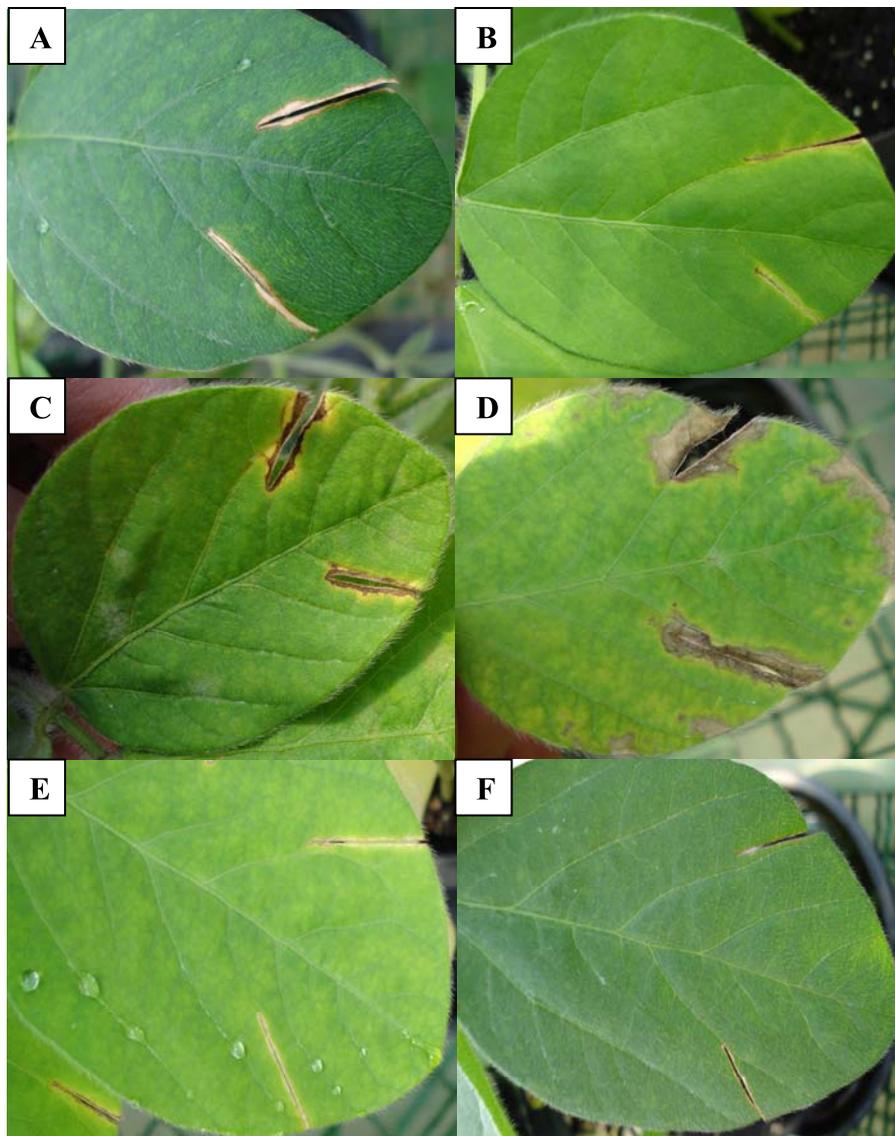


Figura 2 – Foliolos de cultivares de soja submetidos à suspensão bacteriana de *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* A= BRS 244RR, B= BRS 255RR, C=BRS 243RR, D= BRS 246RR, E= BRS 246RR inoculada com *Bacillus* sp. (isolado UPF 008), F= BRS 246RR secção com acibenzolar-S-metil.

As cultivares testadas quanto a reação à formulação a base de polímeros e *Bacillus* sp. não apresentaram sinais de danos ao tecido vegetal. Estes resultados demonstram que os componentes da formulação não são tóxicos ao tecido foliar da planta e que a combinação deste com o agente biótico *Bacillus* sp. não causa danos ao tecido vegetal.

Como o isolado UPF 008 de *Bacillus* sp. é oriundo de porções de solo, seria possível apresentar algum dano nas folhas devido à ausência de adaptação ao tecido foliar. Porém, os resultados obtidos demonstraram que esta bactéria não penetrou no tecido, permanecendo sobre as folhas, possivelmente, recebendo nutrientes através de exsudatos oriundas da planta.

Além disso, ao entrar em contato com as células vegetais, este agente biótico *Bacillus* sp. pode liberar moléculas que interagem com receptores de membrana celular vegetal e desencadear mecanismos de defesa, agindo como indutor de resistência. Tendo em vista que o isolado do *Bacillus* sp. (UPF 008) em estudo produz compostos voláteis que atuam sobre a bactéria *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*.

Outra preocupação com a aplicação de agentes bióticos é a sua veiculação em formulações, pois estas não podem ser tóxicas às plantas ou causar qualquer tipo de dano ao tecido. Caso a formulação causasse sinais de dano ao tecido foliar da planta, poderiam ser desencadeados mecanismos de defesa à injúria.

Na literatura não há muitos trabalhos demonstrando a reação de plantas quando inoculadas com agentes bióticos de controle de doenças. Assim sendo, é de fundamental importância a realização

destes testes, ainda mais quando são utilizados micro-organismos oriundos de locais diferentes daqueles em que serão futuramente aplicados. Testes com possíveis formulações e meios de veiculação desses micro-organismos são também fundamentais para que não causem danos ao tecido vegetal que venham a interferir em algum processo fisiológico importante para o desenvolvimento da planta.

3.3 Teste de fitotoxicidade de acibenzolar-S-metil em plantas de soja

Nas avaliações de fitotoxicidade de acibenzolar-S-metil em plantas de soja, não foram observados sinais de dano ao tecido vegetal, indicando que o produto na concentração de 5 mg de i.a. L⁻¹ não apresenta potencial tóxico para a cultura da soja (Figura 2).

Outros estudos apresentaram resultados semelhantes, concluindo que o produto comercial Bion® não é fitotóxico e como seu uso com sucesso em aplicações em tomate contra *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, cacau no controle de *Crinipelis perniciosus* e citros contra *Xylella fastidiosa* (RYALS et al., 1996; SILVA & RESENDE, 2001).

Pascholati (1999) mencionou que podem ocorrer efeitos colaterais que afetam a planta em aplicações superiores a 50 ppm, estabelecendo este, o limite da concentração de ASM para aplicações em plantas. No entanto, Benelli et al. (2004) verificaram que as concentrações de ASM de 60, 120, 150, 200 e 250 mg i.a. L⁻¹ não afetaram a brotação normal de tubérculos de batata. Desta forma, pode-se concluir que para cada espécie vegetal deve ser realizado o

teste de fitotoxicidade de ASM e estabelecer um limiar de dano em função das concentrações do produto.

4 CONCLUSÕES

As quatro cultivares de soja testadas não apresentaram reação ao agente biótico *Bacillus* sp. isolado UPF 008, bem como quando veiculado a polímeros.

As cultivares BRS 243RR, BRS 244RR, BRS 246RR e BRS 255RR não apresentaram sinais de fitotoxicidade frente ao agente abiótico acibenzolar-S-metil.

As cultivares BRS 243RR, BRS 244RR e BRS 255RR apresentaram reação de resistência e BRS 246RR reação de suscetibilidade a *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*.

CAPITULO V**CONTROLE DO CRESTAMENTO BACTERIANO DA SOJA
CAUSADO POR *PSEUDOMONAS SAVASTANOI* PV.
GLYCINEA COM *BACILLUS SP.* E ACIBENZOLAR-S-METIL****CHEILA CRISTINA SBALCHEIRO¹, NORIMAR D'ÁVILA
DENARDIN² & FRANCISMAR CORRÊA MARCELINO³**

RESUMO - O crestamento bacteriano é a doença de etiologia bacteriana mais importante na cultura da soja. Os danos são elevados nas lavouras com condições favoráveis ao desenvolvimento da fitobactéria *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* (Psg). O controle biológico e a indução de resistência são práticas alternativas aos métodos de controle de doenças utilizados tradicionalmente. Objetivando avaliar o uso potencial de *Bacillus* sp. e acibenzolar-S-metil (ASM) no controle do crestamento bacteriano da soja em casa de vegetação, utilizou-se as cultivares BRS 243RR (resistente) e BRS 246RR (suscetível) nas avaliações de incidência e severidade da doença. Os agentes biótico *Bacillus* sp. e abiótico ASM foram aplicados previamente a inoculação com a fitobactéria nas plantas de soja. A partir do surgimento dos primeiros sintomas da doença, procedeu-se as avaliações da incidência e severidade da doença a cada

¹ Bióloga, Mestre em Agronomia, Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Agronomia da FAMV/UPF, Área de Concentração em Fitopatologia.

² Orientadora, Bióloga, Dra. Professora da FAMV/UPF – norimar@upf.br

³ Co-orientadora, Bióloga, Dra. Pesquisadora da Embrapa Soja – francm@cnpso.embrapa.br

sete dias e a construção da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD). Os resultados demonstraram que o agente biótico *Bacillus* sp. exerceu controle de 56,41% e o agente abiótico ASM controle de 44,71% do crestamento bacteriano da soja em cultivares suscetíveis, reduzindo a incidência e a severidade da doença, bem como a AACPD, possivelmente através da indução de resistência.

Palavras-chave: indução de resistência, incidência, severidade.

**CONTROL OF BACTERIAL BLIGHT OF SOYBEAN CAUSED
BY *PSEUDOMONAS SAVASTANOI* PV. *GLYCINEA* WITH
BACILLUS SP. AND ACIBENZOLAR-S-METHYL**

ABSTRACT – The bacterial blight disease is most important bacterial etiology in soybean. The damage is higher in crops with favorable conditions for development of phyto bacteria *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* (Psg). The biological control and resistance induction are practical alternative methods of disease control used traditionally. To evaluate the potential use of *Bacillus* sp. and acibenzolar-and S-methyl (ASM) in the control of bacterial blight of soybeans in the greenhouse was used BRS 243RR (resistant) and BRS 246RR (susceptible) in assessing the incidence and severity of disease. Biotic agents *Bacillus* sp. and abiotic ASM were applied before inoculation with phyto bacteria on soybean plants. From the onset of symptoms of the disease, we proceeded to the evaluation of the incidence and severity of the disease every seven days and the construction of the area under the disease progress curve (AUDPC).

The results showed that the biotic agent *Bacillus* sp. exerted control of 56.41% and abiotic agent ASM control 44.71% of bacterial blight of soybean cultivars susceptible, reducing the incidence and severity of disease as well as the AUDPC, possibly through the induction of resistance.

Key words: induction of resistance, incidence, severity.

1 INTRODUÇÃO

O crestamento bacteriano é a doença de etiologia bacteriana de maior importância para a cultura da soja, devido ao patógeno ser transmitido via semente e permanecer nos restos culturais. Os danos causados por esta bacteriose podem chegar a 40% em lavouras com condições favoráveis à ocorrência do patógeno *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* (HARTMAN, 1999).

O controle alternativo de doenças, não inclui os métodos tradicionais de controle, como o químico e o melhoramento genético, e sim é realizado através do controle biológico e da indução de resistência em plantas (BETTIOL, 1991).

O controle biológico é definido como o controle de um micro-organismo através da ação direta de outro micro-organismo, que pode atuar por meio de diversos mecanismos de interação, entre eles a antibiose e a indução de defesas do hospedeiro (BETTIOL & GHINI, 1995; PASCHOLATI, 1998).

A indução de resistência é baseada numa ação sobre a planta hospedeira, envolvendo a ativação de mecanismos de

resistência latentes nas plantas em resposta ao tratamento com agentes bióticos ou abióticos, resultando no acúmulo de fitoalexinas e de proteínas relacionadas à patogênese (PASCHOLATI, 1998).

Os riscos à saúde humana e ao ambiente, além da ausência de especificidade apresentado pelos defensivos agrícolas sintéticos, acentuam a necessidade de ferramentas e estratégias de controle de doenças, como por exemplo, o controle biológico e à indução de resistência.

Segundo trabalho realizado por Korsten et al. (1997), a aplicação alternada em pré-colheita do agente biótico *Bacillus subtilis*, e de produtos químicos com ação fungicida, foram capazes de reduzir a severidade da mancha de *Pseudocercospora purpurea* em abacateiro.

Iriti & Faoro (2003) observaram que a aplicação de acibenzolar-S-metil (ASM) em plantas de feijoeiro, antes da inoculação com o fungo *Uromyces appendiculatus*, apresentou 100% de redução das pústulas do patógeno e conseqüentemente a redução da incidência e severidade da doença na cultura.

Desta forma, o presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar o uso potencial do agente biótico *Bacillus* sp. e do agente abiótico acibenzolar-S-metil no controle do cretamento bacteriano da soja em casa de vegetação.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Bacteriologia Vegetal e casa de vegetação da Faculdade de

Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo – FAMV/UPF, Passo Fundo-RS.

2.1 Extração e detecção de *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* em sementes de soja

Amostras de sementes das cultivares de soja BRS 243RR e BRS 246RR foram submetidas ao método de extração de bactérias em sementes conforme metodologia desenvolvida por Agostini (2004), para detecção e quantificação de *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* - Psg. A cultivar BRS 243RR é descrita como resistente ao crestamento bacteriano e a BRS 246RR suscetível.

Este teste foi realizado para confirmar a sanidade das sementes que foram utilizadas para os experimentos, caso houvesse a presença da bactéria seria necessário quantificar a mesma, para adequar a inoculação do patógeno sobre as plantas.

2.2 Cultivo em casa de vegetação

Na instalação dos experimentos em casa de vegetação (Tabela 14), as plantas foram expostas à ambiente artificial de ambiente para favorecer o desenvolvimento do crestamento bacteriano da soja. As sementes foram semeadas em vasos com capacidade para 3,6 kg, preenchido com solo, substrato e vermiculita (2:2:1). O solo utilizado pertence à classe Latossolo Vermelho distrófico típico, unidade de mapeamento Passo Fundo, com 65% de argila pertencente

à Classe 1, corrigido o pH e fertilidade do mesmo de acordo com o Manual de adubação e de calagem (SOCIEDADE, 2004).

Tabela 14 - Tratamentos aplicados em plantas de soja para verificação do controle de *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* (Psg) pelos agentes bióticos (*Bacillus* sp.) e abióticos (acibenzolar-S-metil) em casa de vegetação

Tratamentos	Inoculação com Psg	Aplicação foliar
T₁	Sem inoculação	Água
T₂	Com inoculação	Água
T₃	Com inoculação	<i>Bacillus</i> sp.
T₄	Sem inoculação	<i>Bacillus</i> sp.
T₅	Com inoculação	Acibenzolar-S-metil
T₆	Sem inoculação	Acibenzolar-S-metil

Cada tratamento foi representado por cinco vasos com quatro plantas cada, sendo cada planta uma repetição biológica, utilizando-se o delineamento inteiramente casualizado.

2.3 Aplicação do indutor biótico *Bacillus* sp.

O agente biótico *Bacillus* sp. (isolado UPF 008), pertencente ao Laboratório de Bacteriologia da FAMV/UPF, foi utilizado como biocontrole do cretamento bacteriano da soja. Essa bactéria foi veiculada a uma formulação, previamente preparada, à base de polímero contendo 1 g de goma xantana, 1,5 g de

polivinilpirrolidona (PVP) e 100 mL de água destilada e autoclavado a 121 °C por 15 minutos (DENARDIN & FREIRE, 2000).

Colônias puras de *Bacillus* sp. crescidas em meio de cultura 523 por 24 h, foram ressuspendidas em 3 mL de solução fisiológica e transferido para erlenmeyer contendo 50 mL de meio de cultura líquido 523, mantido sob agitação orbital por 48 h à 28 ± 2 °C. Após 48 h, procedeu-se a quantificação de UFC da suspensão através do método de diluição sucessiva e semeadura de 200 µl em meio de cultura 523, obtendo-se $2,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹.

Dessa suspensão, transferiu-se 5 mL para um frasco contendo 20 mL da formulação preparada e esterilizada previamente, constituindo o agente biótico, que posteriormente foi diluído em 500 mL de água destilada esterilizada. Após a diluição foi determinada a concentração de UFC do agente biótico pela técnica de diluição sucessiva, seguida de semeadura de 200 µl em meio de cultura 523 e incubação por 48 h a 28 ± 2 °C, obtendo-se $1,6 \times 10^7$ UFC mL⁻¹ de *Bacillus* sp.

O agente biótico foi aplicado sobre as plantas, por aspersão até o ponto de escorrimento. O estágio de desenvolvimento padrão das plantas foi considerado quando estas apresentaram o segundo trifólio completamente desenvolvido. A partir deste momento deu início a contagem de horas para a realização das avaliações.

2.4 Aplicação do agente abiótico acibenzolar-S-metil - ASM

O agente abiótico foi preparado conforme recomendação do fabricante, numa concentração de 5 mg i.a. L⁻¹ de acibenzolar-S-metil (Bion®). A aplicação do produto foi por aspersão até o ponto de escorrimento sobre as plantas quando estas estavam com o segundo trifólio completamente expandido. A partir deste momento iniciou-se a contagem de horas para a realização das avaliações.

2.5 Inoculação da fitobactéria *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*

A bactéria *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* (Psg), isolado 1219 pertencente a coleção do Instituto Biológico de Campinas e mantida na coleção da Bacterioteca da FAMV/UPF, foi utilizada como inóculo para o desenvolvimento do crestamento bacteriano da soja em casa de vegetação. Colônias puras crescidas em meio de cultura 523 foram utilizadas para preparar uma suspensão em solução fisiológica (0,85%) e ajustada em espectrofotômetro (OD=540 nm) para uma absorbância de 0,5, equivalente a uma concentração aproximada de $2,8 \times 10^5$ UFC mL⁻¹ de Psg.

O inóculo foi pulverizado sobre as folhas das plantas de soja até o ponto de escorrimento. As plantas foram mantidas em casa de vegetação com alta umidade para favorecer o início da infecção e o desenvolvimento da doença. A inoculação das plantas foi realizada 72 h após a aplicação com os agentes indutores bióticos e abióticos.

2.6 Avaliação do crestamento bacteriano da soja

As plantas foram avaliadas quanto aos componentes de resistência, até o florescimento. As avaliações iniciaram no dia em que apareceram os primeiros sintomas e, a partir deste momento prosseguiram a cada sete dias. As avaliações do progresso da doença foram realizadas através da incidência, definida como número de folhas que apresentaram sintomas e pela severidade (%), definida como a porcentagem da área foliar com sintomas.

Foram avaliadas seis plantas de cada tratamento, não constituindo amostras destrutivas. O progresso da doença foi acompanhado sempre nas mesmas plantas. Após a tabulação dos dados, a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) foi calculada.

2.7 Representação e análise dos resultados

Os dados das avaliações foram submetidos à análise estatística, realizada através do programa SAS (Statistical Analysis Systems Institute, Cary, NC), versão 8.0, utilizando o procedimento General Linear Model e teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Extração e detecção de *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* em sementes de soja

As sementes das cultivares BRS 243RR e BRS 246RR, submetidas à extração de bactérias fitopatogênicas, não apresentaram incidência de *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* nas amostras analisadas. Este resultado foi importante para dar continuidade aos experimentos, que necessitavam de sementes livres de patógenos.

Segundo Romeiro (1995) o método mais eficiente para evitar o surgimento de doenças bacterianas em lavouras é o plantio de sementes saudáveis ou abaixo do nível de tolerância da doença no campo. No entanto, quantidades muito pequenas do patógeno na semente podem gerar grandes danos no estabelecimento da lavoura e em todo o ciclo da cultura, além de permanecer na próxima geração de sementes.

Desta forma, para uma correta avaliação do desenvolvimento da doença e os mecanismos desencadeados pela planta em resposta à presença do patógeno, faz-se necessário conhecer a quantidade incidente do agente etiológico sobre a planta analisada, principalmente de bacterioses transmitidas via semente.

3.2 Avaliação do crestamento bacteriano da soja

Os primeiros sintomas do crestamento bacteriano da soja foram observados três dias após a inoculação com *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*. As avaliações da incidência e da severidade

da doença foram realizadas a cada sete dias, observando o progresso da doença nos diferentes tratamentos.

A cultivar BRS 243RR classificada como resistente pelo teste de reação de cultivares a Psg, não apresentou sintomas da doença, em nenhum dos tratamentos. No entanto, observaram-se em algumas plantas do tratamento T₂ pequenas manchas de coloração parda com ausência de bordas amareladas sobre as folhas. Estas manchas não apresentaram progresso no tecido foliar, caracterizando uma resposta de hipersensibilidade (HR) da cultivar resistente a presença do inóculo do patógeno.

A infecção por patógenos resulta em um grande número de alterações fisiológicas e moleculares nas plantas. A resposta de hipersensibilidade é uma forma de morte celular programada em plantas desafiadas por um patógeno incompatível e resulta na formação de pequenas lesões necróticas de coloração parda e sem o progresso da doença nos tecidos (HAMMOND-KOSACK & PARKER, 2003).

As plantas não inoculadas com a Psg (T₁, T₄ e T₆) não apresentaram sintomas da doença nas duas cultivares utilizadas neste experimento. Em todo o ciclo da cultura a ausência de sintomas nas plantas não inoculadas das duas cultivares confirmou os resultados obtidos na extração e detecção de Psg em sementes.

A incidência dos sintomas da doença sobre as folhas inoculadas foram diferentes entre os tratamentos. No tratamento T₂ inoculado apenas com Psg, as plantas apresentaram maior número de folíolos com sintomas, seguido do T₃, aos três dias após a inoculação com o patógeno (Tabela 15).

Tabela 15 - Incidência do crestamento bacteriano em plantas de soja tratadas com agente biótico *Bacillus* sp. e abiótico acibenzolar-S-metil acompanhada desde o surgimento dos primeiros sintomas da doença após a inoculação com *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* - Psg

Tratamento ¹	Incidência ² dias após a inoculação						
	0	3*	10	17	24	31	38
T ₁	0 a ³	0 b	0 b	0 c	0 c	0 b	0 b
T ₂	0 a	5 a	5 a	4 a	4 ab	7 a	9 a
T ₃	0 a	4 ab	3 a	5 a	6 a	6 a	7 a
T ₄	0 a	0 b	0 b	0 c	0 c	0 b	0 b
T ₅	0 a	1 ab	2 ab	2 b	3 b	5 a	8 a
T ₆	0 a	0 b	0 b	0 c	0 c	0 b	0 b
C.V. (%)	0	146.20	83.83	40.83	41.21	42.06	35.68

¹Tratamento: T₁: Plantas sem incidência de bacteriose (testemunha); T₂: Plantas inoculadas com Psg; T₃: Plantas inoculadas com Psg e aplicação de agente biótico – *Bacillus* sp.; T₄: Plantas somente com aplicação do agente biótico; T₅: Plantas inoculadas com Psg e aplicação de agente abiótico - ASM; T₆: Plantas somente com aplicação do agente abiótico;

²Número de folíolos que apresentaram sintomas em relação ao número total de folíolos da planta;

³Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

*Surgimento dos primeiros sintomas três dias após a inoculação e avaliadas a cada sete dias.

Aos 17 e 24 dias após a inoculação com o patógeno o tratamento T₃, tratado com o agente biótico *Bacillus* sp., apresentou maior número de folíolos com sintomas quando comparado ao T₂ que

foi inoculado apenas com o patógeno, porém, sem apresentar diferenças estatísticas.

Na avaliação realizada 31 dias após a inoculação de Psg observou-se maior incidência da doença nos folíolos do tratamento T2, permanecendo superior na avaliação seguinte aos 38 dias, porém sem diferir estatisticamente dos demais tratamentos (T₃ e T₄).

Os resultados demonstraram que o agente biótico *Bacillus* sp. reduziu o inóculo inicial de Psg incidente sobre os folíolos das plantas de soja em relação ao tratamento controle somente nos primeiros 10 dias após a inoculação com o patógeno. Este fato pode ser explicado devido ao *Bacillus* sp. exercer inicialmente ação direta sobre o patógeno, através de antibiose e produção de compostos voláteis e assim promover ação bacteriostática, além de outros mecanismos envolvidos que podem estar atuando conjuntamente, como a indução de resistência.

Em trabalho realizado com arroz cultivado em casa de vegetação, Vidhyasekaram et al. (2001) observaram que o tratamento de sementes com o indutor *Pseudomonas fluorescens* reduziu a intensidade da doença causada por *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, sendo que o controle promovido pelo indutor superior ao tratamento com antibiótico estreptociclina.

Resultados semelhantes foram observados por Ongena et al. (2002), na indução de resistência por *Pseudomonas putida* e *P. aeruginosa* contra *Botrytis cinerea*, promovendo a redução dos sintomas da doença em 42 e 35%, respectivamente. A proteção contra os patógenos é manifestada pela redução dos sintomas da doença e pela inibição do crescimento dos mesmos (CORNÉ et al., 2005; TON

et al., 2002). Estes resultados corroboram os observados neste trabalho.

Os resultados observados com o agente abiótico ASM, demonstraram que este produto reduz a incidência do inóculo inicial do patógeno nas plantas de soja, inoculadas com Psg posteriormente a aplicação de ASM na concentração de 5 mg i.a. L⁻¹. A redução da incidência de Psg logo após a sua inoculação foi fundamental para que houvesse um progresso lento da doença e assim menor dano a cultura. Iriti & Faoro (2003) observaram que a aplicação de ASM, 2 ou 3 vezes em feijoeiro, antes da inoculação com *Uromyces appendiculatus*, apresentou 99,6 e 100% de redução das pústulas, respectivamente.

A ativação da resistência em cultivares suscetíveis, foi também observada por Dann & Deverall (2000) em ervilha tratada com ASM e demonstrada pela menor área foliar afetada por *U. viciae-fabae*: 1,5% comparado a 9,39% do controle.

O mecanismo de ação envolvido na redução da incidência, observado no presente trabalho, pode ser caracterizado como indução de resistência da planta, uma vez que, o agente abiótico ASM não exerce nenhum tipo de ação direta sobre a bactéria Psg, além de ser qualificado como uma molécula desencadeadora de mecanismos de defesa contra uma ampla diversidade de patógenos.

Silva et al. (2007) observaram a proteção de plantas de tomate contra *Ralstonia solanacearum*, utilizando o indutor ASM (0,05 g/L) e que este proporcionou as menores porcentagens de folhas murchas, características de plantas infectadas com a bactéria, além de apresentar redução da severidade da murcha bacteriana em 53,68%.

Nas avaliações da severidade do crestamento bacteriano em plantas de soja cultivadas em casa de vegetação observaram-se diferenças significativas entre os tratamentos (Tabela 16).

Tabela 16 - Severidade do crestamento bacteriano e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), em plantas de soja da cultivar BRS 246RR tratadas com agente biótico *Bacillus* sp. e abiótico acibenzolar-S-metil, dias após a inoculação com *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* – Psg

Tratamento ¹	Severidade (%) ² dias após a inoculação							AACPD
	0	3*	10	17	24	31	38	
T ₁	0 a ³	0 b	0 b	0 b	0 b	0 b	0 c	0 c
T ₂	0 a	1.1 a	2.2 a	5.5 a	6.7 a	7.8 a	38 a	624 a
T ₃	0 a	0.8 ab	2.2 a	3.2 ab	4.3 ab	4.7 ab	11 bc	272 b
T ₄	0 a	0 b	0 b	0 b	0 b	0 b	0 c	0 c
T ₅	0 a	0.2 b	0.7 ab	3.7 a	8.0 a	8.7 a	16 b	345 b
T ₆	0 a	0 b	0 b	0 b	0 b	0 b	0 c	0 c
C.V. (%)	0.0	144.05	121.98	88.67	92.37	76.32	71.64	20.13

¹Tratamento: T₁: Plantas sem incidência de bacteriose (testemunha); T₂: Plantas inoculadas com Psg; T₃: Plantas inoculadas com Psg e aplicação de agente biótico – *Bacillus* sp.; T₄: Plantas somente com aplicação do agente biótico; T₅: Plantas inoculadas com Psg e aplicação de agente abiótico - ASM; T₆: Plantas somente com aplicação do agente abiótico;

²Porcentagem da área foliar com sintomas;

³Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

*Surgimento dos primeiros sintomas três dias após a inoculação e avaliadas a cada sete dias.

No tratamento T₂ foi observada a maior severidade da doença logo nos primeiros dias após a inoculação com Psg, demonstrando que em cultivares suscetíveis, a quantidade de inóculo inicial do patógeno determina o progresso da doença ao longo do ciclo da cultura e conseqüentemente maiores danos em condições favoráveis ao desenvolvimento da doença.

A maior severidade da doença foi observada no tratamento T₂ aos 38 dias. Este fato pode ser explicado pelo progresso da doença ao longo do ciclo da cultura, uma vez que neste tratamento o inóculo inicial determinou o ritmo da doença e também porque neste período as plantas começaram a entrar em floração. Entende-se que com o início do florescimento a planta torna-se mais suscetível ao ataque de patógenos, pois concentra todos seus metabólitos para esse processo fisiológico.

O tratamento T₃ apresentou menor severidade que o tratamento controle (T₂) em todos os dias avaliados, indicando que as plantas estavam protegidas, e assim, logo no início do processo infeccioso do patógeno no tecido foliar houve a diminuição do inóculo inicial e a redução da severidade da doença, permanecendo do mesmo modo até o início do florescimento (último dia de avaliação da doença).

Wu et al. (2007) observaram que *Bacillus amiloliquefaciens* isolada do filoplano de plantas ornamentais de *Cosmos sulfurous* (yellow cosmos) e *Tagetes patula* (French marigold) hospedeiras de *Alternaria cosmosa* e *Alternaria patula*, mostraram-se eficientes antagonistas *in vitro*, em casa de vegetação e no campo, promovendo redução da severidade da doença, tanto no

tratamento de sementes como da parte aérea. Os autores também concluíram que *B. amiloliquefaciens* não produz antibióticos nem enzimas, sugerindo que o controle de *A. cosmosa* e *A. patula* ocorre através de outros mecanismos como competição ou indução de resistência sistêmica.

Piccinin et al. (2005) observaram que a aplicação semanal de *Saccharomyces cerevisiae* reduziu a velocidade de progresso da doença em plantas de sorgo inoculadas com *Colletotrichum sublineolum*. Os autores concluíram que o atraso na evolução da epidemia de antracnose possivelmente contribuiu para o aumento na produtividade das plantas de sorgo submetidas ao tratamento com a levedura ou fungicida, em comparação com a testemunha inoculada.

Resultados semelhantes foram observados por Wright & Beer (2005), com pulverizações nas flores de plantas de pêra, maçã e de espinheiro branco, com suspensões de *Pantoea agglomerans*, 24 h antes ou simultaneamente com suspensões de *Erwinia amylovora*, observando reduções na quantidade e no desenvolvimento de sintomas de ‘fogo bacteriano’. Diversas doenças fúngicas e bacterianas de várias culturas estão sendo controladas em caráter experimental pela bactéria *P. agglomerans*. Plantas de cevada foram protegidas contra *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* quando tratadas com *P. agglomerans*, bem como plantas de feijão, trigo e tomate protegidas contra diversos patógenos (YUEN et al., 2001; JOHANSSON et al., 2003).

No tratamento T₅ observou-se que as lesões causadas pelo patógeno no tecido foliar foram menores que nos demais tratamentos (T₂ e T₃), indicando que as plantas estavam com seus mecanismos de

defesa ativados pelo ASM e por isso a severidade da doença foi menor que nas plantas inoculadas apenas com Psg.

O tratamento das plantas com ASM promoveu um atraso da epidemia, observado aos 3, 10 e 17 dias após a inoculação com o patógeno. Este atraso no progresso da doença foi fundamental para o controle da doença e redução dos danos causados por esta bacteriose na cultura da soja.

A redução da severidade da doença causada por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* em plantas de tomate, foi observada por Soyly et al. (2003) no tratamento com ASM, reduzindo em 75% a severidade aos 7 dias após a inoculação e mantendo esse nível de controle até 14 dias após a inoculação. Resultados semelhantes foram observados no controle de *R. solanacearum* em tomateiro, ocorrendo redução significativa no progresso da doença (ARAÚJO et al., 2005).

Rodrigues et al. (2006), observaram que o tratamento com ASM apresentou menor índice de doença em caupi, cultivar BR-17 Gurguéia, suscetível a *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* e na cultivar IPA-206 com resistência intermediária. O uso de ASM, aos cinco dias após a germinação, proporcionou o controle da murcha de fusário nas duas cultivares testadas, sendo que a cultivar BR-17 Gurguéia, apresentou controle de 68,90%, enquanto que na cultivar IPA-206, o controle foi de 71,59%.

Os resultados da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) demonstraram que o tratamento T₂, onde as plantas foram inoculadas apenas com Psg, apresentou a maior quantidade de doença (624) ao longo do ciclo da cultura, quando comparado com os

demais tratamentos que também foram inoculados com o patógeno, mas tratados previamente com agentes biótico e abiótico (T₃ e T₅).

O tratamento T₃ apresentou a menor AACPD (272), indicando que o agente biótico *Bacillus* sp. exerceu controle de *P. savastanoi* pv. *glycinea* em plantas de soja cultivadas em casa de vegetação, através de mecanismos ainda não completamente elucidados.

Kehlenbeck & Schönbeck (1995) trabalhando com cevada em condições de campo, obtiveram sucesso na indução de resistência com um filtrado de *Bacillus subtilis* contra o patógeno *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* inoculado naturalmente. Os autores observaram redução de 40% da área foliar infectada nas plantas induzidas, enquanto que nas plantas tratadas com o fungicida propiconazole a redução chegou a 93%. No entanto, a maior produtividade foi observada com o uso do indutor, além da qualidade dos grãos em relação ao teor de amido ter sido melhorada.

Rocha et al. (2009) avaliaram o efeito da aplicação de *Bacillus* sp. e *Streptomyces* sp. em plantas de tomateiro quanto à incidência e severidade de doenças foliares. Os autores verificaram a redução da AACPD das doenças fúngicas causadas por *Alternaria solani*, *Phytophthora infestans*, *Septoria lycopersici* e *Oidium* sp. com a aplicação de *Streptomyces* sp. Os menores valores de severidade de *P. infestans* e ausência da incidência de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) em tomateiro foram observados nos tratamentos com *Bacillus* sp. e *Streptomyces* sp.

O tratamento T₅ apresentou AACPD de 345, inferior apenas ao T₂, mas não ao T₃. Este resultado indica que o agente

abiótico acibenzolar-S-metil apresentou controle do cretamento bacteriano da soja em casa de vegetação, e que o mecanismo envolvido neste controle é a indução de resistência, uma vez que este produto não exerce efeito direto sobre o patógeno e sim ativando mecanismos de defesa da planta contra patógenos.

Segundo Dallagnol et al. (2006) o ASM aumentou a eficácia de controle das doenças foliares na cultura da soja. No entanto, esta foi influenciada pela cultivar e pelo momento da aplicação, sendo que os melhores resultados foram obtidos nas pulverizações no estágio R3, quando ainda não havia sido constatado sintomas das doenças. Os autores ainda concluíram que o aumento na eficiência de controle deu-se, provavelmente, em função da ativação dos mecanismos de defesa da planta pelo ASM, reduzindo o progresso das doenças de final de ciclo.

Na comparação dos tratamentos inoculados com o patógeno na cultivar BRS 246RR, suscetível ao cretamento bacteriano da soja, o agente biótico *Bacillus* sp. exerceu controle de 56,41% da doença em relação ao tratamento controle (T₂) e o agente abiótico acibenzolar-S-metil exerceu controle de 44,71% da doença. Estes resultados indicaram que a aplicação tanto de *Bacillus* sp. quanto de ASM promove a redução do cretamento bacteriano da soja em casa de vegetação.

Kuhn (2007), utilizando ASM e *Bacillus cereus* como indutores de resistência em feijoeiro, obteve controle de 79,1 e 36,8%, respectivamente, do cretamento bacteriano causado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. Estes resultados estão de acordo com os encontrados no presente trabalho na aplicação de ASM e *Bacillus* sp.

em plantas de soja contra *P. savastanoi* pv. *glycinea*, agente etiológico do crestamento bacteriano.

Raimundi et al. (2009) trabalhando com plantas de tomateiro demonstraram que a aplicação de acibenzolar-S-metil (Bion® 0,05%) e óleo de nim (Bioneen® 0,5%) por pulverização foliar e de forma preventiva, 48 h antes da inoculação com o patógeno *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, apresentou maior eficiência no controle da mancha bacteriana do tomateiro. Os autores concluíram que estes produtos reduziram a severidade da doença, tanto como aplicação preventiva como curativa.

A proteção exercida por ASM em plantas de soja contra *P. savastanoi* pv. *glycinea*, parece envolver a indução dos mecanismos de defesa da planta. Apesar deste agente indutor não apresentar especificidade por patossistemas, não é possível generalizar seu espectro de ação contra todos os patógenos e tomá-lo como única medida de controle.

Conforme Soares e Maringoni (2002), em trabalho com murcha-de-curtobacterium em feijoeiro, observaram que tanto o tratamento de sementes quanto a aplicação foliar de ASM não promoveu a proteção da plantas contra *Curtobacterium flaccunfaciens* pv. *flaccunfaciens*. Benelli et al. (2004) observaram redução da incidência de canela preta em batata da cultivar Asterix quando os tubérculos foram tratados com ASM nas concentrações de 60 e 120 mg i.a. L⁻¹.

A aplicação dos agentes biótico e abiótico previamente a inoculação com o patógeno, pode ter contribuído para o sucesso do controle observado no presente trabalho, uma vez que, os agentes

apresentam-se como indutores de resistência utilizados em outros patossistemas com grande eficácia. Alguns trabalhos destacam que o uso de agentes indutores de resistência é mais eficaz contra doenças se aplicados na fase de florescimento ou anterior ao estabelecimento do patógeno (LIMA et al., 1997; WITTIG et al., 1997; IPPOLITO & NIGRO, 2000).

Segundo Pascholati & Leite (1994) a proteção induzida por agentes bióticos e abióticos, é dependente do intervalo de tempo que ocorre entre o tratamento com o indutor e a inoculação do patógeno. Desta forma, essa dependência indica que mudanças específicas no metabolismo vegetal, são importantes no fenômeno da resistência induzida.

O agente biótico *Bacillus* sp. faz uma proteção a planta contra o ataque do patógeno, pois este ao ser aplicado na forma de pulverizações, origina uma película na superfície do filoplano. Desta forma, com a chegada do patógeno no sítio de infecção, ocorre o contato com esta película, podendo interferir na multiplicação do fitopatógeno, retardando, inibindo ou bloqueando o início da infecção graças ao efeito bacteriostático ou bactericida exercido pelo agente biótico.

Embora exista uma ampla gama de agentes bióticos que exercem além do controle biológico a indução de resistência, com grande potencial de uso nas mais variadas culturas, a adoção efetiva desta tecnologia ainda requer melhor entendimento das interações entre planta, patógeno, ambiente e agente biótico.

Atualmente, ainda é insipiente o conhecimento sobre os mecanismos bioquímicos e genéticos da interação planta-agentes

biocontroladores e/ou bioativadores da indução de resistência, muito embora vários trabalhos tenham demonstrado o efeito positivo dessa relação no controle de doenças potencialmente destrutivas, utilizando micro-organismos ou mesmo metabólitos e moléculas químicas sintéticas. A continuidade dos estudos é fundamental para estabelecer os agentes bióticos e abióticos como uma alternativa de controle de doenças.

4 CONCLUSÕES

O agente biótico *Bacillus* sp. exerce controle de 56,41% do cretamento bacteriano da soja em cultivares suscetíveis, reduzindo a incidência e a severidade de *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* e diminuição da AACPD.

O agente abiótico acibenzolar-S-metil exerce controle de 44,71% do cretamento bacteriano da soja em cultivares suscetíveis, reduzindo a incidência e a severidade da doença, bem como a AACPD.

CAPITULO VI**ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS NA INTERAÇÃO SOJA-
PSEUDOMONAS SAVASTANOI PV. *GLYCINEA* INDUZIDAS
POR *BACILLUS* SP. E ACIBENZOLAR-S-METIL****CHEILA CRISTINA SBALCHEIRO¹, NORIMAR D'ÁVILA
DENARDIN² & FRANCISMAR CORRÊA MARCELINO³**

RESUMO - O desencadeamento rápido e eficiente de respostas de defesa é fundamental para a sobrevivência das plantas frente às adversidades, principalmente a patógenos. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade enzimática de peroxidases, fenilalanina amônia-liase, polifenoloxidasas e β -1,3-glucanases em plantas de soja inoculadas com *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* e tratadas com agente biótico *Bacillus* sp. e agente abiótico acibenzolar-S-metil. As avaliações da atividade enzimática foram realizadas momentos antes da aplicação com os agentes e em intervalos de 2, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 h e aos 14 e 21 dias após a aplicação dos agentes e após a inoculação com a bactéria *P. savastanoi* pv. *glycinea*. As análises demonstraram haver diferenças na atividade das enzimas testadas presentes no tecido foliar após a aplicação dos agentes e da inoculação com o patógeno.

¹ Bióloga, Mestre em Agronomia, Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Agronomia da FAMV/UPF, Área de Concentração em Fitopatologia.

² Orientadora, Bióloga, Dra. Professora da FAMV/UPF – norimar@upf.br

³ Co-orientadora, Bióloga, Dra. Pesquisadora da Embrapa Soja – francm@cnpso.embrapa.br

Palavras-chave: peroxidases, fenilalanina amônia-liase, polifenoloxidasas, β -1,3-glucanases.

**BIOCHEMICAL CHANGES IN THE INTERACTION
SOYBEAN-*PSEUDOMONAS SAVASTANOI* PV. *GLYCINEA*
INDUCED BY *BACILLUS* SP. AND ACIBENZOLAR-S-
METHYL**

ABSTRACT - The triggering rapid and efficient defense responses is essential for plant survival in the face of adversity, especially pathogens. This study aimed to evaluate the enzymatic activity of peroxidase, phenylalanine ammonia-lyase, polyphenoloxidase and β -1,3-glucanases in soybean plants inoculated with *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* and treated with biotic agent *Bacillus* sp. and abiotic agent acibenzolar-S-methyl. Evaluations of enzyme activity were performed just before the application with the agents and at intervals of 2, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 h at 14 and 21 days after application of the agents and after inoculation with the bacterium *P. savastanoi* pv. *glycinea*. Analysis showed no difference in the activity of tested enzymes present in the leaf tissue after application of the agents and the inoculation with the pathogen.

Key words: peroxidase, phenylalanine ammonia-lyase, polyphenoloxidase, β -1,3-glucanases.

1 INTRODUÇÃO

As plantas estão continuamente expostas a fatores adversos e, deste modo, desenvolveram mecanismos de defesas naturais que as protegem contra injúrias causadas por fatores bióticos e abióticos. A sobrevivência das plantas depende de uma combinação de mecanismos de respostas pré-existentes nas plantas e dos mecanismos que são induzidos a partir do estímulo externo.

A presença de um agente biótico ou abiótico indutor de resistência em plantas torna perceptíveis as alterações no metabolismo celular vegetal. Desta forma, comparando-se uma planta induzida com um indutor e posteriormente infectada por um patógeno, observa-se que as alterações no metabolismo são mais intensas do que na planta apenas infectada com o patógeno ou apenas induzida, demonstrando que a planta está mais capacitada para responder a presença do patógeno (CONRATH et al., 2002).

Segundo Yamamizo et al. (2006) a resistência ocorre quando respostas múltiplas de defesa são ativadas rapidamente e coordenadamente. Estas respostas podem ser induzidas por inúmeros micro-organismos antagônicos ou seus metabólitos e assim alterar os mecanismos bioquímicos de respostas de defesa do hospedeiro e gerar reflexos na expressão da resistência (BETTIOL & GHINI, 1995).

Pesquisas têm sido realizadas na tentativa de buscar produtos que ativem mecanismos de defesa da planta, propiciando mais uma alternativa de controle. Diversos trabalhos mostram o potencial de várias espécies de *Bacillus* na indução de resistência para controle de doenças. Conforme Kloepper et al. (2004) esses micro-

organismos atuam como indutores de resistência provocando alterações citoquímicas durante o ataque de patógenos.

Conforme Agrios (1997) o aumento na atividade de enzimas como peroxidases, polifenoloxidase e fenilalanina amônia-liase e glucanases resultam em altas concentrações de produtos que podem estar relacionados com níveis maiores de resistência a infecções.

Os agentes indutores não atuam diretamente sobre o patógeno ou produzem algum composto antimicrobiano, no entanto, sensibilizam a planta para ativar seus mecanismos de defesa em resposta à presença de um patógeno (CONRATH et al., 2002).

O presente trabalho objetivou detectar alterações na atividade enzimática de peroxidases, β -1,3-glucanases, fenilalanina amônia-liase e polifenoloxidases, em plantas de soja tratadas com o agente biótico *Bacillus* sp. e o agente abiótico acibenzolar-S-metil e inoculadas com *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Bacteriologia Vegetal e casa de vegetação da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo – FAMV/UPF, Passo Fundo-RS.

Para a instalação dos experimentos em casa de vegetação, expôs as plantas a condições artificiais de ambiente para favorecer o desenvolvimento do cretamento bacteriano da soja. As sementes foram semeadas em vasos com capacidade para 3,6 kg, preenchido

com solo, substrato e vermiculita (2:2:1). O solo utilizado pertence à classe Latossolo Vermelho distrófico típico, unidade de mapeamento Passo Fundo, com 65% de argila pertencente à Classe 1, corrigido o pH e fertilidade do mesmo de acordo com o Manual de adubação e de calagem (SOCIEDADE, 2004).

Para a realização deste experimento foram utilizadas duas cultivares de soja, BRS 243RR (resistente ao crestamento bacteriano) e a BRS 246RR (suscetível ao crestamento bacteriano) aplicando os agentes biótico e abiótico conforme Tabela 17.

Tabela 17 - Tratamentos aplicados em plantas de soja para verificação do controle de *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* (Psg) pelos agentes bióticos (*Bacillus* sp.) e abióticos (acibenzolar-S-metil) em casa de vegetação

Tratamentos	Inoculação com Psg	Aplicação foliar
T₁	Sem inoculação	Água
T₂	Com inoculação	Água
T₃	Com inoculação	<i>Bacillus</i> sp.
T₄	Sem inoculação	<i>Bacillus</i> sp.
T₅	Com inoculação	Acibenzolar-S-metil
T₆	Sem inoculação	Acibenzolar-S-metil

Cada tratamento foi representado por nove vasos com quatro plantas cada, sendo cada planta uma repetição biológica. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado.

2.1 Coleta do tecido foliar

O tecido foliar foi coletado a partir de plantas no estágio de completo desenvolvimento do segundo trifólio, observando as coletas conforme os intervalos pré-estabelecidos na Tabela 18. Em cada coleta foram retirados nove folíolos por tratamento, armazenados em sacos de papel e imediatamente imersos em nitrogênio líquido e posteriormente mantidos à -10 °C, até o momento da extração enzimática.

Tabela 18 – Períodos das coletas do material vegetal para as determinações enzimática após a aplicação dos agentes *Bacillus* sp. e acibenzolar-S-metil nas cultivares BRS 243RR e BRS 246RR

Coletas	Período das coletas
1 ^a	10 minutos antes da aplicação dos agentes
2 ^a	2 h após a aplicação
3 ^a	6 h após a aplicação
4 ^a	12 h após a aplicação
5 ^a	24 h após a aplicação
6 ^a	48 h após a aplicação
7 ^a	72 h após a aplicação
8 ^a	96 h após a aplicação
9 ^a	120 h após a aplicação
10 ^a	144 h após a aplicação
11 ^a	14 dias após a aplicação
12 ^a	21 dias após a aplicação

2.2 Aplicação do agente biótico

O agente biótico *Bacillus* sp. (isolado UPF 008), pertencente ao Laboratório de Bacteriologia da FAMV da Universidade de Passo Fundo, foi utilizado como biocontrole do crestamento bacteriano da soja. Este foi veiculado em uma formulação à base de polímero contendo 1,0 g de goma xantana, 1,5 g de polivinilpirrolidona (PVP) e 100 mL de água destilada e autoclavado a 121 °C por 15 minutos (DENARDIN & FREIRE, 2000).

Colônias puras de *Bacillus* sp., crescidas em meio de cultura 523 (KADO & HESKETT, 1970) por 24 h, foram ressuspensas em 3 mL de solução fisiológica e transferidas para erlenmeyer contendo 50 mL de meio de cultura líquido 523, mantido sob agitação orbital por 48 h à 28 ± 2 °C. Após 48 h, procedeu-se a quantificação de UFC na suspensão através do método de diluição sucessiva e semeadura de 200 µl em meio de cultura 523, obtendo-se $2,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹.

Da suspensão, transferiu-se 5 mL para um frasco contendo 20 mL da formulação preparada e esterilizada previamente, constituindo o agente biótico, que posteriormente foi diluído em 500 mL de água destilada esterilizada. A seguir, procedeu-se a determinação da concentração de células do agente biótico através da técnica de diluição sucessiva, seguida de semeadura de 200 µl em meio de cultura 523 e incubação por 48 h a 28 ± 2 °C, obtendo-se $1,6 \times 10^7$ UFC mL⁻¹ de *Bacillus* sp.

O agente biótico foi aplicado sobre as plantas, no estágio de segundo trifólio completamente desenvolvido, por aspersão até o

ponto de escorrimento poucos momentos após a primeira coleta do tecido vegetal.

2.3 Aplicação do agente abiótico

O agente abiótico foi preparado conforme recomendação do fabricante, numa concentração de 5 mg i.a. L⁻¹ de acibenzolar-S-metil (Bion®). A aplicação foi por aspersão até o ponto de escorrimento sobre as plantas quando essas estavam no estágio de segundo trifólio completamente expandido. A partir deste momento inicio-se a contagem de horas para a realização das coletas do tecido vegetal.

2.4 Inoculação da fitobactéria *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*

A bactéria *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*, isolado 1219, pertencente a coleção do Instituto Biológico de Campinas e mantida na coleção da Bacterioteca da FAMV/UPF, foi utilizada como inóculo para o desenvolvimento do crestamento bacteriano da soja em casa de vegetação. Colônias puras crescidas em meio de cultura 523 foram utilizadas para preparar uma suspensão em solução fisiológica (0,85%) e ajustada em espectrofotômetro (OD=540 nm) para uma absorbância de 0,5, equivalente a uma concentração aproximada de $2,8 \times 10^5$ UFC mL⁻¹ de Psg.

O inóculo foi pulverizado sobre as folhas das plantas de soja até o ponto de escorrimento. As plantas foram mantidas em casa de vegetação com alta umidade para favorecer o início da infecção e o desenvolvimento da doença. A inoculação das plantas foi realizada imediatamente após a 7ª coleta, ou seja, 72 h após a aplicação com os agentes indutores biótico e abiótico.

2.5 Preparo do extrato vegetal

Cada amostra contendo nove folíolos (3,0 g de tecido fresco) foi triturada em nitrogênio líquido, utilizando-se almofariz e pistilo, adicionando-se ao macerado solução de extração na proporção de 3 mL g⁻¹ de tecido de fresco. A solução de extração foi constituída de tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 6,5), polivinilpirrolidona (PVP) 1% (p/v) e fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) 1mM. O preparado foi centrifugado a 10.000 g por 30 minutos a 4 °C e o sobrenadante, coletado e armazenado a 4 °C para posterior utilização nos ensaios enzimáticos (BARACAT-PEREIRA et al., 2001).

2.6 Determinação da atividade de peroxidases

A atividade da peroxidase (POX, EC 1.11.1.7) foi determinada por método espectrofotométrico a 470 nm, em que o guaiacol participa como doador de hidrogênio (MARTINEZ et al., 1998) formando tetraguaiacol (CARUSO et al., 2001). A mistura da reação consistiu de 1019 µl de uma solução de substrato contendo 125

μl de guaiacol, 153 μl de peróxido de hidrogênio em 50 mL de tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 6,0 e 1 μl do extrato vegetal.

A mistura da reação foi incubada em banho-maria a 30 °C, realizando-se leituras de absorbância em comprimento de onda de 470 nm, aos 0,5 e 15,5 minutos após a adição do extrato. A atividade foi determinada pelo diferencial entre os tempo de leitura da absorbância. Os resultados foram expressos em unidades de POX.g⁻¹ tecido.min⁻¹, admitindo-se que uma unidade POX equivale ao incremento de absorbância de 0,001 min⁻¹.

2.7 Determinação da atividade de β -1,3-glucanases

A atividade da enzima β -1,3-glucanase (EC 3.2.1.6) nas amostras foi determinada espectrofotometricamente por teste colorimétrico que avalia a glicose liberada da laminarina (substrato), após o uso da hidrazida do ácido *p*-hidroxibenzóico (HAPHB).

A mistura da reação consistiu de 220 μl do tampão acetato de sódio 100 mM (pH 5,0), 250 μl da solução do substrato laminarina a 4 mg mL⁻¹ e 30 μl do extrato vegetal, incubando-se a 45 °C por uma hora. Após esse período, foram acrescentados 1,5 mL da solução de desenvolvimento de cor, composta por 0,5 g de hidrazida do ácido *p*-hidroxibenzóico dissolvidos em 10 mL de HCl 0,5 M e 50 mL de NaOH 0,5 M, sendo em seguida a mistura aquecida a 100 °C por 5 minutos.

Reações de cada amostra, acrescidas da solução de desenvolvimento de cor e aquecidas no momento da adição do extrato

foram utilizadas como controle. Após resfriamento, as absorvâncias das amostras foram determinadas em espectrofotômetro a 410 nm (HALFELD-VIEIRA, 2002).

A atividade da enzima foi determinada pela diferença entre os valores de absorvância para cada reação após uma hora de incubação e os valores de absorvância da reação controle. Os resultados foram expressos em unidades de β -1,3-glucanase.g⁻¹ tecido.min⁻¹, admitindo-se que uma unidade β -1,3-glucanase equivale ao incremento de absorvância de 0,001 min⁻¹.

2.8 Determinação da atividade de fenilalanina amônia-liase

A atividade da fenilalanina amônia-liase (PAL, EC 4.3.1.5) foi quantificada por medida espectrofotométrica a 290 nm, após conversão de L-fenilalanina para ácido *trans*-cinâmico, monitorada em intervalos definidos entre 0,5 e 3,5 minutos após o início da reação a 37 °C (adaptado de PASCHOLATI et al., 1986). A mistura de reação constituiu-se de 10 μ l do extrato vegetal e 1000 μ l de solução a 0,2% (p/v) de L-fenilalanina. O diferencial entre os valores de absorvância no intervalo de tempo foi calculado e os resultados foram expressos em unidades de PAL.g⁻¹ tecido.min⁻¹. Uma unidade de PAL equivale ao incremento de 0,001 min⁻¹ na absorvância.

2.9 Determinação da atividade de polifenoloxidasas

A atividade das polifenoloxidasas (PPO, EC 1.10.3.1) foi determinada pela oxidação do catecol para quinona, no ensaio preparado com 1 mL de pirocatequina a 20 mM em tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 6,8) e 34 µl do extrato vegetal, incubando-se a mistura a 30 °C. As leituras em espectrofotômetro a 420 nm foram realizadas em períodos de 0,5 e 10,5 minutos. O diferencial entre a última e a primeira leitura foi utilizado para determinação da atividade da polifenoloxidase. Uma unidade de atividade de PPO foi definida como o incremento de absorvância de $0,001 \text{ min}^{-1}$ (DUANGMAL & APENTEM, 1999). Os resultados foram expressos em unidades de $\text{PPO.g}^{-1} \text{ tecido.min}^{-1}$.

2.10 Representação e análise dos resultados

Os resultados das atividades para cada enzima foram expressos em relação ao peso fresco do tecido vegetal submetido à extração. A análise estatística dos ensaios foi realizada através do programa SAS (Statistical Analysis Systems Institute, Cary, NC), versão 8.0, utilizando o procedimento General Linear Model e Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Atividade de peroxidases - POX

A atividade de peroxidases apresentou diferenças significativas entre os tratamentos na cultivar BRS 243RR, resistente a bactéria *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* (Tabela 19). Os tratamentos T₃, T₄, T₅ e T₆ apresentaram variações estatisticamente significativas na atividade enzimática logo que foram aplicados na planta os agentes biótico e abiótico (2ª coleta), indicando que tanto o *Bacillus* sp. como o ASM interferem na atividade de peroxidases 2 h depois de entrarem em contato com o tecido vegetal.

A atividade desta enzima permaneceu alta nos tratamentos com agentes bióticos e abióticos praticamente até as últimas coletas do tecido vegetal aos 21 dias após a aplicação dos mesmos, diferindo do tratamento controle (T₁) e do tratamento somente inoculado com o patógeno (T₂).

Em estudos realizados por Labanca (2002) com frações elicitoras de *Saccharomyces cerevisiae* aplicadas em plantas de pepino, foi observado alterações na atividade de peroxidases após 48 h da inoculação, perdurando até 96 h após a inoculação do patógeno. Resultados semelhantes foram observados no presente trabalho, uma vez que o tratamento T₃ inoculado com o patógeno 72 h após a aplicação do agente biótico *Bacillus* sp. apresentou aumento da atividade enzimática de POX em comparação aos tratamentos controle T₂ e T₄.

Tabela 19 - Atividade de peroxidases (POX) em plantas de soja da cultivar BRS 243RR tratadas com os agentes biótico *Bacillus* sp. e abiótico acibenzolar-S-metil - ASM e inoculadas com *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* - Psg, coletadas em diferentes dias após o tratamento

Coleta ¹	Atividade de POX (unidade.g ⁻¹ tecido.min ⁻¹) por tratamento						C.V.(%)
	T ₁ ²	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆	
1 ^a	AB 335 a ³	D 340 a	G 336 a	G 341 a	E 333 a	F 336 a	1,23
2 ^a	A 340 c	D 335 c	F 445 b	F 448 b	D 538 a	E 538 a	1,00
3 ^a	A 338 c	D 337 c	E 488 b	E 490 b	C 585 a	D 592 a	1,22
4 ^a	A 344 c	D 343 c	CB 531 b	A 535 b	B 625 a	AB 626 a	0,67
5 ^a	A 343 c	D 345 c	CB 536 b	A 537 b	B 629 a	ABC 625 a	0,50
6 ^a	A 345 c	D 344 c	CB 535 b	A 537 b	B 633 a	A 634 a	0,60
7 ^a	A 341 c	D 346 c	CD 528 b	C 527 b	B 635 a	A 627 a	0,60
8 ^a	A 346 f	B 466 e	A 563 c	C 524 d	A 651 a	A 628 b	1,20
9 ^a	AB 334 f	A 491 e	B 545 c	C 526 d	B 632 a	BC 617 b	0,75
10 ^a	B 324 e	B 459 d	CD 523 c	D 515 c	B 631 a	BC 617 b	0,92
11 ^a	C 274 e	C 430 d	D 515 c	D 515 c	C 593 b	BC 617 a	0,72
12 ^a	D 221 e	C 440 d	D 514 c	D 515 c	C 583 b	C 615 a	0,90
C.V.(%)	1,26	1,29	0,98	0,56	0,73	0,59	

¹Coleta do tecido vegetal: 10 minutos antes da aplicação do agente (1^a), 2h (2^a), 6h (3^a), 12h (4^a), 24h (5^a), 48h (6^a), 72h (7^a), 96h (8^a), 120h (9^a), 144h (10^a), 14 dias (11^a) e 21 dias (12^a) após a aplicação dos agentes biótico e abiótico;

²Tratamentos: T₁: Ausência de bacteriose (testemunha); T₂: Inoculação com Psg; T₃: Aplicação de *Bacillus* sp. e inoculação de Psg; T₄: Somente aplicação de *Bacillus* sp.; T₅: Aplicação de ASM e inoculação de Psg; T₆: Somente aplicação de ASM;

³Médias precedidas de mesma letra maiúsculas na coluna e seguidas de mesma letra minúscula da linha não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

As plantas do tratamento T₂ apresentaram aumento na atividade enzimática 24 h após a inoculação com Psg, indicando que esta enzima faz parte do arsenal enzimático de defesa de plantas de soja contra a infecção da bactéria Psg, podendo ser esta uma das rotas

ativadas que levam à resistência da cultivar BRS 243RR frente a este patógeno.

As plantas tratadas somente com o agente abiótico ASM (T₆) apresentaram atividade de peroxidases superior aos demais tratamentos, e mesmo quando as plantas foram desafiadas com o patógeno Psg (T₅), a atividade permaneceu superior ao tratamento controle. Estes resultados demonstram que ASM promove o aumento da atividade da enzima peroxidase mesmo em cultivares resistentes a Psg, caracterizando este composto como indutor de resistência, que pode atuar contra um amplo espectro de patógenos, visto que não há uma cultivar de soja resistente a todos os patógenos incidentes na cultura.

KorteKamp & Zyprian (2003) observaram em videiras, resistentes ao fungo *Plasmopara viticola*, que a atividade das peroxidases aumentou 10-12 h após a inoculação. Os autores concluíram que variedades resistentes são caracterizadas por uma alta atividade basal de enzimas, comparado com variedades suscetíveis, além de um rápido aumento na atividade enzimática durante as primeiras 24 h após a inoculação. Plantas tratadas tanto com indutores bióticos como abióticos apresentaram a mesma gama de respostas (GÖRLACH et al., 1996; STICHER et al., 1997).

Na cultivar BRS 246RR houve diferenças significativas na atividade de peroxidases após o tratamento das plantas com os agentes biótico e abiótico (Tabela 20).

Tabela 20 - Atividade de peroxidases (POX) em plantas de soja da cultivar BRS 246RR tratadas com os agentes biótico *Bacillus* sp. e abiótico acibenzolar-S-metil - ASM e inoculadas com *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* - Psg, coletadas em diferentes dias após o tratamento

Coleta ¹	Atividade de POX (unidade.g ⁻¹ tecido.min ⁻¹) por tratamento						C.V.(%)
	T ₁ ²	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆	
1 ^a	BC 138 a ³	B 140 a	E 131 a	F 130 a	H 134 a	C 128 a	4,70
2 ^a	CD 132 c	B 137 c	B 272 b	CD 274 b	A 334 a	A 328 a	1,90
3 ^a	CD 131 c	B 131 c	AB 288 b	ABC 285 b	AB 332 a	A 324 a	1,22
4 ^a	CD 130 c	B 130 c	B 276 b	D 267 b	CB 323 a	A 322 a	1,86
5 ^a	CD 132 c	B 130 c	AB 289 b	AB 290 b	C 320 a	A 321 a	1,70
6 ^a	BC 138 c	B 134 c	AB 284 b	AB 290 b	ABC 326 a	A 329 a	1,80
7 ^a	AB 152 c	A 155 c	AB 294 b	AB 289 b	ABC 328 a	A 328 a	1,70
8 ^a	A 159 d	CD 56 f	E 135 e	A 294 b	EF 247 c	A 328 a	2,31
9 ^a	A 160 d	E 41 e	C 187 c	BCD 278 b	D 263 b	A 332 a	3,26
10 ^a	CD 125 e	DE 47 f	C 188 d	ABC 281 b	E 253 c	A 322 a	2,34
11 ^a	CD 126 e	C 66 f	D 161 d	CD 272 b	FG 239 c	B 303 a	2,05
12 ^a	D 117 e	C 65 f	E 131 d	E 247 b	G 235 c	B 305 a	1,23
C.V.(%)	4,26	4,10	2,78	1,70	1,29	1,49	

¹Coleta do tecido vegetal: 10 minutos antes da aplicação do agente (1^a), 2h (2^a), 6h (3^a), 12h (4^a), 24h (5^a), 48h (6^a), 72h (7^a), 96h (8^a), 120h (9^a), 144h (10^a), 14 dias (11^a) e 21 dias (12^a) após a aplicação dos agentes biótico e abiótico;

²Tratamentos: T₁: Ausência de bacteriose (testemunha); T₂: Inoculação com Psg; T₃: Aplicação de *Bacillus* sp. e inoculação de Psg; T₄: Somente aplicação de *Bacillus* sp.; T₅: Aplicação de ASM e inoculação de Psg; T₆: Somente aplicação de ASM;

³Médias precedidas de mesma letra maiúsculas na coluna e seguidas de mesma letra minúscula da linha não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

O aumento da atividade foi verificado nos tratamentos T₃, T₄, T₅ e T₆ desde a 2^a coleta até a 7^a coleta. A partir desde momento os tratamentos T₃ e T₅ apresentaram reduções, coincidindo com aplicação da bactéria Psg 24 h antes da avaliação. Esta redução na

atividade de peroxidases também foi observada em T₂, após a inoculação com Psg. Possivelmente esta redução deve estar relacionada com o processo infeccioso causado pelo patógeno nos tecidos vegetais suscetíveis.

Em estudos realizados por Nandakumar et al. (2001) foi sugerido que a atividade hidrolítica exercida pela penetração ativa de bactérias endofíticas no hospedeiro, como *Bacillus* sp. e *Pseudomonas fluorescens*, pode atuar direta ou indiretamente sobre o desenvolvimento da doença. Estes mesmos autores verificaram a ativação de duas quitinases e cinco peroxidases pelos isolados bacterianos, que induziram resistência em arroz ao patógeno *Rhizoctonia solani*, sugerindo que estas enzimas atuam na indução de resistência sistêmica.

Na maioria dos casos o aumento na atividade das peroxidases está diretamente relacionado à redução da severidade da doença (KUHN, 2007). Assim, o aumento da atividade de peroxidases em cultivares suscetíveis a Psg, como o observado nos tratamentos T₃ com *Bacillus* sp. e no T₅ com ASM, poderia ser uma alternativa de controle da doença, principalmente pela verificação da redução da severidade do crestamento bacteriano no presente trabalho.

Aumento significativo na atividade de peroxidases foi observado por Silva et al. (2004) em tomateiro induzido por *Bacillus cereus*, além do aumento na resistência contra diversos patógenos como *Alternaria solani*, *Corynespora cassiicola*, *Oidium lycopersici*, *Stemphium solani* e *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*.

Bonaldo (2005), em trabalho realizado com aplicação de ASM em plântulas de pepino, observou que este agente abiótico

promoveu o acúmulo de peroxidases e um aumento maior desta enzima após a inoculação do patógeno *Colletotrichum lagenarium*. O autor afirma ainda que as plântulas de pepino apresentaram alterações maiores na atividade de peroxidases, 3 dias após o tratamento com ASM e o incremento na atividade foi evidenciado após a inoculação do patógeno que correspondeu à 6 dias após o tratamento com o indutor, concluindo que este incremento na atividade da enzima após a inoculação com o patógeno seja devido ao processo infeccioso desencadeado pelo fitopatógeno.

Estes resultados reforçam os obtidos neste trabalho nas análises da atividade de peroxidases em plantas de soja da cultivar BRS 243RR resistente à fitobactéria, no entanto, discordam do observado nas análises da atividade desta enzima nas plantas da cultivar BRS 246RR, suscetível à Psg.

Silva et al. (2007) observaram que as plantas de tomateiro tratadas com ASM e inoculadas com *Ralstonia solanacearum* tiveram um aumento na atividade enzimática de peroxidases no 7º dia após o tratamento, ocorrendo aumento significativo da atividade da POX nas plantas tratadas com ASM e não inoculadas com a bactéria no 3º, 7º e 12º dias após o tratamento em relação ao tratamento com água.

Resultados semelhantes foram observados por Baysal et al. (2003) em plantas de tomateiro tratadas com ASM e inoculadas com *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, observando a maior atividade de peroxidases aos 5 dias após a inoculação com a bactéria e evidenciando a participação desta enzima nos mecanismos de resistência induzida em plantas.

Iriti & Faoro (2003) observaram aumento da atividade de peroxidases em feijoeiro induzidas por ASM contra *Uromyces appendiculatus*. O mesmo resultado foi observado por Buzi et al. (2004) trabalhando com plantas de melão induzidas por ASM e metil jasmonato contra *Didymela bryoniae* e *Sclerotinia sclerotiorum*.

3.2 Atividade de β -1,3-glucanases

A atividade enzimática de β -1,3-glucanases em plantas de soja da cultivar BRS 243RR apresentaram diferenças significativas quando tratadas com os agentes biótico e abiótico e inoculadas com Psg (Tabela 21). Os tratamentos T₃ e T₄ apresentaram aumento da atividade desta enzima 2 h após a aplicação com *Bacillus* sp. No entanto, os tratamentos T₅ e T₆ somente apresentaram alterações na atividade de β -1,3-glucanases 6 h após a aplicação de ASM nas plantas. Não houve muitas diferenças em relação aos tratamentos T₁ e T₂ até a 4^a coleta.

No tratamento T₂ observou-se que 24 h após a inoculação com Psg a atividade da β -1,3-glucanases diminuiu, aumentando logo em seguida (9^a coleta) e permanecendo superior aos demais tratamentos até a 11^a coleta. Este resultado é esperado uma vez que a cultivar BRS 243RR é resistente a Psg. Assim, a redução inicial na atividade enzimática deve-se, possivelmente, a tentativa de infecção do patógeno no tecido vegetal, não obtendo sucesso devido à ativação de rotas metabólicas envolvidas na defesa em plantas resistentes, da qual a enzima β -1,3-glucanases faz parte.

Tabela 21 - Atividade de β -1,3-glucanases em plantas de soja da cultivar BRS 243RR tratadas com os agentes biótico *Bacillus* sp. e abiótico acibenzolar-S-metil - ASM e inoculadas com *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* - Psg, coletadas em diferentes dias após o tratamento

Coleta ¹	Atividade de β -1,3-glucanase (unidade.g ⁻¹ tecido.min ⁻¹) por tratamento						C.V.(%)
	T ₁ ²	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆	
1 ^a	B 570 ab ³	C 572 ab	F 583 a	F 565 b	E 570 ab	E 568 b	0,90
2 ^a	A 583 b	C 575 bc	B 621 a	A 613 a	E 571 c	E 568 c	0,74
3 ^a	D 523 b	D 525 b	D 600 a	B 603 a	BC 595 a	A 595 a	0,52
4 ^a	C 536 b	D 533 b	E 590 a	C 593 a	BC 595 a	AB 593 a	0,38
5 ^a	E 503 c	E 502 c	F 583 ab	DE 582 b	CD 587 a	BCD 583 b	0,27
6 ^a	F 478 d	G 471 d	DE 595 ab	BC 596 a	D 581 c	AB 587 bc	0,56
7 ^a	F 477 e	F 485 d	E 592 ab	C 594 a	D 504 c	ABC 585 bc	0,51
8 ^a	F 475 e	I 360 f	A 644 a	DE 581 c	A 604 b	DE 572 d	0,33
9 ^a	F 473 f	F 482 e	C 608 a	D 583 c	AB 600 b	DE 573 d	0,37
10 ^a	F 470 d	B 603 a	C 609 a	EF 573 c	D 583 b	CDE 576 bc	0,52
11 ^a	G 437 e	A 613 a	F 581 b	G 526 d	DE 578 b	F 545 c	0,50
12 ^a	G 430 d	H 419 e	G 555 a	H 506 c	F 556 a	F 543 b	0,40
C.V.(%)	0,58	0,62	0,31	0,53	0,51	0,65	

¹Coleta do tecido vegetal: 10 minutos antes da aplicação do agente (1^a), 2h (2^a), 6h (3^a), 12h (4^a), 24h (5^a), 48h (6^a), 72h (7^a), 96h (8^a), 120h (9^a), 144h (10^a), 14 dias (11^a) e 21 dias (12^a) após a aplicação dos agentes biótico e abiótico;

²Tratamentos: T₁: Ausência de bacteriose (testemunha); T₂: Inoculação com Psg; T₃: Aplicação de *Bacillus* sp. e inoculação de Psg; T₄: Somente aplicação de *Bacillus* sp.; T₅: Aplicação de ASM e inoculação de Psg; T₆: Somente aplicação de ASM;

³Médias precedidas de mesma letra maiúsculas na coluna e seguidas de mesma letra minúscula da linha não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Nos tratamentos com os agentes *Bacillus* sp. e ASM, constatou-se um aumento da atividade enzimática após a inoculação com Psg. Desta forma, as plantas que já estavam com esta rota metabólica ativada, ao entrar em contato com o patógeno,

apresentaram aumento da atividade de β -1,3-glucanases, possivelmente, devido à sinalização celular que ocorreu no momento da interação da planta com o patógeno mesmo que esta interação seja incompatível e não ocorra a doença.

Dann & Deverall (2000) observaram a ativação da resistência sistêmica em ervilha a *Uromyces viciae-fabae*, quando as plantas foram tratadas com altas dosagens de ASM e isolados avirulentos de *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*, associadas ao aumento da atividade de β -1,3-glucanases e peroxidases.

A atividade enzimática de β -1,3-glucanases em plantas de soja da cultivar BRS 246RR, apresentou diferenças entre os tratamentos testados (Tabela 22). A maior diferença observada foi em relação ao T₂, em que as plantas foram inoculadas com Psg após a 7^a coleta. Ocorreu uma expressiva diminuição da atividade enzimática 24 h após a inoculação de Psg, tanto no tratamento T₂ como nos tratamentos T₃ e T₅. No entanto, no T₂ a atividade permaneceu menor nos dias subsequentes, apresentando a menor atividade observada na última análise (12^a coleta).

Ao final das análises observou-se que os tratamentos T₃, T₄ e T₅ não diferiram entre si, demonstrando que a aplicação de *Bacillus* sp. tanto em plantas inoculadas com Psg como não inoculadas, apresentam a mesma ativação enzimática de β -1,3-glucanases que plantas tratadas com ASM e inoculadas com o patógeno. Estes resultados permitiram inferir que os agentes biótico e abiótico induziram respostas de defesa nas plantas suscetíveis contra *P. savastanoi* pv. *glycinea* através de mecanismos muito semelhantes, como a rota de ativação de β -1,3-glucanases.

Tabela 22 - Atividade de β -1,3-glucanases em plantas de soja da cultivar BRS 246RR tratadas com os agentes bióticos *Bacillus* sp. e abiótico acibenzolar-S-metil - ASM e inoculadas com *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* - Psg, coletadas em diferentes dias após o tratamento

Coleta ¹	Atividade de β -1,3-glucanase (unidade.g ⁻¹ tecido.min ⁻¹) por tratamento						C.V.(%)
	T ₁ ²	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆	
1 ^a	B 564 a ³	A 570 a	D 566 a	F 573 a	E 570 a	K 563 a	0,70
2 ^a	B 567 e	B 559 f	A 697 a	A 685 b	B 669 c	D 660 d	0,25
3 ^a	C 556 b	BC 556 b	A 694 a	A 689 a	A 692 a	A 695 a	0,42
4 ^a	D 547 d	BC 554 c	B 687 ab	AB 682 b	A 689 a	B 687 ab	0,32
5 ^a	B 569 c	A 574 c	B 683 a	AB 683 a	B 673 b	C 678 ab	0,40
6 ^a	A 579 c	A 577 c	C 676 a	B 673 a	C 653 b	DE 657 b	0,44
7 ^a	D 548 c	C 548 c	C 672 a	B 674 a	C 654 b	E 653 b	0,38
8 ^a	E 505 d	F 234 f	I 426 e	C 655 a	G 521 c	F 644 b	0,52
9 ^a	F 486 c	D 293 d	H 483 c	D 637 a	D 590 b	G 633 a	0,43
10 ^a	G 437 d	E 281 e	G 534 c	E 596 b	D 593 b	H 613 a	0,45
11 ^a	H 424 e	G 211 f	F 541 d	G 551 c	E 565 b	I 601 a	0,57
12 ^a	I 409 c	H 167 d	E 547 b	G 547 b	F 545 b	J 582 a	0,43
C.V.(%)	0,44	0,71	0,25	0,56	0,38	0,33	

¹Coleta do tecido vegetal: 10 minutos antes da aplicação do agente (1^a), 2h (2^a), 6h (3^a), 12h (4^a), 24h (5^a), 48h (6^a), 72h (7^a), 96h (8^a), 120h (9^a), 144h (10^a), 14 dias (11^a) e 21 dias (12^a) após a aplicação dos agentes biótico e abiótico;

²Tratamentos: T₁: Ausência de bacteriose (testemunha); T₂: Inoculação com Psg; T₃: Aplicação de *Bacillus* sp. e inoculação de Psg; T₄: Somente aplicação de *Bacillus* sp.; T₅: Aplicação de ASM e inoculação de Psg; T₆: Somente aplicação de ASM;

³Médias precedidas de mesma letra maiúsculas na coluna e seguidas de mesma letra minúscula da linha não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Resultados semelhantes foram obtidos por Bokshi et al. (2003). Estes autores observaram aumento na atividade de β -1,3-glucanases em batata induzida à resistência por ASM contra o fungo *Fusarium semitectum*. No presente trabalho, a atividade de β -1,3-

glucanases foi ativada logo após a aplicação dos agentes *Bacillus* sp. e ASM, permanecendo alta nas análises seguintes, indicando que as plantas estavam com uma rota metabólica dos mecanismos envolvidos com respostas de defesa ativada, e que esta fez diferença no momento da interação com o patógeno.

Segundo Van Loon et al. (1994) as enzimas β -1,3-glucanases são capazes de desencadear os mecanismos de defesa da planta e agir diretamente sobre o patógeno. Devido à ação do ácido salicílico nas células das plantas, ocorre a produção de proteínas específicas relacionadas com a patogênese como as β -1,3-glucanases e quitinases, que são capazes de degradar a parede celular de fungos e bactérias patogênicas, desta forma agindo direto sobre o patógeno (COLE, 1999).

Tuzun et al. (1989) observaram uma correlação positiva entre indução de resistência a *Phytophthora parasitica* em fumo e ativação de β -1,3-glucanase, sugerindo que as plantas induzidas ficam sensibilizadas e respondem mais rapidamente que as plantas controle. Além disso os autores confirmam que a enzima β -1,3-glucanase é um componente da resposta de defesa de plantas por restringir o desenvolvimento do patógeno no tecido foliar.

Kuhn (2007) observou que a atividade da peroxidase apresentava uma tendência a aumentar em função do número de aplicações com o indutor ASM e em menor intensidade com o indutor *Bacillus cereus* em plantas de feijoeiro. No entanto, o indutor biótico não proporcionou aumento significativo de β -1,3-glucanases, mas o indutor abiótico apresentou aumento da atividade desta enzima após a primeira aplicação.

3.3 Atividade de fenilalanina amônia-liase - PAL

A atividade da enzima fenilalanina amônia-liase apresentou diferenças significativas entre os tratamentos na cultivar BRS 243RR (Tabela 23). Os tratamentos T₃ e T₄ que receberam a aplicação de *Bacillus* sp. apresentaram aumento na atividade de PAL 2 h após aplicação do agente, com aumento gradual da atividade até as 72 h, com posterior decréscimo até a última análise no T₄. No tratamento T₃, após a inoculação da Psg observou-se um expressivo aumento da atividade da PAL em 24 h e decréscimo nas análises seguintes, equivalendo ao T₄.

Nos tratamentos T₅ e T₆, também foi observado aumento da atividade da PAL as 2 h após a aplicação do agente abiótico ASM, no entanto, menor que nos tratamentos com o agente biótico *Bacillus* sp. A atividade nas horas seguintes também foram menores que no tratamento com *Bacillus* sp. até o final das análises para o T₆. Contudo, para o tratamento T₅ a inoculação com o patógeno nas plantas desencadeou um aumento expressivo da atividade de PAL, permanecendo alta até a última análise.

No tratamento T₂ após a inoculação com o patógeno observou-se um expressivo aumento da atividade enzimática passando de 177 para 466 unidade de PAL.g⁻¹ tecido.min⁻¹, diminuindo gradualmente até a última análise. Este aumento na atividade de PAL pode estar relacionado à interação entre patógeno e planta que ocorreu no momento da inoculação. Assim, a cultivar resistente a Psg pode estar utilizando a rota de sinalização via PAL para ativar seus

mecanismos de resistência e tornar a interação incompatível, com ausência de doença.

Tabela 23 - Atividade de fenilalanina amônia-liase (PAL) em plantas de soja da cultivar BRS 243RR tratadas com os agentes bióticos *Bacillus* sp. e abiótico acibenzolar-S-metil - ASM e inoculadas com *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* - Psg, coletadas em diferentes dias após o tratamento

Coleta ¹	Atividade de PAL (unidade.g ⁻¹ tecido.min ⁻¹) por tratamento						C.V.(%)
	T ₁ ²	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆	
1 ^a	BCD 178 a ³	DE 169 a	H 167 a	F 173 a	I 176 a	H 174 a	3,58
2 ^a	CD 170 c	EF 159 d	G 262 a	E 259 a	GH 239 b	EF 242 b	1,92
3 ^a	D 169 c	EF 164 c	FG 270 b	E 266 b	CD 292 a	A 296 a	2,16
4 ^a	F 129 c	G 130 c	D 359 a	B 365 a	EF 268 b	CB 271 b	1,91
5 ^a	E 154 c	F 155 c	CD 369 a	B 375 a	DE 275 b	AB 283 b	1,68
6 ^a	CD 172 c	D 176 c	BC 382 a	A 388 a	GF 256 b	DE 255 b	1,56
7 ^a	BCD 174 c	D 177 c	BC 384 a	A 393 a	H 227 b	FG 230 b	1,85
8 ^a	BC 183 e	A 466 a	A 465 a	B 370 c	A 422 b	FG 227 d	2,19
9 ^a	B 187 e	B 385 b	B 394 b	C 322 c	A 427 a	CD 266 d	1,70
10 ^a	A 207 e	C 271 d	BC 383 a	C 326 c	B 343 b	CD 265 d	1,66
11 ^a	A 206 c	C 269 b	E 317 a	C 315 a	B 329 a	G 216 c	1,91
12 ^a	A 206 d	C 275 c	F 289 b	D 293 b	C 307 a	H 178 e	1,42
C.V.(%)	2,71	1,71	2,08	1,23	1,94	2,14	

¹Coleta do tecido vegetal: 10 minutos antes da aplicação do agente (1^a), 2h (2^a), 6h (3^a), 12h (4^a), 24h (5^a), 48h (6^a), 72h (7^a), 96h (8^a), 120h (9^a), 144h (10^a), 14 dias (11^a) e 21 dias (12^a) após a aplicação dos agentes biótico e abiótico;

²Tratamentos: T₁: Ausência de bacteriose (testemunha); T₂: Inoculação com Psg; T₃: Aplicação de *Bacillus* sp. e inoculação de Psg; T₄: Somente aplicação de *Bacillus* sp.; T₅: Aplicação de ASM e inoculação de Psg; T₆: Somente aplicação de ASM;

³Médias precedidas de mesma letra maiúsculas na coluna e seguidas de mesma letra minúscula da linha não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

A atividade enzimática da fenilalanina amônia-liase em plantas da cultivar BRS 246RR apresentaram diferenças entre os tratamentos e as diferentes coletas do tecido foliar (Tabela 24). Observou-se que todos os tratamentos induziram alterações na atividade enzimática 2 h após a aplicação com os agentes bióticos (T₃ e T₄), abiótico (T₅ e T₆) e os com aplicação de água (T₁ e T₂) que simularam as mesmas condições para todos os tratamentos. No entanto, só foram significativas as alterações promovidas pelos agentes.

Nos tratamentos com *Bacillus* sp. observou-se aumento da atividade enzimática de PAL principalmente 6 h após a aplicação, permanecendo até 72 h no tratamento T₃ e até o final das análises aos 21 dias no tratamento T₄. Com a inoculação do patógeno 72 h após a aplicação do agente biótico observou-se um aumento expressivo da atividade enzimática de PAL nos tecidos vegetais do T₃ as 24 e 48 h após a inoculação, diminuindo gradativamente com o passar dos dias.

O aumento da PAL foi relacionado com a redução na severidade da mancha bacteriana em arroz, através da indução de resistência por *Pseudomonas fluorescens* (VIDHYASEKARAM et al., 2001). O mesmo não foi observado por Silva et al. (2004), que não detectaram alterações na atividade de PAL no tratamento de sementes com *Bacillus cereus* em tomateiro, no entanto, ressaltaram elevada atividade de peroxidases.

Nos tratamentos aplicados com o agente abiótico ASM observou-se que a atividade da PAL aumentou logo após a aplicação do produto, sofrendo pequenos aumentos graduais até as 12 h após a aplicação. A partir deste momento, no tratamento T₆, a atividade foi

gradualmente declinando até a última análise. No tratamento T₅ após a inoculação com Psg a atividade reduziu expressivamente até 24 h, aumentando nas análises seguintes.

Tabela 24 - Atividade de fenilalanina amônia-liase (PAL) em plantas de soja da cultivar BRS 246RR tratadas com os agentes biótico *Bacillus* sp. e abiótico acibenzolar-S-metil - ASM e inoculadas com *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* - Psg, coletadas em diferentes dias após o tratamento

Coleta ¹	Atividade de PAL (unidade.g ⁻¹ tecido.min ⁻¹) por tratamento						C.V.(%)
	T ₁ ²	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆	
1 ^a	D 93 a ³	H 83 a	I 94 a	G 84 a	H 90 a	H 90 a	6,09
2 ^a	D 102 c	G 102 c	H 137 a	F 137 a	G 115 b	G 114 b	2,95
3 ^a	C 124 c	F 125 c	DE 377 a	A 386 a	D 252 b	B 263 b	2,92
4 ^a	C 124 c	F 128 c	DEF 375 a	AB 381 a	B 308 b	A 316 b	1,92
5 ^a	B 145 d	E 142 d	EF 363 b	ABC 377 a	B 303 c	A 304 c	1,63
6 ^a	B 154 d	D 159 d	EF 367 b	A 385 a	E 231 c	C 231 c	1,88
7 ^a	B 152 c	DE 148 c	F 358 a	BCD 370 a	F 209 b	D 212 b	3,07
8 ^a	B 147 e	A 278 c	A 559 a	CD 365 b	G 111 f	D 213 d	1,79
9 ^a	A 173 e	B 228 c	B 540 a	D 358 b	F 197 d	C 240 c	1,99
10 ^a	C 118 f	B 234 d	C 473 a	E 321 b	C 272 c	E 190 e	1,70
11 ^a	C 124 e	C 206 c	D 388 a	E 326 b	B 312 b	F 152 d	2,48
12 ^a	C 121 d	F 126 d	G 331 b	E 330 b	A 353 a	F 168 c	2,12
C.V.(%)	4,01	2,70	1,64	1,47	2,87	2,82	

¹Coleta do tecido vegetal: 10 minutos antes da aplicação do agente (1^a), 2h (2^a), 6h (3^a), 12h (4^a), 24h (5^a), 48h (6^a), 72h (7^a), 96h (8^a), 120h (9^a), 144h (10^a), 14 dias (11^a) e 21 dias (12^a) após a aplicação dos agentes biótico e abiótico;

²Tratamentos: T₁: Ausência de bacteriose (testemunha); T₂: Inoculação com Psg; T₃: Aplicação de *Bacillus* sp. e inoculação de Psg; T₄: Somente aplicação de *Bacillus* sp.; T₅: Aplicação de ASM e inoculação de Psg; T₆: Somente aplicação de ASM;

³Médias precedidas de mesma letra maiúsculas na coluna e seguidas de mesma letra minúscula da linha não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Latunde-Dada & Lucas (2001) observaram que plântulas de caupi induzidas com ASM não apresentaram atividade de enzimas e fitoalexinas envolvidas com as respostas de defesa, mas que após a inoculação com *Colletotrichum destructivum*, houve aumento da atividade da PAL 18 h após o desafio e aumento de chalcona isomerase após 25 h, além do aumento na concentração de fitoalexinas em relação às plantas não tratadas e inoculadas.

Este trabalho concorda parcialmente com os resultados obtidos no presente experimento, uma vez que as plantas inoculadas com Psg apresentaram aumento da atividade enzimática de PAL, tanto nas plantas inoculadas apenas com o patógeno, quanto nas plantas tratadas com *Bacillus* sp. e ASM. No entanto, a atividade foi superior nas plantas tratadas com os agentes.

Silva et al. (2007) observaram que as plantas de tomateiro tratadas com ASM e inoculadas com *Ralstonia solanacearum* apresentaram menor atividade de PAL e PPO do que as plantas tratadas com água e inoculadas com o patógeno. Entretanto, a atividade destas enzimas ao 3º, 7º e 12º dias após o tratamento foi maior nas plantas tratadas apenas com o indutor e não inoculadas.

A atividade enzimática de PAL na primeira análise para as duas cultivares apresentaram diferenças entre BRS 243RR (resistente) e BRS 246RR (suscetível). Este fato pode estar ligado a genes incorporados nas cultivares através dos cruzamentos no melhoramento genético, que permitem que a cultivar resistente apresente uma maior atividade de PAL do que a cultivar suscetível.

Campos et al. (2003), trabalhando com quatro cultivares de feijoeiro induzidas por AS e *Colletotrichum lindemuthianum*

avirulento, observaram o aumento na atividade de PAL, no entanto, a intensidade da atividade variou em função do cultivar.

3.4 Atividade de polifenoloxidase - PPO

A atividade de polifenoloxidase na cultivar BRS 243RR apresentou algumas diferenças entre os tratamentos com agentes bióticos e abióticos e com a inoculação da Psg (Tabela 25). Os tratamentos T₃ e T₄ apresentaram aumento da atividade de PPO após a aplicação com *Bacillus* sp., permanecendo constante até a última análise da enzima. O tratamento T₃ sofreu pequena variação na atividade enzimática após a inoculação com o patógeno.

Nos tratamentos T₅ e T₆ a atividade da PPO sofreu alterações 6 h após a aplicação com ASM, sendo crescente até 48 h e decrescente após este período para o T₅. No entanto, para T₆ a atividade enzimática oscilou até as últimas análises.

O tratamento T₂ apresentou muitas oscilações na atividade de PPO, e mesmo depois da inoculação do patógeno nas plantas, não apresentaram diferenças do tratamento controle T₁. Este fato pode estar relacionado com a interação incompatível do patógeno com a cultivar resistente e assim não estaria desencadeando a sinalização para a atividade desta enzima, uma vez que não ocorreu infecção e conseqüentemente a doença.

Tabela 25 - Atividade de polifenoloxidase (PPO) em plantas de soja da cultivar BRS 243RR tratadas com os agentes biótico *Bacillus* sp. e abiótico acibenzolar-S-metil - ASM e inoculadas com *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* - Psg, coletadas em diferentes dias após o tratamento

Coleta ¹	Atividade de PPO (unidade.g ⁻¹ tecido.min ⁻¹) por tratamento						C.V.(%)
	T ₁ ²	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆	
1 ^a	CD 62 a ³	D 63 a	G 63 a	F 60 a	H 59 a	G 58 a	6,57
2 ^a	EF 46 c	DE 52 bc	A 179 a	A 181 a	H 60 bc	G 62 b	5,89
3 ^a	EF 44 c	E 46 c	A 186 a	A 193 a	EF 115 b	F 116 b	3,52
4 ^a	A 86 c	ABC 85 c	B 167 a	B 165 a	C 141 b	DE 135 b	3,56
5 ^a	A 82 c	BC 81 c	DE 149 b	BC 160 b	A 195 a	A 187 a	3,69
6 ^a	F 37 c	E 43 c	CD 155 ab	BCD 154 b	B 167 ab	B 168 a	4,03
7 ^a	AB 78 b	C 78 b	DE 146 a	DE 144 a	B 155 a	C 151 a	3,16
8 ^a	BCD 66 e	A 95 d	A 183 a	E 139 b	D 127 c	EF 126 c	3,50
9 ^a	ABC 72 e	AB 92 d	BC 166 a	CDE 149 b	DE 126 c	CD 143 b	2,93
10 ^a	BCD 66 e	AB 93 d	EF 143 b	B 164 a	F 111 c	CDE 138 b	2,45
11 ^a	F 38 e	E 39 e	F 134 b	B 163 a	FG 104 d	F 118 c	3,72
12 ^a	DE 55 d	D 60 d	DE 153 a	BCD 156 a	G 95 c	F 116 b	5,20
C.V.(%)	8,16	6,57	2,43	3,05	3,42	3,63	

¹Coleta do tecido vegetal: 10 minutos antes da aplicação do agente (1^a), 2h (2^a), 6h (3^a), 12h (4^a), 24h (5^a), 48h (6^a), 72h (7^a), 96h (8^a), 120h (9^a), 144h (10^a), 14 dias (11^a) e 21 dias (12^a) após a aplicação dos agentes biótico e abiótico;

²Tratamentos: T₁: Ausência de bacteriose (testemunha); T₂: Inoculação com Psg; T₃: Aplicação de *Bacillus* sp. e inoculação de Psg; T₄: Somente aplicação de *Bacillus* sp.; T₅: Aplicação de ASM e inoculação de Psg; T₆: Somente aplicação de ASM;

³Médias precedidas de mesma letra maiúsculas na coluna e seguidas de mesma letra minúscula da linha não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

A atividade de PPO na cultivar BRS 246RR apresentou algumas diferenças quanto aos tratamentos e as diferentes coletas realizadas (Tabela 26). Nos tratamentos T₃ e T₄ houveram alterações na atividade enzimática de PPO após a aplicação do agente biótico

Bacillus sp., principalmente após 12 h, onde observou-se maior atividade enzimática (4^a coleta).

Tabela 26 - Atividade de polifenoloxidase (PPO) em plantas de soja da cultivar BRS 246RR tratadas com os agentes biótico *Bacillus* sp. e abiótico acibenzolar-S-metil - ASM e inoculadas com *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* - Psg, coletadas em diferentes dias após o tratamento

Coleta ¹	Atividade de PPO (unidade.g ⁻¹ tecido.min ⁻¹) por tratamento						C.V.(%)
	T ₁ ²	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆	
1 ^a	D 31 a ³	D 35 a	G 34 a	F 36 a	E 34 a	E 36 a	8,45
2 ^a	D 30 c	D 33 c	F 92 b	E 87 b	D 116 a	BCD 116 a	4,68
3 ^a	BC 47 c	C 46 c	D 132 ab	C 130 b	C 144 a	A 143 a	4,12
4 ^a	BC 43 c	C 43 c	A 193 a	A 193 a	D 117 b	BCD 114 b	2,21
5 ^a	B 49 c	C 48 c	D 133 a	BC 134 a	D 118 b	B 120 b	2,65
6 ^a	B 50 b	C 45 b	E 118 a	D 116 a	D 119 a	BC 117 a	3,02
7 ^a	BCD 40 c	C 42 c	E 114 a	D 117 a	D 106 b	D 104 b	2,37
8 ^a	CD 37 d	C 43 d	C 156 b	D 114 c	B 170 a	BCD 108 c	3,12
9 ^a	A 64 c	AB 59 c	A 183 a	D 116 b	B 172 a	BCD 115 b	3,40
10 ^a	A 68 c	B 55 c	B 171 a	C 129 b	AB 183 a	BC 118 b	6,49
11 ^a	A 68 e	A 65 e	BC 161 b	C 132 c	A 193 a	BC 118 d	3,02
12 ^a	A 73 e	A 66 e	C 159 b	B 142 c	B 173 a	CD 106 d	4,16
C.V.(%)	7,89	5,10	2,82	2,87	4,03	3,88	

¹Coleta do tecido vegetal: 10 minutos antes da aplicação do agente (1^a), 2h (2^a), 6h (3^a), 12h (4^a), 24h (5^a), 48h (6^a), 72h (7^a), 96h (8^a), 120h (9^a), 144h (10^a), 14 dias (11^a) e 21 dias (12^a) após a aplicação dos agentes biótico e abiótico;

²Tratamentos: T₁: Ausência de bacteriose (testemunha); T₂: Inoculação com Psg; T₃: Aplicação de *Bacillus* sp. e inoculação de Psg; T₄: Somente aplicação de *Bacillus* sp.; T₅: Aplicação de ASM e inoculação de Psg; T₆: Somente aplicação de ASM;

³Médias precedidas de mesma letra maiúsculas na coluna e seguidas de mesma letra minúscula da linha não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

No tratamento T₃, após a inoculação do patógeno observou-se aumento da atividade de PPO em comparação as plantas somente tratadas com *Bacillus* sp. e com as plantas somente inoculadas com o patógeno. No tratamento T₅, também foi observado aumento da atividade enzimática após a inoculação com o patógeno, resultado não observado no tratamento das plantas somente com ASM. No entanto, todas as plantas dos tratamentos com os agentes biótico e abiótico apresentaram maior atividade de PPO do que o tratamento controle T₁ e o T₂ somente inoculado com o patógeno.

O tratamento T₂ não sofreu muitas alterações na atividade de PPO quando as plantas foram inoculadas com Psg, indicando que esta rota metabólica envolvida com as respostas de defesa nas plantas não é muito utilizada pelas plantas suscetíveis como resposta ao ataque de patógeno. Assim, permitem a interação compatível e o desenvolvimento da doença nos tecidos vegetais.

Na resistência induzida por ASM em tomateiro contra *Xanthomonas vesicatoria* foi evidenciado aumento na atividade de POX e PPO, logo nas primeiras horas após a pulverização do produto, ocorrendo maior atividade no 5º dia após a inoculação do patógeno. Neste mesmo trabalho não foi observada alteração na atividade de PAL (CAVALCANTI et al., 2006).

No patossistema sorgo-*Colletotrichum graminicola* tratado com ASM foram evidenciadas reduções na atividade das enzimas β -1,3-glucanase e quitinase, mesmo sabendo-se que estas enzimas participam ativamente nas respostas de defesa (OSSWALD et al., 2004). Resultados semelhantes forma observados por Silva et al. (2007) trabalhando com tomateiro tratado com ASM e inoculado com

Ralstonia solanacearum, observando a redução na atividade de PAL, PPO e quitinase.

O aumento da atividade de PPO, PAL e POX foram evidenciados por Ramamoorthy (2002), em plantas de tomate e pimenta induzidas à resistência por isolados de *Pseudomonas fluorescens*, além de promover a redução de até 50% do tombamento causado por *Pythium aphanidermatum*.

A indução de resistência com ASM no tratamento pós-colheita de frutos de pêssego promoveu aumento na atividade de PPO e redução de 50% na severidade da doença causada por *Penicillium expansum* (LIU et al., 2005). Entretanto, estes autores observaram aumento pouco expressivo na atividade da PAL. A atividade de PAL também não foi alterada em função dos indutores ASM e *B. cereus* em feijoeiro quando testados em várias aplicações ao longo do ciclo da cultura (KUHN, 2007). Este autor não observou alterações significativas na atividade de PPO, quando comparado os indutores e o número de aplicações.

Segundo Vitti (2009), o ASM quando aplicado previamente, ativa os mecanismos de defesa naturais da planta mantendo-a em alerta. Assim, quando em condições de estresse, a planta reage rapidamente, através da produção de compostos de defesa, com velocidade e em quantidades suficientes para tornar a resposta da planta eficiente na redução dos danos, ocasionados por tal evento.

Segundo Heil & Bostock (2002), plantas induzidas e posteriormente submetidas à inoculação do patógeno, apresentam alterações dos eventos bioquímicos, promovem o acionamento de

outros mecanismos, diferente do observado em plantas não induzidas e inoculadas com o patógeno, que apresentam menor alteração desses eventos. Resultados semelhantes foram observados no presente trabalho em plantas de soja tratadas com agentes biótico e abiótico e inoculadas com Psg.

Os resultados demonstram, ao comparar com a literatura, que a atividade de enzimas envolvidas com os mecanismos de defesa de plantas contra patógenos é dependente da interação indutor-planta-patógeno.

As alterações enzimáticas observadas no presente trabalho reforçam a hipótese que a resistência induzida é um processo multicomponente, onde cada componente deve estar no local, quantidade e tempo precisos, para elevar os níveis enzimáticos na magnitude de proteção induzida como relatado por Schneider & Ullrich (1994).

4 CONCLUSÕES

A aplicação do agente biótico *Bacillus* sp. promove alterações na atividade de peroxidases, β -1,3-glucanases, fenilalanina amônia-liase e polifenoloxidasas em cultivares de soja resistente e suscetível a *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*.

A aplicação do agente abiótico acibenzolar-S-metil promove alterações na atividade de peroxidases, β -1,3-glucanases, fenilalanina amônia-liase e polifenoloxidasas em cultivares de soja resistente e suscetível a *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*.

A inoculação de *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* promove alterações na atividade enzimática de plantas de soja resistentes e suscetíveis.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O crescimento do agente biótico *Bacillus* sp., não foi inibido completamente por nenhum dos ingredientes ativos testados e em nenhuma concentração testada. Entretanto, estes somente apresentaram ação bacteriostática, mas não bactericida. Estes resultados são fundamentais como estratégia de controle de doenças, em combinação com controle químico e controle biológico.

O agente biótico *Bacillus* sp. possui substâncias capazes de agir como moléculas indutoras de respostas de resistência em plantas de soja, mostrando assim, potencial para o uso no controle alternativo de patógenos de plantas. Ao mesmo tempo promoveu alterações na atividade de enzimas relacionadas com os mecanismos de resistência em cultivares de soja, indicando atuar como indutor de resistência contra *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*, evidenciado pelo controle da doença em casa de vegetação.

A ausência de efeito *in vitro* do agente abiótico acibenzolar-S-metil (ASM) sobre a bactéria *P. savastanoi* pv. *glycinea*, a alteração na atividade de enzimas envolvidas nos mecanismos de defesa e a menor ocorrência de sintomas do crescimento bacteriano, sugere que este agente atua sobre as plantas de soja através da indução de resistência.

O agente abiótico acibenzolar-S-metil caracterizou-se como indutor de resistência em soja contra *P. savastanoi* pv. *glycinea*, promovendo alterações na atividade de enzimas envolvidas com os mecanismos de resistência de plantas a patógenos e o controle do crescimento bacteriano em casa de vegetação.

Os estudos devem continuar no sentido de caracterizar as moléculas produzidas por *Bacillus* sp., a fim de proporcionar subsídios para elucidar a interação indutor-planta-patógeno, bem como vislumbrar a obtenção de uma molécula que possa vir a ser utilizada com fins comerciais no controle de doenças de plantas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, V.K.; SINCLAIR, J.B. *Principles of seed Pathology*. vol. 2. Boca Raton: CRC Press, 1987.

AGOSTINI, V. A. *Biocontrole de Xanthomonas axonopodis pv. phaseoli var. fuscans através da microbiolização de sementes de feijoeiro (Phaseolus vulgaris L.)*. 2004. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitopatologia) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2004.

AGRIOS, G.N. *Plant Pathology*. 4 ed. San Diego: Academic Press, 1997.

ALFENAS, A. C. *Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins - fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1998.

ALMEIDA, A. M. R. et al. Doenças da soja. In: KIMATI, H. et al. (Eds.). *Manual de fitopatologia*, vol. 2. Doenças das plantas cultivadas. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. p. 569-588.

AMORIM, E. P. R.; MELO, I. S. Associação de antagonistas no controle de *Phytophthora parasitica* e *Phytophthora citrophthora* em plântulas de citros. *Summa Phytopathologica*, Botucatu, v. 35, p. 335-338, 1999.

ANTEROLA, A. M.; LEWIS, N. G. Trends in lignin modification: a comprehensive analysis of the effects of genetic manipulations/mutations on lignifications and vascular integrity. *Phytochemistry*, Elmsford, v. 61, p. 221-294, 2002.

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

ARAÚJO, J. S. P. et al. Efeito do acibenzolar-S-metil sobre a murcha-bacteriana do tomateiro. *Horticultura Brasileira*, v. 23, p. 5-8, 2005.

ARSENJEVIC, M. et al. Antagonic effect of some saprophytic bacteria to *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* and *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. *Molecular Approaches in Biological Control* Delemont Switzerland, v. 21, n. 9, p. 297-300, 1998.

BARACAT-PEREIRA, M. C. et al. Biochemical properties of soybean leaf lipoxygenases: presence of soluble and membrane-bound forms. *Plant Physiology and Biochemistry*, Paris, v. 39, n. 2, p. 91-98, 2001.

BARBOSA, H. R.; TORRES, B. B. Nutrição e metabolismo bacterianos. In: TRABULSI, L.R. et al. (Eds). *Microbiologia*. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 1999. p. 25-54.

BARBOSA, H. R.; TORRES, B. B. Nutrição. In: BARBOSA, H. R.; TORRES, B. B. (Eds). *Microbiologia básica*. São Paulo: Atheneu, 1998. p. 89-101.

BATISTA JUNIOR, C. B. et al. Efeito fungistático de *Bacillus thuringiensis* e de outras bactérias sobre alguns fungos fitopatogênicos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 37, n. 8, p. 1189-1194, 2002.

BAYSAL, Ö; SOYLU, E. M.; SOYLU, S. Induction of defence-related enzymes and resistance by the plant activator acibenzolar-S-methyl in tomato seedlings against bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* pv. *michiganensis*. *Plant Pathology*, London, v. 52, n. 6, p. 747-753, 2003.

BENELLI, A. I. H.; DENARDIN, N. D.; FORCELINI, C. A. Ação do acibenzolar-S-metil aplicado em tubérculos e plantas de batata contra canela preta, incitadas por *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum* atípica. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 29, p. 263-267, 2004.

BETTIOL, W. *Controle biológico de doenças de plantas*. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, 1991.

BETTIOL, W.; KIMATI, H. Efeito de *Bacillus subtilis* sobre *Pyricularia oryzae* agente causal de brusone do arroz. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 25, n. 8, p. 1165-1174, 1990.

BETTIOL, W.; GHINI, R. Controle Biológico. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Eds.). *Manual de fitopatologia*. Princípios e conceitos. v.1. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. p. 717-728.

BOKSHI, A.I.; MORRIS, S.C.; DEVERALL, B.J. Effects of benzothiadiazole and acetylsalicylic acid on β -1,3-glucanase activity and disease resistance in potato. *Plant Pathology*, London, v. 52, n. 1, p. 22-27, 2003.

BONALDO, S. M. *Efeito de Saccharomyces cerevisiae na síntese de fitoalexinas em sorgo, na germinação e formação de apressórios por fungos fitopatogênicos e na proteção de pepino a Colletotrichum lagenarium e sorgo a Colletotrichum sublineolum*. 2005. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

BUZI, A. et al. Induction of resistance in melón to *Didymella bryoniae* and *Sclerotinia sclerotiorum* by seed treatments with acibenzolar-S-methyl and methyl jasmonate but not with salicylic acid. *Journal of Phytopathology*, Berlin, v. 152, p. 34-42, 2004.

CAMPOS, A. D. et al. Induction of chalcone synthase and phenylalanine ammonia-lyase by salicylic acid and *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, Londrina, v. 15, n. 3, p. 129-134, 2003.

CAMPOS, A. D. et al. Atividade de peroxidases e polifenoloxidasas na resistência do feijão à antracnose. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 39, n. 7, p. 637-643, 2004.

CANTERI, M. G. et al. SASM - Agri: Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott - Knott, Tukey e Duncan. *Revista Brasileira de Agrocomputação*, v. 1, n.2, p. 18-24, 2001.

CARDOSO FILHO, J. A. *Efeito de extratos de albedo de laranja (Citrus sinensis) dos indutores de resistência ácido salicílico, acibenzolar-S-metil e Saccharomyces cerevisiae no controle de Phyllosticta citricarpa (Teleomorfo: Guignardia citricarpa)*. 2003. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

CARUSO, C. et al. A basic peroxidase from wheat kernel with antifungal activity. *Phytochemistry*, Elmsford, v. 58, n. 5, p. 743-750, 2001.

CAVALCANTI, F. R. et al. Acibenzolar-S-metil e Ecolife® na indução de respostas de defesa em tomateiro contra a mancha bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*). *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 31, p. 372-380, 2006.

CHUN, W.; VIDAVER, A. K. Gram-positive bacteria: *Bacillus*. IN: SCHAAD, N. W.; JONES, J. B.; CHUN, W (Eds). *Plant pathogenic bacteria*. 3 ed. USA: APS Press. 2001. p. 250-260.

COLE, D. L. The efficacy of acibenzolar-S-methyl, an inducer of systemic acquired resistance, against bacterial and fungal disease of tobacco. *Crop Protection*, Guildford, v. 18, p. 267-273, 1999.

COLSON, E.; DEVERALL, B. Helping plants fight their own disease battles. *Australian Cottongrower*, v. 17, n. 17, p. 76-80, 1996.

CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). *Central de informações agropecuárias*. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conabweb/index.php?PAG=101>>. Acesso em: 2 dez. 2006.

CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). *Levantamento de grãos*. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conabweb/>>. Acesso em: 20 dez. 2007.

CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). *Levantamento de grãos*. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conab>>. Acesso em: 15 dez. 2009.

CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). *Levantamento de grãos*. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conab>>. Acesso em: 26 jun. 2010.

CONRATH, U.; PIETERSE, C. M. J.; MAUCH-MANI, B. Priming in plant-pathogen interactions. *Trends in Plant Science*, Kidlington, v. 7, p. 210-21, 2002.

CORNÉ, M. J. et al. Indução de resistência sistêmica por rizobactérias e comunicação para uma defesa refinada. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, Passo Fundo, v. 13, p. 277-295, 2005.

COVENTRY, H. S.; DUBERY, I. A. Lipopolysaccharides from *Burkholderia cepacia* contribute to an enhanced defensive capacity and the induction of pathogenesis-related proteins in *Nicotiana tabacum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, London, v. 58, p. 149-158, 2001.

DALLAGNOL, L. J. et al. Utilização de acibenzolar-S-methyl para controle de doenças foliares da soja. *Summa Phytopathologica*, Botucatu, v. 32, n. 3, p. 255-259, 2006.

DANN, E. K.; DEVERALL, B. J. Activation of systemic disease resistance in pea by an avirulent bacterium or benzothiadiazole, but not by a fungal leaf spot pathogen. *Plant Pathology*, London, v. 49, p. 324-332. 2000.

DENARDIN, N. D.; FREIRE, J. R. J. Assessment of polymers for the formulation of legume inoculants. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 16, n. 3, p. 215-217, 2000.

DUANGMAL, K.; APENTEN, R. K. O. A comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. Romano). *Food Chemistry*, London, v. 64, n.3, p. 351-359, 1999.

DUFFY, B. Combination of pencycuron and *Pseudomonas fluorescens* strain 2-79 for integrated control of rhizoctonia root rot and take-all of spring wheat. *Crop Protection*, Guildford, v. 19, n. 1, p. 21-25, 2000.

DUNLEAVY, J. M.; WEBER, C. R.; CHAMBERLAIN, D. W. A source of bacterial blight resistance for soybean. *Iowa Academy Sciences Proceedings*, v. 67, p. 120-125, 1960.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. EMBRAPA SOJA. Disponível em: <<http://www.cnpso.embrapa.br/2005>>. Acesso em: 7 jul. 2007.

FERREIRA, L. P. Bacterial Diseases. In: *Tropical Soybean: Improvement and Production*. Roma: FAO, 1994. p. 61-63.

FODOR, J.; JOZSA, A.; KIRALY, Z. Systemic acquired disease resistance in plants. *Novenyvedelem*, v. 34, p. 117-126, 1998.

FRIEDRICH, L. et al. A benzothiadiazole derivative induces systemic acquired resistance in tobacco. *The Plant Journal*, Oxford, v. 10, p. 61-70, 1996.

GAFFNEY, T. D. et al. Global regulation of expression of antifungal factors by a *Pseudomonas fluorescens* biological control strain. *Molecular Plant Microbe-Interactions*, v. 7, n. 4, p. 455-463, 1994.

GERHARDSON, B. Biological substitutes for pesticides. *Trends in Biotechnology*, v. 20, n. 8, p. 338-343, 2002.

GÖRLACH, J. et al. Benzothiadiazole, a novel class of inducers systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *The Plant Cell*, v. 8, p. 629-643, 1996.

GUZZO, S. D. et al. Ação protetora do acibenzolar-S-methyl em plantas de cafeeiro contra ferrugem. *Arquivos do Instituto Biológico*, Campinas, v. 68, n. 1, p. 89-94, 2001.

GUZZO, S. D.; MARTINS, E. M. F. Local and systemic induction of β -1,3-glucanase and chitinase in coffee leaves protected against *Hemileia vastatrix* by *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Phytopathology*, Berlin, v. 144, n. 9/10, p. 449-454, 1996.

HAHN, M. G. Microbial elicitors and their receptors in plants. *Phytopathology*, St. Paul, v. 34, p. 387- 412, 1996.

HALFELD-VIEIRA, B. A. *Bactérias residentes do filoplano de tomateiro como agentes de controle biológico de enfermidades da parte aérea da cultura*. 2002. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2002.

HALVERSON, L. J.; HANDELSMAN, J. Enhancement of soybean nodulation by *Bacillus cereus* UW85 in the field and in a growth chamber. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 57, p. 2767-2770, 1991.

HAMMERSCHMIDT, R.; KUC, J. *Induced resistance to disease in plants*. Dordrecht: Kluwer Academic, 1995.

HAMMERSCHMIDT, R. Induced disease resistance: How do induced plants stop pathogens? *Physiological and Molecular Plant Pathology*, London, v. 55, p. 77-84, 1999.

HAMMERSCHMIDT, R.; MÉTRAUX, J. -P.; VAN LOON, L. C. Inducing resistance: a summary of paper presented at the First International Symposium on Induced Resistance to Plant Disease, Corfu, May 2000. *European Journal of Plant Pathology*, Dordrecht, v. 107, n. 1, p. 1-6, 2001.

HAMMOND-KOSACK, K. E.; PARKER, J. E. Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Current Opinion in Biotechnology*, n. 14, p. 177-193, 2003.

HANDLSMAN, J.; STABB, E. V. Biocontrol of soilborne plant pathogens. *The Plant Cell*, v. 8, n. 10, p. 1855-1869, 1996.

HARTMAN, G.L. et al. *Compendium of soybean diseases*. The American Phytopathological Society: APS Press, 1999.

HE, C. Y.; HSIANG, T.; WOLYN, D. J. Induction of systemic disease resistance and pathogen defence responses in *Asparagus officinalis* inoculated with nonpathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. *Plant Pathology*, London, v. 51, n. 2, p. 225-230, 2002.

HEIL, M.; BOSTOCK, R. M. Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defenses. *Annals of Botany*, Oxford, v. 89, p. 503-512, 2002.

HENNING, A. A. et al. *Manual de identificação de doenças da soja*. Londrina: Embrapa soja, 2005.

IPPOLITO, A.; NIGRO, F. Impact of preharvest application of biological control agents on postharvest diseases of fresh fruits and vegetables. *Crop Protection*, Guildford, v. 19, p. 715-723, 2000.

IRITI, M.; FAORO, F. Benzothiadiazole (BTH) induces cell-death independent resistance in *Phaseolus vulgaris* against *Uromyces appendiculatus*. *Journal of Phytopathology*, Berlin, v. 151, n. 3, p. 171-180, 2003.

JOCK, S. et al. Characterization of *Bacillus* strains from apple and pear trees in South Africa antagonistic to *Erwinia amylovora*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 211, n. 2, p. 247-252, 2002.

JOHANSSON, P. M.; JOHANSSON, L.; GERHARDSON, B. Suppression of wheat-seedling diseases caused by *Fusarium culmorum* and *Microdochium nivale* using bacterial seed treatment. *Plant Pathology*, London, v. 52, p. 219-227, 2003.

KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas*. *Phytopathology*, St. Paul, v. 60, n. 6, p. 969-976. 1970.

KEEL, C. et al. Pseudomonads as antagonists of plant pathogens in the rhizosphere: role of antibiotic 2,4-diacetylphloroglucinol in the suppression of black root rot of tobacco. *Symbiosis*, v. 9, p. 327-342, 1990.

KEHLENBECK, H.; SCHÖNBECK, F. Effects of induced resistance on disease severity/yield relations in mildewed barley. *Journal of Phytopathology*, Berlin, v. 143, p. 561-567, 1995.

KEMPF, H. J.; BAUER, P. H.; SCHROTH, M. N. Herbicolin A associated with crown and roots of wheat seed treatment with *Erwinia*

herbicola B247. *Phytopathology*, St. Paul, v. 83, n. 2, p. 213-216, 1993.

KESSMAN, H. et al. Induction of systemic acquired disease resistance in plant by chemicals. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v. 32, p. 439-459, 1994.

KIMATI, H. Controle químico. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Eds.). *Manual de fitopatologia. Princípios e conceitos*. v.1. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. p. 761-785.

KLOPPER, J. W. et al. Nature and application of biocontrol microbes: *Bacillus* spp. *American Phytopathological Society*, v. 94, n. 11, p. 1259-1266, 2004.

KONDOH, M.; HIRAI, M.; SHODA, M. Intergated biological and chemical control of damping-off caused by *Rhizoctonia solani* using *Bacillus subtilis* RB14-C and flutolanil. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 91, n. 2, p. 173-177, 2001.

KORSTEN, L. et al. Field sprays of *Bacillus subtilis* and fungicides for control of preharvest fruit disease of avocado in South Africa. *Plant Disease*, St Paul, v. 81, n. 5, p. 455-459, 1997.

KORTEKAMP, A.; ZYPRIAN, E. Characterization of *Plasmopara*-resistance in grapevine using *in vitro* plants. *Journal of Plant Physiology*, Stuttgart, v. 160, p. 1393-1400, 2003.

KREBS, B. et al. *Bacillus subtilis*: an effective biocontrol agent. *Pesticide Science*, Barking, v. 37, p. 427-429, 1993.

KUĆ, J. Concepts and direction of induced systemic resistance in plants and its application. *European Journal of Plant Pathology*, Dordrecht, v. 107, p. 9-12, 2001.

KUHN, O. J. *Indução de resistência em feijoeiro (Phaseolus vulgaris) por acibenzolar-S-metil e Bacillus cereus: aspectos fisiológicos bioquímicos e parâmetros de crescimento e produção*. 2007. Tese

(Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

KUNZ, H.; SCHURTER, R.; MAETZKE, T. The chemistry of benzothiadiazole plant activators. *Pesticide Science*, Barking, v. 50, p. 275-282, 1997.

LABANCA, E. R. G. *Purificação parcial de elicitores presentes em Saccharomyces cerevisiae: atividade com indutores de resistência em pepino (Cucumis sativus) contra Colletotrichum lagenarium e da síntese de gliceolinas em soja (Glycine max)*. 2002. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

LAGUNAS, L. J. et al. *Bacillus firmus* as a biological control agent of *Phytophthora capsici* Leo. on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Revista Mexicana de Fitopatologia*, v. 19, p. 57-65, 2001.

LATUNDE-DADA, A. O.; LUCAS, J. A. The plant defense activator acibenzolar-S-methyl primes cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] seedlings for rapid induction of resistance. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, London, v. 58, p. 199-208, 2001.

LAWTON, K. et al. Benzothiadiazole induces disease resistance in *Arabidopsis* by activation of the systemic acquired resistance signal transduction pathway. *Plant Journal*, Oxford, v. 10, p. 71-82, 1996.

LI, L.; STEFFENS, J. C. Overexpression of polyphenol oxidase un transgenic tomato plants results in enhanced bacterial disease resistance. *Planta*, Berlin, v. 215, p. 239-247, 2002.

LIMA, G. et al. Effectiveness of *Aureobasidium pullulans* and *Candida oleophila* against postharvest rots. *Postharvest Biology and Technology*, Amsterdam, v. 10, p. 169-178, 1997.

LIU, H. et al. Postharvest BTH treatment induces resistance of peach (*Prunus persica* L. cv. Jiubao) fruit to infection by *Penicillium expansum* and enhances activity of fruit defense mechanisms. *Postharvest Biology and Technology*, Amsterdam, v. 35, p. 263-269, 2005.

LOUWS, F. J.; WILSON, M.; CAMPBELL H. L. Field control of bacterial spot and bacterial speck of tomato using a plant activator. *Plant Disease*, St Paul, v. 85, n. 5, p. 481-488, 2001.

LUZ, W. C. Efeito da microbiolização de sementes no rendimento e controle da podridão comum nas raízes e de patógenos das sementes de trigo. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 19, p. 144-148, 1994.

LUZ, W. C. Interação entre tratamento biológico e químico de sementes de milho. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 23., Uberlândia. *Anais...* 2000.

LYON, G. D.; REGLISKI, T.; NEWTON, A. C. Novel disease compounds: the potential to 'immunize' plants against infection. *Plant Pathology*, London, v. 44, p. 407-427, 1995.

MABROUK, Y. et al. Some compatible *Rhizobium leguminosrum* strains in peas decrease infections when parasitized by *Orobanche crenata*. *Weed Res.*, v. 47, p. 44-53, 2007.

MARCHI, C. E.; BORGES, M. D. E. F.; RESENDE, M. L. V. Proteção induzida por benzotriazolone contra a ferrugem-alaranjada (*Hemileia vastatrix*) em cafeeiro. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 26, n. 5, p. 1103-1106, 2002.

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

MARIANO, R. L. R.; KLOEPPER, J. W. Métodos alternativos de biocontrole: resistência sistêmica induzida por rizobactérias. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, Passo Fundo, v. 8, p. 121-137, 2000.

MARIANO, R.L.R. et al. Identificação de bactérias fitopatogênicas. In: MARIANO, R.L.R; SILVEIRA, E.B. (Coords.) *Manual de práticas em fitobacteriologia*. 2 ed. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2005. p. 67-111.

MARTINEZ, C. et al. Apoplastic Peroxidase Generates superoxide anions in cells of cotton cotyledons undergoing the hypersensitive

reaction to *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* race 18. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 11, n. 11, p. 1038-1047, 1998.

MAUCHI-MANI, B.; MÉTRAUX, J. -P. Salicylic acid and systemic acquired resistance to pathogen attack. *Annals of Botany*, Oxford, v. 82, n. 5, p. 535-540, 1998.

MELO, D. F. et al. Compatibilidade de *Dicyma pulvinata* com defensivos agrícolas e eficiência do biocontrole do mal-das-folhas da seringueira em campo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 43, n. 2, p. 179-185, 2008.

MÉTRAUX, J. -P. et al. Induced systemic resistance in cucumber in response to 2,6-dichloroisonicotinic acid and pathogens. In: HENNECKE, H.; VERMA, D.P.S. *Advances in molecular genetics of plant-microbe interactions*. v.1. Amsterdam: Kluwer Academic Publishers, 1991. p. 432-439.

MÉTRAUX, J. -P. Systemic acquired resistance and salicylic acid: current state of knowledge. *European Journal of Plant Pathology*, Dordrecht, v. 107, p. 13-18, 2001.

MORAES, M. G. Mecanismos da resistência sistêmica adquirida em plantas. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, Passo Fundo, v. 6, p. 261-284, 1998.

MOURA, F. F. et al. Reação *in vitro* de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* a indutores de resistência e extratos de plantas. *Tropical Plant Pathology*, Brasília, v. 34, p. S36, 2009. Suplemento.

NAMAI, T. et al. Time-course alteration of lipoxygenase activity in blast-infected rice leaves. *Annals Phytopathology Society*, v. 56, p. 26-32, 1990.

NANDAKUMAR, R. et al. Induction of systemic resistance in rice against sheath blight disease by *Pseudomonas fluorescens*. *Soil Biology & Biochemistry*, Oxford, v. 33, p. 603-612, 2001.

NARUSAKA, Y. et al. Comparison of local and systemic induction of acquired disease resistance in cucumber plants treated with benzothiadiazoles or salicylic acid. *Plant and Cell Physiology*, Tokyo, v. 40, n. 4, p. 388-395, 1999.

NARDO, E. A. B.; CAPALBO, D. M. F. O processo de avaliação de risco do uso de agentes microbianos de controle: testes ecotoxicológicos sobre organismos não visados. *Arquivos do Instituto Biológico*, Campinas, v. 59, p. 63-68, 1998.

OKA, Y.; COHEN, Y. Induced resistance to cyst and root-knot nematodes in cereals by DL- β -amino-n-butyric acid. *European Journal of Plant Pathology*, Dordrecht, v. 107, n. 2, p. 219-227, 2001.

OKUSHIMA, Y. et al. Secreted proteins of tobacco cultured BY2 cells: identification of a new member of pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology*, Dordrecht, v. 42, p. 479-488, 2000.

OLIVEIRA, R. F.; PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Papilla formation and peroxidase activity in *Mimosa scabrella* hypocotyls inoculated with the non-pathogen *Colletotrichum graminicola*. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 22, p. 195-197, 1997.

ONGENA, M. et al. Study of bacterial determinants involved in the induction of systemic resistance in bean by *Pseudomonas putida* BTP1. *European Journal of Plant Pathology*, Dordrecht, v. 108, p. 187-196, 2002.

OOSTENDORP, M. et al. Induced disease resistance in plants by chemicals. *European Journal of Plant Pathology*, Dordrecht, v. 107, p. 19-28, 2001.

OSSWALD, W. F. et al. The effect of acibenzolar-S-methyl on phytoalexin and PR-protein induction on sorghum mesocotyls and on *Colletotrichum sublineolum*. *Summa Phytopathologica*, Botucatu, v. 30, p. 415-420, 2004.

PALVA, T. K. et al. Salicylic acid induced resistance to *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* in tobacco. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, v. 7, p. 356-363, 1994.

PASCHOLATI, S. F.; NICHOLSON, R. L.; BUTLER, L. G. Phenylalanine ammonia-lyase activity and anthocyanin accumulation in wounded maize mesocotyls. *Journal of Phytopathology*, Berlin, v. 115, n. 2, p. 165-172, 1986.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Mecanismos bioquímicos da resistência as doenças. *Revisão Anual de Patologia Vegetal*, Passo Fundo, v. 2, p. 1-51, 1994.

PASCHOLATI, S. F. *Potencial de Saccharomyces cerevisiae e outros agentes bióticos na proteção de plantas contra patógenos*. 1998. Tese (Livre Docência) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1998.

PASCHOLATI, S. F. et al. Efeito *in vitro* do ativador de defesa vegetal “BION” no crescimento micelial e na germinação de conídios de *Colletotrichum graminicola*. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 23, p. 266-267, 1998.

PASCHOLATI, S. F. Bioquímica fitopatológica e indução de resistência. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 24, p. 241, 1999. Resumos.

PASCHOLATI, S. F.; GARCIA, E. O. Fitotoxina taxtomina e a ativação de mecanismos de defesa em plantas. *Tropical Plant Pathology*, Brasília, v. 34, p. XXXI-XXXII, 2009. Suplemento.

PAULITZ, T. C.; BÉLANGER, R. R. Biological control in greenhouse systems. *Annual Review of Phytopathology*, v. 39, p. 103-133, 2001.

PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. *Microbiologia: conceitos e aplicações*. 2 ed. São Paulo: Makron Books, 1996.

PETRAS, S. F.; CASIDA, L. E. J. Survival of *Bacillus thuringiensis* spores in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 50, p. 1496-1501, 1985.

PICCININ, E. *Uso de Saccharomyces cerevisiae na proteção de plantas de sorgo (Sorghum bicolor), maracujá azedo amarelo*

(*Passiflora edulis*) e eucalipto (*Eucalyptus spp.*) contra fitopatógenos fúngicos e bacterianos. 1995. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1995.

PICCININ, E.; DI PIERO, R. M.; PASCHOLATI, S. F. Efeito de *Saccharomyces cerevisiae* na produtividade de sorgo e na severidade de doença foliares no campo. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 30, p. 5-9. 2005.

QUERINO, C. M. B. et al. Efeito de dois indutores de resistência sobre a severidade do mal-do-Panamá. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 30, n. 3, p. 239-243, 2005.

RAIMUNDI, M. K. et al. Sistemicidade de diferentes produtos no controle da mancha bacteriana do tomateiro. *Tropical Plant Pathology*, Brasília, v. 34, p. S12. 2009. Suplemento.

RAMAMOORTHY, V.; RAGUCHANDER, T.; SAMIYAPPAN, R. Enhancing resistance of tomato and hot pepper to *Pythium* diseases by seed treatment with fluorescent pseudomonads. *European Journal of Plant Pathology*, Dordrecht, v. 108, p. 429-441, 2002.

REIS, E.M.; REIS, A.C.; FORCELINI, C.A. *Manual de fungicidas: guia para o controle químico de doenças de plantas*. 5 ed. Passo Fundo: Universidade de Passo Fundo, 2007.

RESENDE, M. L. V. et al. Perspectiva da indução de resistência em cacaueteiro contra *Crinipellis pernicioso* através do benzotiadiazole (BTH). *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.25, p.149-156, 2000.

RESENDE, M. L. V. et al. Induction of resistance in cocoa against *Crinipellis pernicioso* and *Verticillium dahliae* by acibenzolar-S-methyl (ASM). *Plant Pathology*, London, v. 51, n. 5, p. 621-628, 2002.

REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO SUL, 34, 2006, Pelotas. *Indicações técnicas para a cultura da soja no Rio Grande do Sul e Santa Catarina 2006/2007*. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2006.

REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO SUL, 37, 2009, Porto Alegre. *Indicações técnicas para a cultura da soja no Rio Grande do Sul e Santa Catarina 2009/2010*. Porto Alegre: UFRGS, 2009.

ROCHA, D. J. A. et al. Potencial de rizobactérias no controle de doenças da parte aérea do tomateiro em condições de campo. *Tropical Plant Pathology*, Brasília, v. 34, p. S53. 2009. Suplemento.

RODRIGUES, A. A. C.; BEZERRA NETO, E.; COELHO, R. S. B. Indução de resistência a *Fusarium oxysporum* f.sp. *tracheiphilum* em caupi: eficiência de indutores abióticos e atividade enzimática elicitada. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 31, p.492-499. 2006.

ROMEIRO, R.S. *Bactérias Fitopatogênicas*. Viçosa: UFV, 1995.

ROMEIRO, R.S. *Métodos em Bacteriologia de Plantas*. Viçosa: UFV, 2001.

ROMEIRO, R. S. ISR-SAR: pesquisa com procariotas para indução de resistência em plantas a patógenos na Universidade Federal de Viçosa. In: SIMPÓSIO DE BIOLOGIA MOLECULAR DA RESISTÊNCIA DE PLANTAS A PATÓGENOS: APLICAÇÕES NO MANEJO INTEGRADO DE FITODOENÇAS, 1., Lavras. Resumos, p.87, 2002.

ROMEIRO, R. S.; MACAGNAN, D. Busca, testagem, caracterização e estudos de potencialidades de uma PGPR selecionada para a cultura do tomateiro. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM PLANTAS, 2., SIMPÓSIO DE CONTROLE DE DOENÇAS DE PLANTAS, 4., 2004. Lavras. *Anais...* Lavras: UFLA, 2004. p. 115.

RUESS, W.; et al. Plant activator CGA 245704: an innovative approach for disease control in cereals and tobacco. In: BRIGHTON CROP PROTECTION CONFERENCE: PESTS & DISEASES. Brighton, 1996. p. 9-17.

RYALS, J. A. et al. Systemic acquired resistance. *The Plant Cell*, v. 8, n. 10, p. 1809-1819, 1996.

SBALCHEIRO, C. C. *Ação do biocontrolador com atividade de indução de resistência no controle do crestamento bacteriano comum do feijoeiro (Phaseolus vulgaris L.)*. 2006. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2006.

SCHENK, P. M. et al. Coordinated plant defense response in arabisopsis revealed by microarray analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, v. 97, n. 21, p. 11655-11660, 2000.

SCHNEIDER, S.; ULLRICH, W. R. Differential induction of resistance and enhanced enzyme activities in cucumber and tobacco caused by treatment with various abiotic and biotic inducers. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, London, v. 45, p. 291-304, 1994.

SHISHKOFF, N.; MCGRATH, M. T. AQ10 biofungicide combined with chemical fungicides or AddQ spray adjuvant. *Plant Disease*, St Paul, v. 86, p. 915-918, 2002.

SHTIENBERG, D.; ELAD, Y. Incorporation of weather forecasting in integrated, biological-chemical management of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*, St. Paul, v. 87, n. 3, p. 332-340, 1997.

SILVA, H. S. A. et al. Rhizobacterial induction of systemic resistance in tomato plants: non specific protection and increase enzyme activities. *Biological Control*, Orlando, v. 29, p. 288-295, 2004.

SILVA, J.F. et al. *Contribuição ao desenvolvimento de soja com resistência a patógenos*. (Embrapa Soja Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 1). Londrina: Embrapa Soja, 2002.

SILVA, L.H.C.P.; RESENDE, M.L.V. de. Resistência induzida em plantas contra patógenos. In: SILVA, L.H.C.P.; CAMPOS, J.R.; NOJOSA, G.B.A. (Ed.). *Manejo integrado de doenças e pragas em hortaliças*. Lavras: UFLA, 2001. p. 221-234.

SILVA, R. F.; PASCHOLATI, S. F.; BEDENDO, I. P. Indução de resistência em tomateiro por extratos aquosos de *Lentinula edodes* e

Agaricus blazei contra *Ralstonia solanacearum*. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 32, p. 189-196, 2007.

SILVA, S. R.; PASCHOLATI, S. F. *Saccharomyces cerevisiae* protects maize plants, under greenhouse conditions, against *Colletotrichum graminicola*. *Journal of Plant Disease and Protection*, v. 99, p. 159-167, 1992.

SINCLAIR, J. B.; BACKMAN, P. A. (Eds.). *Compendium of Soybean Diseases*. 3rd ed. St. Paul: American Phytopathological Society, 1989.

SOARES, R. M.; MARINGONI, A. C. Efeito de acibenzolar-S-metil sobre a germinação e desempenho de sementes de feijoeiro e na indução de resistência à murcha-de-curtobacterium. *Summa Phytopathologica*, Botucatu, v. 28, p. 41-45, 2002.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIÊNCIA DO SOLO. *Manual de adubação e de calagem: para os estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina*. 10 ed. Porto Alegre: Comissão de Química e Fertilidade do Solo, 2004.

SOYLU, S.; BAYSAL, O.; SOYLU, E. M. Induction of disease resistance by the plant activator, acibenzolar-S-methyl (ASM), against bacterial canker (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) in tomato seedlings. *Plant Science*, Amsterdam, v. 165, p. 1069-1075, 2003.

SPADARO, D.; GULLINO, M. L. Improving the efficacy of biocontrol agents against soilborne pathogens. *Crop Protection*, Guildford, v. 24, p. 601-613, 2005.

STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F. Proteção de plântulas de milho pipoca contra *Exserohilum turcicum* pelo uso de *Saccharomyces cerevisiae*. *Summa Phytopathologica*, Botucatu, v. 20, p. 16-21, 1994.

STICHER, L.; MAUCH-MANI, B.; MÉTRAUX J. P. Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology*, v. 35, p. 235-270, 1997.

STOCKWELL, V. O. et al. Antibiosis contributes to biological control of Fire Blight by *Pantoea agglomerans* strain Eh252 in orchards. *Phytopathology*, St. Paul, v. 92, n. 11, p. 1202-1209, 2002.

SUO, Y.; LEUNG, D. W. M. ASM-induced accumulation of extracellular proteins and blackspot disease in rose. *Biologia Plantarum*, v. 45, n. 2, p. 273-279, 2002.

TALLY, A.; et al. Commercial development of elicitors of induced resistance to pathogens. In: AGRAWAL, A.A.; TUZUN, S.; BENT, E. (Ed.) *Induced plant defenses against pathogens and herbivores*. Saint Paul: APS Press. 1999. p. 357-369.

TON, J. et al. Differential effectiveness of salicylate-dependent and jasmonate/ethylene-dependent induced resistance in *Arabidopsis*. *Mol. Plant-Microbe Interaction*, v. 15, p. 27-34, 2002.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. *Microbiologia*. 8 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

TOSI, L.; ZAZZERINI, A. Interactions between *Plasmopara helianthi*, *Glomus mosseae* and two plant activators in sunflower plants. *Europeans Journal of Plant Pathopatology*, Dordrecht, v. 106, p. 735-744, 2000.

TUZUN, S. et al. Induced systemic resistance to blue mold: early induction and accumulation of β -1,3-glucanase, chitinase, and other pathogenesis-related proteins (b-proteins) in immunized tobacco. *Physiology and Biochemistry*, v. 79, p. 979-983, 1989.

VAN LOON, L. C. et al. Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology*, Dordrecht, v. 12, p. 245-264, 1994.

VIDHYASEKARAN, P. et al. Induction of systemic resistance by *Pseudomonas fluorescens* Pfl against *Xanthomonas oryzae* in rice leaves. *Phytoparasitica*, Bet Dagan, v. 29, p. 155-167, 2001.

VITTI, A. J. Indução de resistência pelo Bion em diversas culturas de interesse econômico. In: Congresso Paulista de Fitopatologia, 32.,

Reunião Brasileira Sobre Indução de Resistência em Plantas a Patógenos, 4., 2009, São Pedro. *Anais...* São Pedro, 2009. p. 5.

WEI, G.; KLOPPER, J. W.; TUZUN, S. Induction of systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by select strain of plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology*, St. Paul, v. 81, p. 1508-1512, 1991.

WILLIAMS, D. J.; NYVALL, R. F. Leaf infection and yield losses caused by brown spot and bacterial blight diseases of soybean. *Phytopathology*, St. Paul, v. 70, n. 9, p. 900-902, 1980.

WILSON, M.; HIRANO, S. S.; LINDOW, S. E. Location and survival of leaf-associated bacteria in relation to pathogenicity and potential for growth within the leaf. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 65, n. 4, p. 1435-1443, 1999.

WITTIG, H. P. P.; JOHNSON, K. B.; PSCHIEDT, J. W. Effect of epiphytic fungi on brown rot blossom blight and latent infections in sweet cherry. *Plant Disease*, St Paul, v. 81, p. 383-387, 1997.

WRIGHT, S. A. I. et al. *Pantoea agglomerans* strain EH318 produces two antibiotics that inhibit *Erwinia amylovora* in vitro. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 67, n. 1, p. 284-292, 2001.

WRIGHT, S. A. I.; BEER, S. V. *Pantoea agglomerans* como agente de biocontrole do “fogo bacteriano”. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, Passo Fundo, v. 13, p. 247-276, 2005.

WU, W. S.; WU, H. C.; LI, Y. L. Potential of *Bacillus amiloliquefaciens* for control of *Alternaria cosmosa* and *A. patula* of *Cosmos sulfurous* (Yellow cosmos) and *Tagetes patula* (French marigold). *Journal of Phytopathology*, Berlin, v. 155, p. 670-675, 2007.

WULFF, N. A.; PASCHOLATI, S. F. Partial Characterization of Sorghum phytoalexin elicitors isolated from *Saccharomyces cerevisiae*. *Fitopatologia Brasileira*, Brasilia, v. 24, p. 428-435, 1999.

YAMAMIZO, C. et al. Rewiring mitogen-activated protein kinase cascade by positive feedback confers potato blight resistance. *Plant Physiology*, Rockville, v. 140, p. 681-692, 2006.

YARBROUGH, G. G. et al. Screening microbial metabolites for new drugs: theoretical and practical issues. *The Journal of Antibiotics*, Tokyo, v. 46, p. 535-544, 1993.

YORINORI, J. T. Situação atual das doenças potenciais no Cone Sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 2., 2002, Foz do Iguaçu, *Anais...* Londrina: Embrapa Soja, 2002. p.171-186.

YUEN, G. Y. et al. Bean rust biological control using bacterial agents. *Crop Protection*, Guildford, v. 20, p. 395-402, 2001.

ZHAO, H. et al. Stress stimulus induces resistance to *Cladosporium cucumerium* in cucumber seeding. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 44, p. 36-40, 2005.